



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ RONDÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA – REDE BIONORTE



Crotaipotina (CA da crotoxina) de *Crotalus durissus terrificus*: Estudos *in vitro*, *in silico* e imunológicos no contexto da leishmaniose e imunomodulação

JAMILE MARIANO MACEDO TABORDA

JAMILE MARIANO MACEDO TABORDA

Crotapotina (CA da crotoxina) de *Crotalus durissus terrificus*: Estudos *in vitro*, *in silico* e imunológicos no contexto da leishmaniose e imunomodulação

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE, na Fundação Oswaldo Cruz, Rondônia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Andreimar Martins Soares

Coorientador: Prof. Dr. Anderson Makoto Kayano

Porto Velho - RO

2025

ORCID¹: 0000-0002-9420-6282

Afiliação¹: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia. Porto Velho, RO, Brasil.

Title: Crotaipotin (CA of crotoxin) from *Crotalus durissus terrificus*: *In vitro*, *in silico* and immunological studies in the context of leishmaniasis and immunomodulation.

Dados internacionais de Catalogação na Fonte

Fundação Oswaldo Cruz

Fiocruz Rondônia

Núcleo de Informação Fiocruz Rondônia

T114c Taborda, Jamile Mariano Macedo.
Crotaipotina (CA da crotoxina) de *Crotalus durissus terrificus*:
Estudos *in vitro in silico* e imunológicos no contexto da leishmaniose
e imunomodulação / Jamile Mariano Macedo Taborda. -- 2024.
ix, 87 f. : il.color, fotos, mapas.
Orientador: Andreimar Martins Soares.
Coorientador: Anderson Makoto Kayano.
Tese (Doutorado em Programa de Pós-graduação em
Biodiversidade e Biotecnologia - Rede Bionorte) - Fundação Oswaldo
Cruz, Fiocruz Rondônia, Porto Velho, 2024.
Bibliografia: f. 55-67.
1. Leishmaniose. 2. Docagem molecular. 3. PBMC. 4. Inibição. 5.
Imunomodulação. I. Título.
CDD 616.9

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da
Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável: Catarina Ferreira da Silva, CRB-11: 000969/O.
Citar a fonte deste trabalho acadêmico sempre que for utilizá-lo, respeitando
os direitos autorais conforme a Política de Acesso Aberto da Fiocruz.

JAMILE MARIANO MACEDO TABORDA

Crotapotina (CA da crotoxina) de *Crotalus durissus terrificus*: Estudos *in vitro*, *in silico* e imunológicos no contexto da leishmaniose e imunomodulação

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE, na Fundação Oswaldo Cruz, Rondônia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em: 19/12/2024.

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 ANDREIMAR MARTINS SOARES
Data: 08/05/2025 11:00:06-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Andreimar Martins Soares (Orientador)
Fundação Oswaldo Cruz, Escritório Rondônia

Documento assinado digitalmente
 GISELE PICOLO
Data: 09/05/2025 10:14:41-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dra. Gisele Picolo
Instituto Butantã

Documento assinado digitalmente
 LOURDES MARIA GARCEZ DOS SANTOS
Data: 09/05/2025 14:17:05-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dra. Lourdes Garcez
Universidade do Estado do Pará

Documento assinado digitalmente
 MALSON NEILSON DE LUCENA
Data: 09/05/2025 11:41:54-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Malson Neilson de Lucena
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Documento assinado digitalmente
 MARCOS ROBERTO DE MATTOS FONTES
Data: 09/05/2025 12:00:48-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, JAMILE MARIANO MACEDO TABORDA, autorizo a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada **Crotapotina (CA da crotoxina) de *Crotalus durissus terrificus*: Estudos *in vitro*, *in sílico* e imunológicos no contexto da leishmaniose e imunomodulação**” no Portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório de Teses da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora.

Porto Velho, 19 de setembro de 2025.

Documento assinado digitalmente
 JAMILE MARIANO MACEDO TABORDA
Data: 19/09/2025 13:20:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jamile Mariano Macedo Taborda
Discente do Programa de Doutorado da Rede Bionorte
Polo Porto Velho

CPF: 804.337.152-00

RG: 838925 SSP-RO

Dedico este trabalho aos meus pais, Márcia e Jaime; ao meu amado Roger; aos meus pequenos Álvaro e Augusto – fonte de todo meu amor.

In memoriam

Aos meus sogros Conceição Aparecida Mesquita Taborda e Gessi Taborda da Costa.

Aos meus peludos Ulisses e Clarinha. 🐾🐾

AGRADECIMENTOS

Na vida, não fazemos nada sozinhos; imagine desenvolver um projeto de doutorado! Neste curto espaço, quero demonstrar toda minha gratidão às pessoas que me têm auxiliado nessa caminhada, desde o apoio moral à orientação na condução deste trabalho.

Primeiramente, quero agradecer a Deus, pois muitos foram os desafios nessa jornada e sei que foi Ele quem me deu forças em cada um desses momentos para me manter firme.

À minha família, minha estrutura, meu porto seguro: se não fossem o apoio e a compreensão da minha querida mãe, do meu esposo e dos meus pequenos, teria sido tudo muito mais difícil.

Ao meu amado Roger, por estar sempre ao meu lado e me apoiar nessa jornada!

Dona Márcia, minha mãe, se eu cheguei até este ponto em minha jornada foi porque você sempre acreditou no poder transformador da educação. Eu e meu irmão somos prova disso.

Ao meu irmão Alexandre, pela torcida e pelo apoio!

Aos amigos que fiz, que me auxiliaram, me capacitaram e têm me amparado ao longo desses três anos: obrigada por tudo, Pricila, Anderson e Mateus. A companhia de vocês foi fundamental nesse processo.

Ao Áleff, pela parceria, pela amizade e pelo auxílio com os ensaios *in silico*.

A Ana e Jorge, que, com paciência, generosidade e atenção, me receberam e me iniciaram na rotina do laboratório.

Aos nossos queridos alunos da iniciação científica, Maria Elisabeth, Rebeca, Juliana, Marcos Antônio e João Victor.

Ao meu amigo George, pelas risadas, pelo apoio e pelas sugestões fundamentais para a condução deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Imunologia Celular da Fiocruz por todo auxílio, companheirismo, ensinamentos e momentos festivos. Agradeço aos ensinamentos dos colegas Sulamita, Mauro, Milena, Suzanne e Hallison. À professora Juliana Zuliani, meu agradecimento por me receber em sua equipe com generosidade, carinho e orientação. Você é uma inspiração!

Ao meu orientador, professor Andreimar, por acreditar na minha capacidade de conduzir este trabalho, sempre com tranquilidade e respeito. Ao meu co-orientador, professor Anderson Kayano, por aceitar me auxiliar nesse processo; sua sabedoria e segurança são admiráveis. Você é sensacional!

Aos professores Marcos Fontes e Guilherme Marchi Salvador, do Instituto de Biofísica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Campus de Botucatu, pelo apoio com os ensaios *in silico*.

Ao professor Vanderlei Sabóia, pelo suporte com os ensaios de identificação da Crotapotina.

Ao professor Wanderley Rodrigues Bastos, por me apoiar desde a iniciação científica e por me socorrer quando tivemos avarias com os equipamentos.

À minha amiga e comadre Alecsandra (Leka), que esteve sempre disposta a me ouvir e trocar ideias sobre meu trabalho.

Aos amigos Leyde e Emerson, obrigada pelo apoio e pela compreensão.

À turma do IFRO, em especial a Gedeli, Sônia Paracamos, Márcia Jovani, Lindelaine, Gislaine, Sônia, Jean, Sérgio e Vítor, por sua amizade e torcida.

Ao Instituto Federal de Rondônia, pela oportunidade de crescer e me aprimorar profissionalmente.

À Coordenação Estadual, na figura das coordenadoras Carolina Dória, Lúcia Wadt e Carolina Bioni, e aos secretários Angela e Giovani – sempre dispostos a auxiliar e fazer o possível para atender à demanda de todos os alunos.

A todos os professores que atuaram no programa e ajudaram a aprimorar minha visão para o desenvolvimento desta proposta.

Aos membros da banca, por auxiliarem no aprimoramento deste trabalho.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro através do PROAP.

À FIOTEC, pelo auxílio financeiro dado ao PROEP/2022.

À FAPERO, pelo auxílio financeiro através do Edital Universal de Apoio à Pesquisa (PAP) nº 05/2021.

Ao IFRO, pelo recurso disponibilizado ao GIQ por meio do Edital nº 16/2022/Reit/PROPESP/IFRO para a conclusão deste trabalho.

“Peçam, e será dado; busquem, e encontrarão; batam, e a porta será aberta. Pois todo o que pede recebe; o que busca encontra; e àquele que bate, a porta será aberta” (Mateus, 7:7-8).

TABORDA, Jamile Mariano Macedo. **Crotopotina (CA da crotoxina) de *Crotalus durissus terrificus***: estudos *in vitro*, *in silico* e imunológicos no contexto da leishmaniose e imunomodulação. 2024. 72 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Fundação Oswaldo Cruz, Escritório Rondônia, Porto Velho, 2024.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença negligenciada de alta incidência no Brasil, especialmente na região Norte, onde persistem falhas terapêuticas e casos de resistência aos antimoniais pentavalentes, padrão preconizado pelo Ministério da Saúde. Esse cenário evidencia a urgência na busca por novas moléculas terapêuticas, mais eficazes e menos tóxicas. Neste trabalho, foi avaliado o potencial anti-leishmanicida e imunomodulador da Crotopotina, subunidade ácida e não tóxica da crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, por meio de abordagens *in silico*, *in vitro* e ensaios imunológicos. As análises *in silico* revelaram forte interação da Crotopotina com a Tripanotiona redutase de *Leishmania braziliensis* (ΔH médio de -15 kcal/mol) e estabilidade conformacional ao longo de 100 ns de dinâmica molecular. Os ensaios *in vitro* demonstraram inibição moderada da enzima recombinante (41% a 150 $\mu\text{g/mL}$; $\text{IC}_{50} = 223,5$ μM) e baixa eficácia sobre amastigotas axênicas de *L. amazonensis* (41% de inibição). Por outro lado, os estudos imunológicos em PBMC humanos evidenciaram ausência de citotoxicidade (até 96 h), nenhuma indução significativa de espécies reativas de oxigênio (ROS) e baixos níveis de liberação de LDH. Notavelmente, a Crotopotina modulou a resposta imune, com liberação precoce de IL-1 β (1–2 h) e aumento sustentado de IL-10 a partir de 24 h, com pico em 48 h, sugerindo uma ação pleiotrópica. Apesar da eficácia direta limitada contra o parasito, os dados obtidos indicam que a Crotopotina apresenta potencial imunomodulador relevante e merece ser explorada em modelos experimentais mais complexos como candidata a adjuvante ou protótipo terapêutico para leishmaniose.

Palavras-chave: Leishmanioses; docagem molecular; PBMC; inibição; imunomodulação.

TABORDA, Jamile Mariano Macedo. **Crotapotin (CA of crotoxin) from *Crotalus durissus terrificus*: *In vitro*, *in silico*, and immunological studies in the context of leishmaniasis and immunomodulation.** 2024. 72 p. Dissertation (PhD in Biotechnology), Oswaldo Cruz Foundation, Office Rondonia, Porto Velho, 2024.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease with high incidence in Brazil, particularly in the Northern region, where therapeutic failures and resistance to pentavalent antimonials—standard treatment recommended by the Ministry of Health—remain significant challenges. This scenario underscores the need for new drug candidates that are both more effective and less toxic. This study evaluated the anti-leishmanial and immunomodulatory potential of crotapotin, the acidic and non-toxic subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, using *in silico*, *in vitro*, and immunological approaches. *In silico* analysis revealed strong interaction between crotapotin and trypanothione reductase of *Leishmania braziliensis* (average ΔH of -15 kcal/mol) and structural stability during 100 ns of molecular dynamics simulation. *In vitro* assays demonstrated moderate inhibition of the recombinant enzyme (41% at 150 $\mu\text{g/mL}$; $\text{IC}_{50} = 223.5$ μM) and limited efficacy against axenic amastigotes of *L. amazonensis* (41% inhibition). In contrast, immunological assays using human PBMC showed no cytotoxicity up to 96 hours, no significant induction of reactive oxygen species (ROS), and no detectable cellular injury via LDH release. Importantly, crotapotin modulated immune responses, with early IL-1 β production (1–2 h) and sustained IL-10 release starting at 24 h, peaking at 48 h, suggesting a pleiotropic effect. Although its direct antiparasitic activity was limited, the results highlight crotapotin's immunomodulatory potential and support further investigation in more complex experimental models as a therapeutic prototype or immunoadjuvant candidate against leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis; molecular docking; PBMC; inhibition; immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Casos de leishmaniose tegumentar por UF de infecção	5
Figura 2 – Ciclo de vida das espécies de <i>Leishmania</i>	7
Figura 3 – Sequência de eventos, dependentes da TR, responsáveis pela neutralização das espécies reativas de oxigênio	12
Figura 4 – Distribuição geográfica da serpente <i>Crotalus durissus</i> no Brasil	15
Figura 5 – Espécime da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	16
Figura 6 – Estrutura tridimensional do complexo CA e CB.....	18
Figura 7 – Validação do modelo estrutural da interação entre TRLb e Crotapotina gerado pelo AlphaFold 3.....	31
Figura 8 – Previsão de ligação da Crotapotina à Tripanotona redutase de <i>Leishmania</i> <i>braziliensis</i> (TRLb).....	32
Figura 9 – Análise de estabilidade e conformacional do Complexo TRLb – Crotapotina.....	34
Figura 10 – Perfil cromatográfico da crotoxina e Crotapotina em diferentes técnicas cromatográficas	35
Figura 11 – Espectrometria de massa MALDI-TOF2 da Crotapotina	36
Figura 12 – Perfil cromatográfico da purificação da TRLb.....	36
Figura 13 – Ensaio de inibição da Crotapotina na atividade TRLb	37
Figura 14 – Atividade inibitória da Crotapotina sobre formas amastigotas axênicas de <i>Leishmania amazonensis</i>	38
Figura 15 – Efeito da Crotapotina sobre a viabilidade celular de PBMCs humanos	39
Figura 16 – Ensaio bioquímico de LDH.....	40
Figura 17 – Ensaio de DCFDA.....	40
Figura 18 – Produção de ROS intracelular, mensurado por citometria de fluxo	42
Figura 19 – Ensaio de imunofluorescência	44
Figura 20 – Análise estatística do ensaio de imunofluorescência	44
Figura 21 – Quantificação da citocina IL-10	45
Figura 22 – Dosagem da citocina IL-1 β	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

C.d.t. – *Crotalus durissus terrificus*
CA – Crotapotina
CDC – Centers for Disease Control and Prevention
CTP – Crotapotina
CTX – Crotoxina
CVX – Convulxina
DCFDA – 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
DTN – Doenças tropicais negligenciadas
EROS – Espécies reativas de oxigênio
FAD – Flavina-adenina dinucleótido
GR – Glutathione redutase
GSDMD – Gasdermina
LCD – Leishmaniose cutânea difusa
LDH – Lactato desidrogenase
LPS – Lipossacarídeo
MS – Ministério da Saúde
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPAS – Organização Panamericana de Saúde
PFA – Paraformaldeído
PLA₂ – Fosfolipase A₂
PMA – Propidium monoazide
PBMC – Peripheral blood mononuclear cell
PMD – Pentamidina
PRRS – Receptores de reconhecimento de padrões
RMSDS – Root mean square deviations
ROS – Reactive oxygen species
SUS – Sistema Único de Saúde
TR – Tripanotona redutase
TRLb – Tripanotona redutase de *Leishmania braziliensis*
[T(S)₂] – Tripanotona dissulfeto
[T(SH)₂] – Tripanotona ditiol
WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO-GERAL	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 LEISHMANIOSES	4
2.1.1 Ciclo infeccioso	6
2.1.2 Tratamento dos pacientes infectados	9
2.2 NOVOS CAMINHOS PARA O TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES	11
2.3 O EMPREGO DE ALVOS MOLECULARES NA PROSPECÇÃO DE NOVOS MEDICAMENTOS	12
2.4 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> : UMA FERRAMENTA IMPORTANTE NA PROSPECÇÃO DE FÁRMACOS	13
2.5 BIOPROSPECÇÃO DE FÁRMACOS A PARTIR DO VENENO DE SERPENTES	14
2.6 <i>CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS</i>	14
2.6.1 <i>Crotalus durissus terrificus</i> : principais características, comportamento, reprodução e hábitos alimentares	16
2.6.2 Composição do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e os efeitos do envenenamento	17
2.6.3 Crotoxina e subunidades	17
2.7 POTENCIAL IMUNOMODULADOR DA CROTAPOTINA EM PBMCS	19
2.7.1 O papel das citocinas IL-10 e IL-1 β na resposta imune	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 ESTUDOS <i>IN SILICO</i> COM A TRIPANOTONA REDUTASE DE <i>LEISHMANIA BRAZILIENSIS</i> E CROTAPOTINA DE <i>CROTALUS</i> <i>DURISSUS TERRIFICUS</i>	22
3.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA CROTAPOTINA	23
3.2.1 Do veneno	23
3.2.2 Das análises cromatográficas	24
3.2.3 Dosagem de proteínas	24
3.2.4 Eletroforese monodimensional	24
3.2.5 Da identificação da proteína por MALDI-TOF2	25
3.3 EXPRESSÃO RECOMBINANTE E CARACTERIZAÇÃO DA TRIPANOTONA REDUTASE DE <i>LEISHMANIA BRAZILIENSIS</i>	25
3.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DA CROTAPOTINA	26
3.5 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> COM FORMAS AMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA</i> <i>AMAZONENSIS</i>	26
3.5.1 Ensaio de citotoxicidade por MTT	27
3.6 ENSAIOS DE IMUNOLOGIA CELULAR	27
3.6.1 Comissão de ética	27
3.6.2 Isolamento de PBMCs humanos	27

3.6.3 Ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo.....	28
3.6.4 Quantificação de lactato desidrogenase	28
3.6.5 Determinação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por espectrofotometria	28
3.6.6 Determinação da produção de ROS por citometria de fluxo	29
3.6.7 Preparo de lâminas para imunofluorescência.....	29
3.6.8 Quantificação de citocinas por EIA.....	30
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4 RESULTADOS.....	31
4.1 DOCAGEM MOLECULAR E DINÂMICA MOLECULAR	31
4.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DA CROTAPOTINA.....	34
4.3 EXPRESSÃO RECOMBINANTE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA TRLb.....	36
4.4 INIBIÇÃO DAS AMASTIGOTAS AXÊNICAS.....	37
4.5 ENSAIO DE VIABILIDADE DE PBMCS POR CITOMETRIA DE FLUXO	38
4.6 PRODUÇÃO DE LDH	39
4.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ROS POR DCFDA	40
4.8 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ROS POR CITOMETRIA DE FLUXO	41
4.9 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	43
4.10 LIBERAÇÃO DE IL-10 E IL-1 β ATRAVÉS DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO	45
5 DISCUSSÃO	47
5.1 ENSAIOS <i>IN SILICO</i>	47
5.2 PURIFICAÇÃO DA CROTAPOTINA	49
5.3 EXPRESSÃO RECOMBINANTE DA TR E ATIVIDADE INIBITÓRIA DA CROTAPOTINA	49
5.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA DA CROTAPOTINA SOBRE AMASTIGOTAS AXÊNICAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i>	50
5.5 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA CROTAPOTINA SOBRE PBMCS.....	51
6 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS	68

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são representadas por um grupo de enfermidades distintas como tuberculose e leishmanioses, dentre outras, que acometem a camada mais vulnerável da população. Essas doenças se desenvolvem em climas quentes e úmidos, sobretudo nos trópicos, e causam um forte impacto na economia e problemas à saúde pública. Recebem essa designação de DTN em função da falta de atenção e recursos financeiros destinados às políticas de controle e eliminação dessas doenças (DE VRIES; SCHALLIG, 2022; FARINA *et al.*, 2022; LIMA, 2014; WHO, 2023).

As leishmanioses são um grupo de doenças que acometem populações submetidas a desnutrição, deslocamentos, moradia precária, sistema imunológico debilitado e falta de recursos financeiros; estão entre as dez principais causas de mortes prematuras em todo o mundo e são provocadas por parasitos do gênero *Leishmania* (FARINA *et al.*, 2022; LUNA; CAMPOS, 2020; WHO, 2023).

Essas enfermidades, ainda que impactem fortemente nas condições de saúde, são pouco atrativas para a indústria farmacêutica por serem mais circunscritas às populações com baixa capacidade financeira. Quando evoluem para a forma de leishmaniose visceral, podem ser letais e com frequência acarretam consequências incapacitantes, o que causa o comprometimento da dinâmica familiar e social, onera os sistemas de saúde dos países já economicamente desfavorecidos e impacta na capacidade produtiva de sua população, formando um ciclo vicioso de grande repercussão negativa no desenvolvimento humano (KUSHWAHA; CAPALASH, 2023; LUNA; CAMPOS, 2020).

O tratamento das leishmanioses é complexo, uma vez que apresenta efeitos colaterais importantes; com frequência, é ineficaz devido à resistência pelos parasitos – e com eficácia em apenas 80% dos pacientes. Além da ocorrência de deformidades, há o envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, são consideradas doenças ocupacionais (HENDRICKX *et al.*, 2019; KUSHWAHA; CAPALASH, 2023; PINART *et al.*, 2020; VASCONCELOS *et al.*, 2018).

Assim, demonstra-se a necessidade de novas terapias que complementem as já existentes – ou que possam, inclusive, ser utilizadas como terapias de primeira escolha. Para essa situação, moléculas provenientes da fauna e da flora apresentam-se como os principais modelos para o desenvolvimento de novos protótipos de fármacos que possam atuar inibindo o crescimento parasitário. Mais especificamente, os venenos de serpentes são uma importante fonte de compostos químicos bioativos que apresentam potencial para o desenho racional de medicamentos, tanto para a terapêutica quanto para o diagnóstico de diferentes patologias de interesse à saúde humana (DINIZ-SOUSA *et al.*, 2023; DOLEY; KINI, 2009).

A biodiversidade brasileira possui abundantes espécies com potencial farmacológico. Essa riqueza natural, associada à revolução biotecnológica (e, atualmente, com as ciências

“ômicas” – por exemplo, genômica, transcriptômica, genômica funcional, proteômica, metabolômica, lipidômica e citômica), tem fornecido informações extremamente úteis para a descoberta de fármacos. O conhecimento dos processos biológicos no nível estrutural e o avanço computacional, associados à química medicinal, torna possível o acúmulo de informações que poderão ser aplicadas no desenvolvimento de novos medicamentos e/ou processos que visam ao tratamento e/ou diagnóstico de doenças. Dada a imensa lacuna no desenvolvimento de novos fármacos mais acessíveis e menos tóxicos para o tratamento das leishmanioses, o avanço das técnicas de pesquisa representa um propulsor para que prossigam as buscas por novos compostos bioativos que sejam eficazes contra essas doenças (DINIZ-SOUSA *et al.*, 2023; KUSHWAHA; CAPALASH, 2023).

Diante desse cenário, a presente pesquisa parte da seguinte hipótese: entre as frações do veneno da serpente *Crotalus durissus*, pode existir uma molécula bioativa com potencial inibitório *in vitro*, frente tanto a linhagens celulares de *Leishmania amazonensis* quanto ao alvo molecular Tripanotiona redutase (TR).

1.1 OBJETIVO-GERAL

Partindo da presente hipótese, este estudo tem como principal objetivo avaliar a ação da Crotapotina (CA da crotoxina) de *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t.) contra parasitos de *Leishmania amazonensis* e enzimas obtidas por expressão recombinante de *Leishmania braziliensis*, bem como realizar ensaios imunológicos para avaliar a ação imunomodulatória da Crotapotina sobre células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, sigla em inglês para *peripheral blood mononuclear cells*).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as propriedades estruturais e funcionais da Crotapotina utilizando ensaios *in silico*, com o intuito de identificar regiões específicas capazes de interagir com a enzima Tripanotiona redutase de *Leishmania braziliensis* (TRLb) e de fornecer subsídios para o desenvolvimento de potenciais inibidores terapêuticos;
- Obter a enzima recombinante TRLb em sua forma ativa e com elevado grau de pureza, garantindo sua utilização nos ensaios subsequentes;
- Avaliar a atividade leishmanicida da Crotapotina contra formas amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*, bem como sua ação citotóxica sobre essas formas parasitárias;
- Avaliar as atividades imunomoduladoras da Crotapotina sobre PBMCs, por meio da liberação de IL-1 β , IL-10 e espécies reativas de oxigênio (ROS) e lactato desidrogenase (LDH);

- Avaliar a participação do inflamassoma NLRP3 por meio de ensaios de imunofluorescência.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas distribuídas pelo Velho e pelo Novo Mundo. São endêmicas em cinco continentes e registradas em 98 países e três territórios, abrangendo países subdesenvolvidos, em desenvolvimento ou mesmo desenvolvidos, com prevalência nas áreas de clima temperado a tropical. Estima-se que a população total de risco é de aproximadamente 350 milhões de pessoas. A cada ano, ocorrem cerca de dois milhões de novos casos e a prevalência global é de 12 milhões de casos (DE VRIES; SCHALLIG, 2022; MEIRELES *et al.*, 2017).

Os primeiros registros de leishmaniose cutânea datam de cerca de 2.500 a. C. em múmias egípcias e cristãs da Núbia; ao longo dos anos, foram registrados achados semelhantes em múmias de várias partes do mundo (BURZA *et al.*, 2018; KRZEMIŃSKI; KRZEMIŃSKA, 2003; SERENO *et al.*, 2017).

O parasito causador da leishmaniose classifica-se taxonomicamente como pertencente ao reino Protista, ao subreino Protozoa, ao filo Sarcomastigophora, ao subfilo Mastigophora, à classe Zoomastigophora, à ordem Kinetoplastida, à subordem Trypanosomatina, à família Trypanosomatidae, ao gênero *Leishmania* e aos subgêneros *L. Viannia* e *L. Leishmania*.

No quadro 1, abaixo, são apresentados os subgêneros de *Leishmania* que acometem seres humanos, bem como as formas de acometimento clínico e sua distribuição geográfica.

Quadro 1 – Apresentação clínica e distribuição geográfica das subespécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar americana que infectam seres humanos no Brasil

Subgênero <i>Viannia</i> (LAINSON; SHAW, 1972)	Acometimento clínico no homem	Distribuição geográfica
<i>Leishmania</i> (<i>V.</i>) <i>braziliensis</i> (VIANNA, 1911)	Principal agente da leishmaniose tegumentar americana (LTA), causa lesões cutâneas e, em alguns casos, mucocutâneas.	Presente em todo o território brasileiro, com maior prevalência nas regiões Norte e Nordeste.
<i>Leishmania</i> (<i>V.</i>) <i>guyanensis</i> (FLOCH, 1954)	Predominantemente lesões cutâneas.	Limitada à região Norte, nos estados do Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Pará.
<i>Leishmania</i> (<i>L.</i>) <i>amazonensis</i> (LAINSON; SHAW, 1972)	Lesões cutâneas e, eventualmente, cutâneo-difusas.	Presente nos estados do Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão. Sua presença amplia-se para o Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-Oeste (Goiás) e Sul (Paraná).

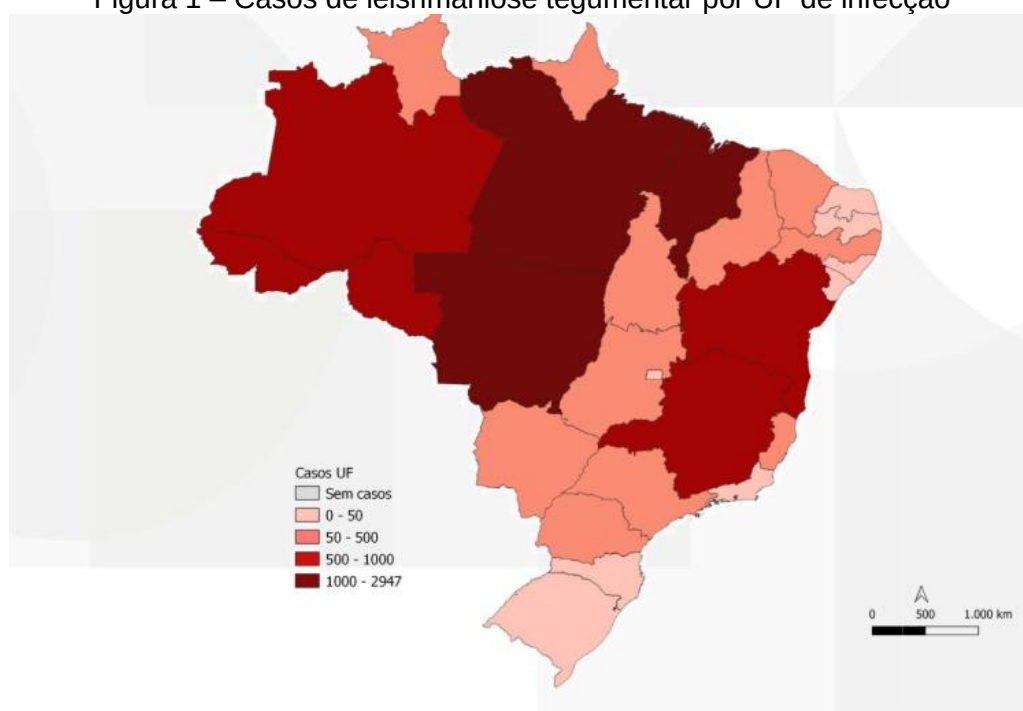
Fonte: Ministério da Saúde (BRASIL, [s. d.]).

As espécies de *Leishmania* responsáveis pela leishmaniose cutânea são geralmente classificadas em dois grupos: as do **Velho Mundo**, como *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica*, que ocorrem principalmente na Bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio, na região conhecida como “Chifre da África” e no subcontinente indiano; e as do **Novo Mundo**, como *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, que são endêmicas nas Américas (MANN *et al.*, 2021; WHO, 2023).

Quanto à forma visceral, as principais espécies são: *Leishmania (L.) tropica*, principal espécie causadora da leishmaniose visceral na Ásia e em parte da Índia; e *Leishmania (L.) infantum*, com incidência em áreas do Oriente Médio e partes da Ásia Central (WHO, 2023).

No Brasil, a doença distribui-se de forma heterogênea, com prevalência em áreas rurais e florestais, e apresenta sete espécies de *Leishmanias* envolvidas na ocorrência de casos de LT. As mais importantes são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* (BRASIL, [s. d.]). As regiões Norte e Centro-Oeste destacam-se como áreas endêmicas, com casos esporádicos reportados em outras regiões, evidenciando a expansão territorial da doença (BRASIL, 2022).

Figura 1 – Casos de leishmaniose tegumentar por UF de infecção



Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (BRASIL, 2022).

A *Leishmania braziliensis* é endêmica em diversas regiões do Brasil, com uma incidência mais elevada na região Norte, seguida pelas regiões Centro-Oeste e Nordeste (conforme a figura 1). A transmissão da doença está intrinsecamente ligada às condições socioeconômicas e ambientais, tais como desmatamento, urbanização precária e migração humana. Esses fatores contribuem para a expansão da leishmaniose para áreas anteriormente não endêmicas, desafiando os sistemas de saúde locais (BRASIL, 2022).

2.1.1 Ciclo infeccioso

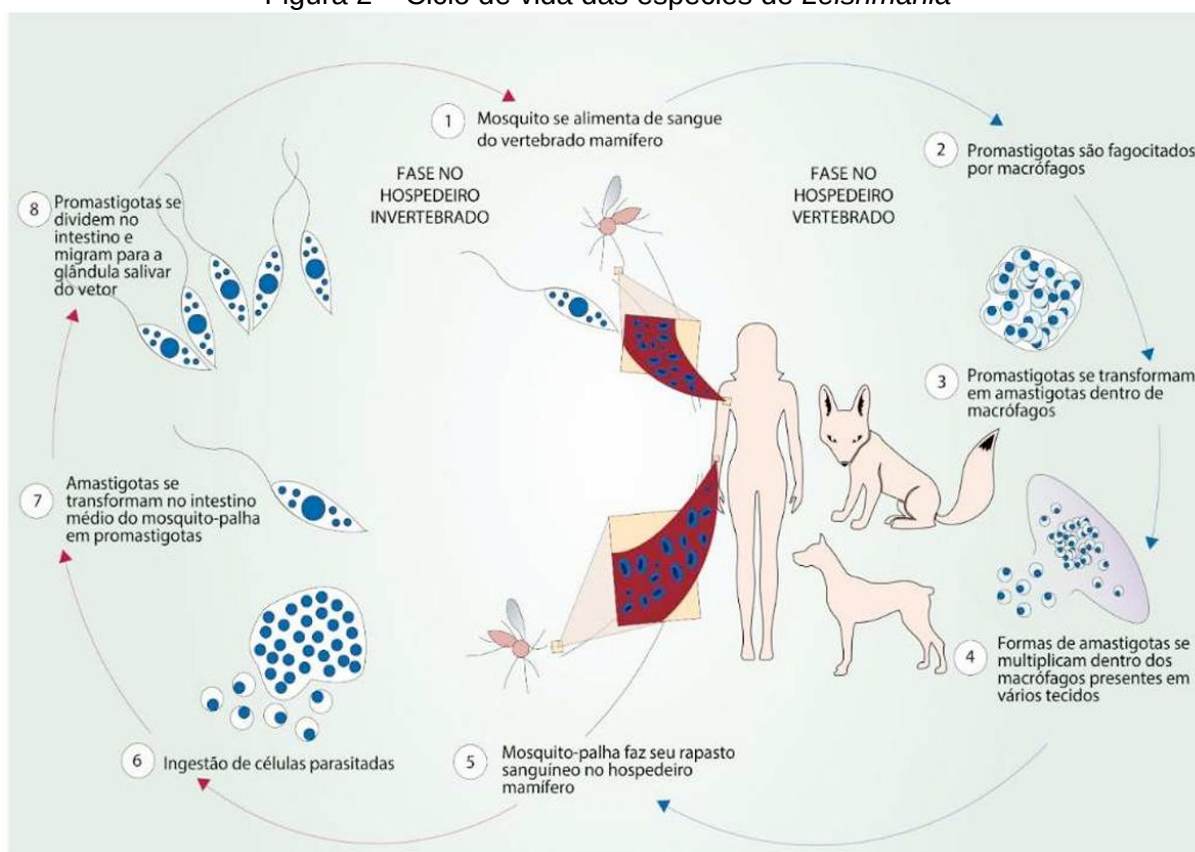
As *Leishmanias* spp. são parasitos intracelulares obrigatórios de células do sistema fagocítico mononuclear, com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (BRASIL, [s. d.]).

Os principais vetores transmitem a forma mais comum, causadora da leishmaniose tegumentar (LT). Esses vetores são insetos conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito-palha, tatuquira, birigui, entre outras designações. A transmissão da LT ocorre pela picada de fêmeas infectadas desses insetos. São numerosos os registros de infecção em animais domésticos (BAILEY; LOCKWOOD, 2007; BRASIL, [s. d.]; HERAS-MOSTEIRO *et al.*, 2017). Nos seres humanos, o período de incubação – tempo em que os sintomas começam a aparecer desde a infecção – é de, em média, dois a três meses; pode haver períodos mais curtos, de duas semanas, e mais longos, de dois anos (BRASIL, [s. d.]). Após a inoculação pelo flebotomíneo, as formas promastigotas extracelulares são fagocitadas pelos macrófagos hospedeiros, transformando-se em amastigotas no interior dessas células (BERHE *et al.*, 2024).

O reconhecimento do parasito pelas células do sistema imunológico do hospedeiro é essencial para desencadear uma resposta imunológica específica e eficaz contra *Leishmania* (MARTÍNEZ *et al.*, 2018). No início da infecção, os neutrófilos são os primeiros a migrar para os locais afetados, iniciando uma resposta inflamatória que limita a presença do parasito e desempenha um papel crucial na defesa do organismo (HURRELL *et al.*, 2016). Quando os parasitos são fagocitados pelos macrófagos, eles são capturados e internalizados em fagossomos que, em seguida, se fundem com lisossomos de forma convencional. Nesse ambiente, os parasitos se beneficiam de uma interação complexa com as células hospedeiras, permitindo sua sobrevivência. Durante este processo, os promastigotas se transformam rapidamente em amastigotas dentro de 12 a 24 horas, permanecendo no compartimento fagolisossomal enquanto continuam a crescer e se dividir. Durante essa fase, ocorre intensa multiplicação por divisão binária, levando ao rompimento das células parasitadas e à liberação de amastigotas que infectam novos macrófagos, reiniciando o ciclo (KEVRIC *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2006).

Por outro lado, o ciclo envolve o vetor, que, ao se alimentar de sangue contaminado, ingere células infectadas pelo parasito. Essas células se rompem, liberando uma grande quantidade de parasitos na forma amastigota. No intestino médio do vetor, esses amastigotas se diferenciam em promastigotas e migram para a probóscide (ANVERSA *et al.*, 2018; CHAPPUIS *et al.*, 2007), dando início a um novo ciclo, conforme a figura 2.

Figura 2 – Ciclo de vida das espécies de *Leishmania*



Fonte: Moreira *et al.* (2020, p. 75).

Os parasitos podem permanecer na pele ou disseminar-se para a mucosa da nasofaringe, a medula óssea, o baço, o fígado e, ocasionalmente, para outros órgãos, resultando nas três principais apresentações clínicas da leishmaniose: cutânea, mucocutânea e visceral (BERHE *et al.*, 2024; DE VRIES; SCHALLIG, 2022; MATHISON; BRADLEY, 2023).

A leishmaniose cutânea também é conhecida como úlcera oriental ou tropical, furúnculo de Delhi ou Aleppo e, no Brasil, como calazar ou úlcera de Bauru. As principais espécies causadoras são *L. major* e *L. tropica* no sul da Europa, na Ásia e na África; *L. mexicana* e espécies relacionadas no México e nas Américas Central e do Sul; e *L. braziliensis* e espécies relacionadas nas Américas Central e do Sul. Foram relatados casos entre militares norte-americanos no Iraque e no Afeganistão e entre viajantes para regiões endêmicas nas Américas Central e do Sul, em Israel e em outros locais. A forma disseminada da leishmaniose cutânea difusa é rara, mas pode ocorrer em infecções por *Leishmania braziliensis* (LAINSON; SHAW, 1972).

A leishmaniose cutânea produz uma lesão de pele bem demarcada no local da picada do inseto depois de várias semanas ou meses. Lesões múltiplas podem ocorrer após picadas múltiplas infectadas ou disseminação metastática. Sua aparência varia, sendo geralmente uma pápula que aumenta lentamente, ulcerando-se no centro e desenvolvendo uma borda eritematosa elevada, onde os parasitos intracelulares estão concentrados. As úlceras são tipicamente indolores e não causam sintomas sistêmicos, a menos que estejam

secundariamente infectadas. As lesões cicatrizam espontaneamente após meses, mas podem persistir por anos, deixando uma cicatriz deprimida, semelhante a uma queimadura. A evolução depende das espécies de *Leishmania* e do estado imune do hospedeiro (DE VRIES; SCHALLIG, 2022; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; WHO, 2023).

A leishmaniose cutânea pode evoluir para formas mais graves em indivíduos com debilidades imunológicas, apresentando complicações que afetam a qualidade de vida dos pacientes. Entre essas manifestações estão a leishmaniose mucocutânea e a leishmaniose cutânea difusa (LCD), que, embora sejam raras, estão associadas a uma resposta imunológica inadequada. Essas formas graves são mais frequentemente observadas em populações vulneráveis, como pacientes imunocomprometidos, e podem resultar em lesões extensas, persistentes e de difícil tratamento, reforçando a necessidade de diagnóstico precoce e manejo clínico apropriado (WHO, 2023)

A leishmaniose mucocutânea é causada principalmente por *L. braziliensis*, mas pode ocorrer devido a outras espécies de *Leishmania* (BRASIL, 2022). Acredita-se que os parasitos se disseminem da lesão inicial na pele através dos vasos linfáticos e do sangue para os tecidos nasofaríngeos. Os sinais e sintomas da leishmaniose mucocutânea tipicamente se desenvolvem meses ou anos após o aparecimento da lesão cutânea inicial, que geralmente começa com uma ou mais úlceras cutâneas primárias (DE VRIES; SCHALLIG, 2022; PACE, 2014). A disseminação para a mucosa via vasos linfáticos e corrente sanguínea provavelmente ocorre precocemente na infecção. As lesões cutâneas cicatrizam espontaneamente, mas as lesões progressivas da mucosa podem não se tornar evidentes por meses ou anos (PACE, 2014). Os pacientes tipicamente apresentam congestão nasal, secreção e dor. Com o tempo, a infecção pode evoluir, resultando em mutilação importante do nariz, palato, faringe oral ou face (GUREL *et al.*, 2020).

A LCD é uma doença rara associada à resposta imunológica celular inadequada do hospedeiro, causada por diferentes espécies: *infantum*, *aetiopia*, *major*, *mexicana* e outras, além da *L. amazonensis* no Brasil. Apresenta-se como uma patologia persistente, prevalente em regiões etíopes e quenianas, com casos também na Namíbia e na Tanzânia e amplamente nas Américas (HASHIGUCHI *et al.*, 2016; SILVEIRA *et al.*, 2004; VOLPEDO *et al.*, 2021). Notável em indivíduos com imunodeficiência, como portadores de HIV, a LCD se caracteriza por pápulas persistentes, que evoluem sem formar úlceras. A propagação é insidiosa, pode durar anos e resultar em lesões nodulares. Distintamente, os parasitos espalham-se pelo sistema linfohematogênico, resistindo aos tratamentos usuais (VOLPEDO *et al.*, 2021).

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é tipicamente causada por *L. donovani* ou *L. infantum* e ocorre em várias regiões ao redor do mundo. A maioria dos casos ocorre no nordeste da Índia. Os parasitos se disseminam do local da picada na pele para linfonodos, baço, fígado e medula óssea, causando sintomas sistêmicos. Infecções subclínicas são comuns, sendo que somente uma minoria de pessoas infectadas desenvolve

a doença. A infecção sintomática por *L. infantum* é mais comum em crianças do que em adultos. A leishmaniose visceral é uma infecção oportunista em pacientes com AIDS ou outros com comprometimento imunitário (GUREL *et al.*, 2020; MATHISON; BRADLEY, 2023).

Outro quadro grave, porém raro, é causado pela leishmaniose cutânea pós-calazar, o qual pode ocorrer após o tratamento da leishmaniose visceral em pacientes no Sudão e na Índia. É caracterizada por lesões cutâneas achatadas ou nodulares que contêm muitos parasitos. Em pacientes sudaneses, essas lesões se desenvolvem no final ou depois de seis meses do tratamento e se resolvem espontaneamente em alguns meses ou até um ano mais tarde. Em pacientes da Índia e países adjacentes, as lesões cutâneas geralmente se desenvolvem de um a dois anos após o término do tratamento e podem persistir por vários anos. Acredita-se que as lesões por leishmaniose cutânea pós-calazar sejam um reservatório para a propagação da infecção nessas regiões (KUMAR *et al.*, 2023; SINGH; SUNDAR, 2012).

2.1.2 Tratamento dos pacientes infectados

O tratamento da leishmaniose é complexo e depende da síndrome clínica, da espécie de *Leishmania* infectante, da região geográfica da aquisição, da probabilidade de susceptibilidade do organismo a fármacos leishmanicidas e do estado imunitário do hospedeiro (BRASIL, 2022; SCORZA *et al.*, 2017; VOLPEDO *et al.*, 2021).

Embora a leishmaniose seja considerada uma doença antiga, o tratamento ainda representa uma preocupação devido à toxicidade e à duração prolongada, além dos fatores mencionados anteriormente (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010). No cenário atual, medicamentos disponíveis, como os compostos inorgânicos (antimônios pentavalentes) e a anfotericina B, apresentam alta eficácia (cerca de 90%); novas abordagens terapêuticas, como quimioterapia e imunoterapia, também têm sido introduzidas. No entanto, isso não deve levar a um relaxamento na busca por novas alternativas farmacológicas (PRADHAN *et al.*, 2022). Além disso, a alta toxicidade e a longa duração do tratamento tornam esses medicamentos menos ideais, devido à possibilidade de surgimento de resistência (SILVA *et al.*, 2017).

Os antimoniais pentavalentes são considerados medicamentos de primeira linha para o tratamento da leishmaniose. Embora seu mecanismo de ação não esteja completamente elucidado, sabe-se que o fármaco atua inibindo processos como a glicólise, a oxidação de ácidos graxos e a biossíntese de poliaminas, além de provocar distúrbios na membrana mitocondrial do parasito (PACE, 2014). Além disso, para melhorar a eficácia do tratamento por meio do estímulo à expressão de citocinas, o zinco foi testado em combinação com antimônio. No entanto, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IFN- γ entre o grupo tratado com antimonial + zinco e o grupo placebo (GUZMAN-RIVERO *et al.*, 2015).

A anfotericina B é considerada o medicamento de segunda escolha no tratamento da leishmaniose. Sua ação envolve a formação de poros na membrana citoplasmática, permitindo a saída de íons potássio – o que afeta a glicólise intracelular – e, simultaneamente, a entrada de íons hidrogênio – acidificando o meio citoplasmático e levando à morte celular (AZANZA PEREA, 2021). A anfotericina B está comercialmente disponível em vários países e pode ser utilizada durante a gestação. Embora esse medicamento tenha baixa absorção gastrointestinal e uma meia-vida curta, afetando quase imediatamente o fígado e o baço, tanto a forma deoxicolato da anfotericina B quanto suas formulações lipossomais são empregadas clinicamente no tratamento da leishmaniose (BRIONES NIEVA *et al.*, 2021).

A miltefosina é um composto fosfolipídico desenvolvido inicialmente para o tratamento de neoplasias, infecções bacterianas e fúngicas. Sua ação envolve a interferência no metabolismo dos fosfolipídios, afetando tanto a membrana plasmática quanto a mitocondrial do parasito, o que resulta em morte celular. Este é o primeiro medicamento administrado por via oral para leishmaniose, eliminando a necessidade de hospitalização e permitindo que o paciente realize o tratamento em casa, com resultados geralmente satisfatórios na maioria dos casos (AKBARI *et al.*, 2017). No entanto, o uso inadequado da miltefosina pode levar ao desenvolvimento de resistência, devido à inativação do gene responsável pela absorção do medicamento e ao seu longo período de meia-vida (sete dias). Além disso, os efeitos adversos como vômitos, náuseas, diarreia, febre, anafilaxia e hipersensibilidade podem ser limitantes (AKBARI *et al.*, 2017; BRIONES NIEVA *et al.*, 2021).

A pentamidina (PMD) é um composto aromático diamidina utilizado na forma de sal de isetionato, administrado por via intravenosa ou intramuscular para o tratamento da leishmaniose. Este medicamento é rapidamente absorvido pelas células protozoárias, onde se liga fortemente ao RNA de transferência, inibindo a síntese de proteínas ribossômicas e a síntese de ácidos nucleicos e fosfolipídios. A metabolização da PMD ocorre no fígado e sua meia-vida é bastante prolongada, varia entre dez e 14 dias. No entanto, devido à sua toxicidade e à eficácia reduzida, a PMD foi descontinuada como tratamento de segunda linha para a leishmaniose visceral (BRIONES NIEVA *et al.*, 2021).

No Brasil, as espécies *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* destacam-se como os principais agentes etiológicos da leishmaniose cutânea, especialmente na região Norte, onde a prevalência da doença é elevada e as formas mais graves, como a difusa e a mucocutânea, são mais frequentes (GIAROLA *et al.*, 2014). O tratamento de primeira linha, baseado no antimoniato pentavalente, enfrenta limitações significativas devido à emergência de cepas resistentes, embora os mecanismos subjacentes à falha terapêutica ainda não estejam totalmente esclarecidos (NASCIMENTO *et al.*, 2023; PEREIRA *et al.*, 2021). Adicionalmente, a intensa resposta inflamatória desencadeada por *L. braziliensis* contribui para o agravamento dos danos teciduais e para os desafios no manejo clínico, ressaltando a

necessidade de alternativas terapêuticas mais eficazes e seguras (JOSEPH *et al.*, 2021; LAGO *et al.*, 2018).

Apesar da normatização dos protocolos terapêuticos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), que incluem o uso de antimoniato de meglumina e anfotericina B, falhas no tratamento são recorrentes, especialmente em áreas remotas. Esses desafios envolvem não apenas a resistência medicamentosa, mas também a toxicidade dos fármacos, a dificuldade de acesso e a baixa adesão ao tratamento pelos pacientes, o que resulta em recidivas e piora do controle da doença (BRASIL, 2022). O cenário de crescente resistência aos fármacos reforça a urgência de explorar novas abordagens terapêuticas que possam superar essas limitações e atender melhor as populações afetadas, especialmente nas regiões endêmicas mais vulneráveis.

2.2 NOVOS CAMINHOS PARA O TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

Em 1998, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estipulou algumas exigências para a busca por um fármaco ideal: cura parasitológica de casos agudos e crônicos, ação eficaz com uma única dose ou poucas doses, custo reduzido, poucos efeitos colaterais e ausência de efeitos teratogênicos, hospitalização desnecessária para o tratamento e nenhuma indução a resistência. Porém, na prática, conhecendo as limitações de administração de um fármaco em diferentes condições de campo e diferentes cepas, além da complexidade da pesquisa e do desenvolvimento de um novo fármaco, esses objetivos parecem estar distantes da realidade (BLANCO; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017; GUIDO *et al.*, 2008).

Novos agentes parasitários, de maneira geral, têm-se desenvolvido considerando os seguintes itens: a) o conhecimento de princípios ativos de plantas utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças parasitárias; b) a investigação de fármacos já utilizados para o tratamento de outras doenças, uma vez que já foram submetidos a ensaios clínicos muito dispendiosos; e c) a identificação de alvo específico em via metabólica-chave para o parasito (MELOS; ECHEVARRIA, 2015).

Podem-se citar alguns exemplos bem-sucedidos de reposicionamento de fármacos para o tratamento da leishmaniose visceral, como é o caso da pentamidina e da anfotericina B, utilizados primeiramente para tratar infecções fúngicas, e da miltefosina, desenvolvida para tratamento de câncer de mama (CROFT *et al.*, 2006; RATH *et al.*, 2003; SUNDAR *et al.*, 2002).

Contudo, a fim de que a estratégia aplicada para a prospecção de um fármaco antileishmania tenha início, é necessário buscar alvos bioquímicos relacionados a mecanismos de defesa, metabolismo de RNA, DNA, glicose, esteróis, ácidos graxos, vias das purinas, nucleotídeos ou qualquer rota bioquímica do parasito que possa ser atacada pela molécula e que seja segura para o hospedeiro (FIGUEIREDO *et al.*, 2018).

2.3 O EMPREGO DE ALVOS MOLECULARES NA PROSPECÇÃO DE NOVOS MEDICAMENTOS

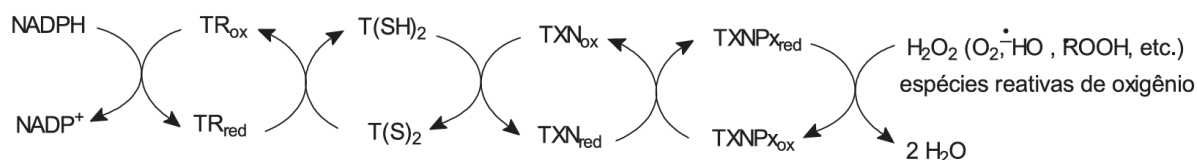
Os avanços na compreensão dos mecanismos moleculares de doenças parasitárias e das características fisiológicas, bioquímicas e genéticas dos parasitos permitiram o desenvolvimento de uma nova estratégia de desenho racional de fármacos, baseando-se nas diferenças estudadas entre o hospedeiro e o parasito, por meio do direcionamento de alvos específicos contra o parasito. São necessárias várias ferramentas biomoleculares para este intento, como a biologia molecular, a bioquímica e a genética (MÜLLER; HEMPHILL, 2016).

Segundo Gómez Garay *et al.* (2025), os alvos moleculares se definem como proteínas ou ácidos nucleicos que possuem atividade biológica relacionada diretamente a um organismo e podem ser suscetíveis à ação de compostos ou moléculas que possam mudar substancialmente sua atividade. Dessa forma, os inibidores são definidos como moléculas capazes de se ligar a um alvo específico, bloqueando sua atividade.

A respeito de alvos moleculares de doenças negligenciadas, os critérios básicos para a seleção dos mesmos são apresentarem-se prioritariamente no agente etiológico e estarem expressos no estágio de vida patogênico para o hospedeiro. Entre os alvos mais estudados presentes nesta família de parasitos, as enzimas do metabolismo tiol-dependente consideram-se entre os mais promissores (MÜLLER; HEMPHILL, 2016; SINGH; SUNDAR, 2012).

Nesse sentido, a busca por alvos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos contra as leishmanioses tem destacado a enzima Tripanotiona redutase (TR) como uma opção promissora. Descoberta em 1985 (FAIRLAMB *et al.*, 1985), a TR é um alvo molecular validado devido ao seu papel relevante na neutralização de espécies reativas de oxigênio dentro do parasito (OLIVEIRA *et al.*, 2008). A enzima, que depende de NADPH, reduz Tripanotiona dissulfeto $[T(S)_2]$ em Tripanotiona ditiol $[T(SH)_2]$, mantendo um ambiente redutor e protegendo o parasito contra o estresse oxidativo (BATTISTA *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Figura 3 – Sequência de eventos, dependentes da TR, responsáveis pela neutralização das espécies reativas de oxigênio



Em que: TR = Tripanotiona redutase; TXN = Triparedoxina; TXNPx = Triparedoxina peroxidase.
Fonte: Oliveira *et al.* (2008, p. 261).

Outro fator que torna a TR um alvo estratégico é sua estrutura distinta em relação à glutathione redutase (GR), enzima equivalente em humanos. Foram registradas diferenças entre as duas estruturas quanto a volume da molécula, carga e distribuição dos bolsões hidrofílicos e hidrofóbicos. No caso da TR, há uma extensa região que permite que a molécula acomode substratos maiores por meio de forças eletrostáticas e de Van der Waals (BATTISTA *et al.*, 2020). Em contraste, a GR apresenta resíduos carregados positivamente que favorecem interações específicas com seus substratos. Essas particularidades estruturais tornam a TR uma candidata apropriada para o desenvolvimento de inibidores seletivos, ampliando as perspectivas para novos tratamentos antiparasitários (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

2.4 ANÁLISE *IN SILICO*: UMA FERRAMENTA IMPORTANTE NA PROSPECÇÃO DE FÁRMACOS

A bioinformática, particularmente por meio da modelagem molecular, tem emergido como uma área interdisciplinar promissora, integrando biologia, ciência da computação, matemática e estatística. Essa abordagem possibilita a análise de sequências genéticas, a exploração de conteúdos genômicos e a previsão de funções e estruturas de macromoléculas. Com o uso de ferramentas computacionais avançadas, é possível conectar dados biológicos e gerar previsões úteis, promovendo avanços significativos em diversas áreas do conhecimento (ASSIS, 2013; BAXEVANIS; OUELLETTE, 2001; DÍAZ, 2019).

As metodologias de modelagem molecular desempenham um papel importante no desenvolvimento de novos fármacos, permitindo a identificação de compostos com maior potencial terapêutico, ao mesmo tempo que otimizam tempo e custos. Essas técnicas ajudam a reduzir o risco associado ao desenvolvimento de medicamentos ao evitar a síntese de moléculas com baixa probabilidade de bioatividade. Além disso, o estudo detalhado dos mecanismos de ação no nível molecular e das interações farmacodinâmicas possibilita o desenho de novas estruturas capazes de se ligarem eficientemente aos seus alvos farmacológicos (DEL CISTIA, 2010).

Tradicionalmente, o desenvolvimento de fármacos envolve a seleção de novas substâncias por meio de processos conhecidos como *screening*, que fazem uso de modelos *in vitro* e *in vivo* com experimentação animal. Essa abordagem tem como objetivo identificar a atividade biológica dos compostos com base em sua interação com receptores celulares. No entanto, esse processo é conhecido por ser longo, caro e de alto risco, o que torna fundamental o avanço de tecnologias que otimizem essa etapa (DEL CISTIA, 2010).

Nos últimos anos, tecnologias de triagem baseadas em modelagem computacional têm ganhado destaque, uma vez que permitem prever interações entre proteínas e ligantes, ampliando a eficiência do design de medicamentos. Apesar dos avanços, prever com precisão essas interações continua sendo um desafio técnico; entretanto, melhorias no rendimento e

na qualidade das predições têm gerado dados cada vez mais confiáveis e úteis para a triagem de candidatos a fármacos (CARAUS *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2011).

Ao combinar técnicas de triagem computacional e conhecimento molecular detalhado, a modelagem molecular tem sido um recurso essencial para o desenvolvimento de novos medicamentos, reduzindo riscos e ampliando as possibilidades de sucesso em contextos terapêuticos.

2.5 BIOPROSPECÇÃO DE FÁRMACOS A PARTIR DO VENENO DE SERPENTES

Os venenos de serpentes são uma combinação de muitas proteínas e enzimas que possuem diversas ações, tanto nas presas quanto em vítimas humanas, cujo principal intuito é afetar os sistemas fisiológicos vitais desses organismos. Essas proteínas desempenham papéis importantes na busca de alimentos pelas serpentes, como matar ou imobilizar presas, e auxiliam no processo de digestão. Contudo, há décadas que pesquisadores estudam essas toxinas e as tornam uma fonte terapêutica para as mais diversas patologias (MORAIS *et al.*, 2012).

Desde a aprovação do Captopril, o primeiro medicamento baseado na proteína do veneno de serpente, há mais de 40 anos, as toxinas do veneno de serpente se tornaram uma valiosa farmacopeia natural de moléculas bioativas que fornecem compostos para o desenvolvimento de novos medicamentos. Muitas toxinas estão sendo exploradas e transformadas em drogas para o tratamento de condições como hipertensão, trombose e câncer (KOH; KINI, 2012).

Os venenos ofídicos são constituídos principalmente por proteínas, peptídeos e, em pequenas proporções, carboidratos, lipídeos, nucleotídeos, aminoácidos e componentes inorgânicos (MACEDO *et al.*, 2023). O Brasil, devido à grande biodiversidade, apresenta um vasto campo para bioprospecção de venenos de serpentes, com destaque para os gêneros *Bothrops* e *Crotalus* (BARROS *et al.*, 2015; MORAIS *et al.*, 2012).

Considerando o potencial desses venenos para a pesquisa e a descoberta de novas biomoléculas, é necessário explorá-los por meio de técnicas de isolamento e purificação, aliadas às ferramentas alternativas como a bioinformática, de modo a ampliar as possibilidades de tratamento das doenças infecciosas e parasitárias, como as leishmanioses (CABRAL, 2011).

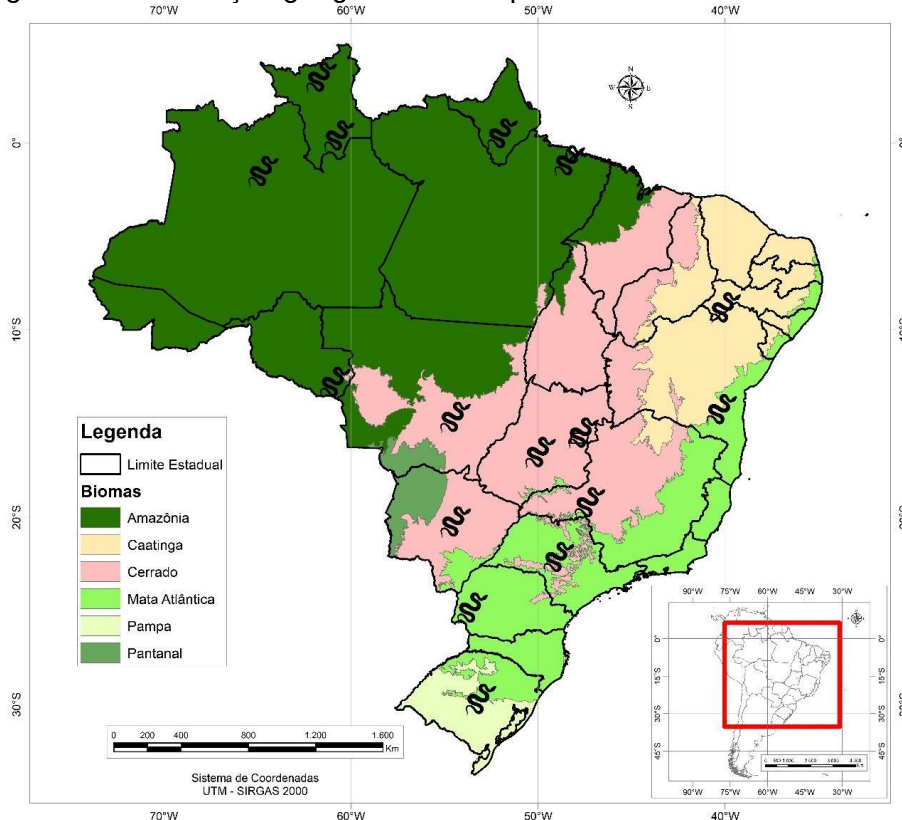
2.6 CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS

A espécie *Crotalus durissus* (*C. durissus*), popularmente conhecida como cascavel, é uma serpente amplamente distribuída, encontrada desde o México até a Argentina, além de toda a América do Sul, com exceção do Chile e Equador (CAMPBELL; LAMAR, 1989).

No Brasil, está presente principalmente nas regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Sul. Até o presente, foram registradas seis subespécies que habitam o território brasileiro e variam conforme a região que ocupam: *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella*, *C. d. marajoensis*, *C. d. ruruima* e *C. d. trigonicus*, sendo estas duas últimas específicas de algumas regiões do estado de Roraima (GEORGIEVA *et al.*, 2010; GUIDOLIN *et al.*, 2013; PINHO; PEREIRA, 2001).

A subespécie mais conhecida é a *C. d. terrificus*, que, além de ser exclusiva da América do Sul, habita quase todo o país. Está distribuída nos estados do Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e em algumas áreas abertas do Norte, nos estados do Amazonas, Pará e Rondônia, conforme a figura 4 (BASTOS *et al.*, 2005; CAMPBELL; LAMAR, 1989; FUSCO *et al.*, 2020). Todavia, não é possível determinar com exatidão a distribuição das subespécies brasileiras de *Crotalus durissus* – em parte, porque as espécies do táxon não estão bem definidas; além disso, os movimentos de antropização abrem caminho para a distribuição e a adaptação das subespécies em áreas diferentes das quais são comumente encontradas (BRITES; BAUAB, 1988; CALDEIRA COSTA; BÉRNILS, 2018; MARQUES *et al.*, 2001; TOZETTI, 2006). Ademais, segundo Georgieva *et al.* (2010), as diferenças filogenéticas entre as subespécies *C.d. cascavella* e *C.d. collilineatus* são tão ínfimas que estas duas podem ser consideradas como a subespécie *C.d. terrificus*.

Figura 4 – Distribuição geográfica da serpente *Crotalus durissus* no Brasil



Destaca-se a maior frequência em biomas com vegetação rasteira, como cerrado, pampa e caatinga. Observa-se a falta de especificação das subespécies nos estados devido às adaptações inter e intra subespécies e falta de estudos detalhados dos táxons.

Fonte: elaborado pela autora (2024).

2.6.1 *Crotalus durissus terrificus*: principais características, comportamento, reprodução e hábitos alimentares

Os primeiros relatos acerca da *C. d. terrificus*, conhecida popularmente como cascavel, boicininga ou maracambóia, foram registrados na obra *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus differentiis, synonymis, locis* (LINNAEU, 1767). São serpentes peçonhentas robustas, com hábitos noturnos, pouco agressivas e pouco ágeis. São conhecidas por apresentarem o guizo ou chocalho (resquício de queratina) na extremidade da cauda. Essa estrutura é formada por anéis ocos e móveis, que produzem um som peculiar ao vibrar, e têm como função alertar para a presença do animal no ambiente, atuando como mecanismo de defesa – associado à posição de cajado, que consiste em levantar e dobrar a cabeça e erguer do chão a porção anterior do corpo (CAMPBELL; LAMAR, 1989). O corpo possui fundo castanho-claro e uma fileira de manchas dorsais em formato de losangos marrons, marginadas por coloração branca ou amarela, conforme a figura 5 (ARGÁEZ, 2006; CAMPBELL; LAMAR, 1989).

Figura 5 – Espécime da serpente *Crotalus durissus terrificus*



Destacam-se losangos brancos e pretos ao longo do corpo, sendo o ventre mais claro. Encontrada em áreas abertas, campos cultivados, áreas devastadas, áreas de mata Atlântica subcaducifólia e matas de Araucária das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste.

Fonte: cortesia de Anderson Maciel Rocha, da Fundação de Medicina Tropical do Estado do Amazonas (2024).

Os machos são geralmente menores que as fêmeas e possuem um comprimento de cauda maior (ARGÁEZ, 2006). As cascavéis são vivíparas e geram, em média, 14 filhotes por ninhada. A fêmea pode armazenar os espermatozóides dos machos durante meses para fertilização dos óvulos, e os ovos são chocados dentro das fêmeas durante três meses após a fertilização. O ciclo reprodutivo destes animais é bianual; a ovulação ocorre entre setembro e outubro, e a gravidez, entre setembro e abril. O nascimento dos filhotes ocorre entre

dezembro e agosto (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997). Não possuem cuidados parentais: após o nascimento, os filhotes vivem de forma independente, e o tempo médio de vida é de 10 a 25 anos (SANTOS *et al.*, 1995). Sua alimentação consiste de pequenos mamíferos e aves, mas ocasionalmente podem se alimentar de pequenos lagartos (HOYOS; ALMEIDA-SANTOS, 2016). Utilizam a estratégia de caça por espreita (*site and wait*), caracterizada por permanecerem paradas próximas aos locais onde há passagem de suas presas (BURGHARDT, 1967; PIANKA, 1966; TOZETTI; MARTINS, 2008). O veneno de *Crotalus durissus* é produzido e armazenado por um par de glândulas salivares especializadas que se encontram atrás dos olhos; a saliva é o próprio veneno. O dente da frente da maxila superior é oco e forma um tubo por onde escorre o veneno. Outra diferença importante é que se trata de uma serpente solenóglifa, o que significa que, ao abrir a boca, tem seu grande aparelho inoculador projetado para frente (MELGAREJO-GIMÉNEZ, 2002; SANTOS *et al.*, 1995). Essas características, aliadas a um veneno potente, tornam os acidentes relacionados a estas espécies uma preocupação para a saúde pública; o único tratamento eficaz é realizado com o soro antiofídico (ROSENFELD, 1991; TASIMA *et al.*, 2020; TEIXEIRA *et al.*, 2014).

2.6.2 Composição do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e os efeitos do envenenamento

Segundo pesquisas, o envenenamento causado pela *C. d. terrificus* causa efeitos neurotóxicos, miotóxicos e coagulopáticos, apresentando ação anti-inflamatória prolongada, cujos sintomas observados são: mal-estar, sudorese, vômitos, sonolência e inquietação (ACOSTA DE PEREZ *et al.*, 1997; MAGALHÃES *et al.*, 1986). Contudo, a peçonha das serpentes tem uma importância muito maior do que o observado nos processos fisiopatológicos envolvidos no envenenamento. O veneno crotálico se apresenta como uma complexa mistura de compostos bioativos com diferentes propriedades funcionais e estruturais, que são atribuídas às ações de vários peptídeos e enzimas fosfodiesterases – L-amino oxidase, 5-nucleotidase – e as seguintes neurotoxinas: convulxina, giroxina, crotoxina e crotamina (CALVETE *et al.*, 2010; FONSECA *et al.*, 2006; HERNÁNDEZ *et al.*, 2007).

2.6.3 Crotoxina e subunidades

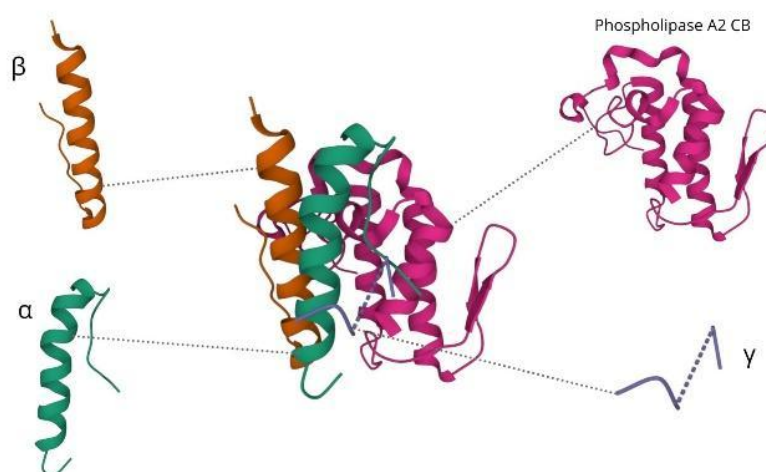
O veneno da *C. d. terrificus* é composto majoritariamente por giroxina, convulxina, crotamina e crotoxina, dentre outros grupos de moléculas bioativas, como serinoproteases, L-aminooxidasas, íons inorgânicos, dentre outras espécies químicas (ALVES; FERREIRA JR., 2022; FREITAS *et al.* 2021; MOHAMED ABD EL-AZIZ *et al.*, 2019). Das proteínas presentes no veneno, a crotoxina representa aproximadamente 60% do peso seco do veneno (FRARE *et al.*, 2019; MACEDO *et al.*, 2023).

A crotoxina é uma beta-neurotoxina heterodimérica, formada pela associação não covalente das subunidades Crotapotina (CA) e fosfolipase A₂ (PLA₂), também chamada de CB (SAMPAIO *et al.*, 2010). Foi inicialmente isolada por Slotta e Fraenkel-Conrat, em 1938 (NEVES *et al.*, 2023).

Vários estudos demonstraram sinergismo entre Crotapotina e PLA₂ e sugeriram que a Crotapotina agiu como uma chaperona para direcionar a PLA₂ ao seu local de ação (RÜBSAMEN *et al.*, 1971), potencializando a atividade biológica da PLA₂ de forma a promover a interação com os sítios de ligação corretos (BON, 1982). Inicialmente conhecida como uma proteína de apoio, a Crotapotina desempenha um papel fundamental na estabilização de outras toxinas presentes no veneno e tem sido extensivamente estudada devido às suas propriedades de ligação a proteínas (BON *et al.*, 1979).

A Crotapotina é uma molécula com característica ácida, não tóxica, com massa de aproximadamente 9,4 kDa que faz parte do complexo heterodimérico da crotoxina (PIMENTA *et al.*, 2019; SILVA-JÚNIOR *et al.*, 2020), juntamente com a PLA₂, básica e fracamente tóxica e com massa de aproximadamente 15 kDa (SLOTTA; FRAENKEL-CONRAT, 1938).

Figura 6 – Estrutura tridimensional do complexo CA e CB



Estrutura tridimensional da crotoxina. Em rosa, é mostrada a subunidade CB e sua respectiva alça de ligação. Em laranja, verde e azul, as cadeias β, α e γ da subunidade ácida CA, respectivamente. Código do PDB – 3R0L.

Fonte: Macedo *et al.* (2023).

A subunidade PLA₂ da crotoxina apresenta em sua conformação sete pontes dissulfeto, assim como possui características estruturais canônicas; os resíduos de 1 a 14 representam a região N – terminal, contém uma alça de ligação nos resíduos 28 a 32 (FAURE *et al.*, 2011). Quanto à subunidade Crotapotina, possui cadeias peptídicas (α, β e γ) conectadas por sete pontes dissulfeto. A cadeia α apresenta uma longa α-hélice nos resíduos 37 a 54 e a cadeia β possui a α-hélice nos resíduos de 89 a 111. A maior diferença entre as

subunidades de acordo com a literatura está no *loop* de ligação de Ca^{2+} , que está localizado nos resíduos de 258 a 32 (FAURE *et al.*, 2011).

Estudos demonstraram propriedades imunomoduladoras da CA, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e a migração de leucócitos para o local da inflamação (CASTRO *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2003; LANDUCCI *et al.*, 1995). Essas propriedades são cruciais no contexto das infecções por leishmanioses, que envolvem uma resposta imunológica desregulada. A habilidade da Crotapotina de modular a resposta imune pode ajudar a controlar a inflamação e a proliferação do parasito *Leishmania*, tornando-a uma candidata promissora para o desenvolvimento de novos tratamentos para a leishmaniose.

Além do potencial anti-inflamatório, estudos recentes também têm revelado atividades analgésicas em modelos animais, levantando a possibilidade de seu uso no tratamento da dor crônica (GARCIA *et al.*, 2003; LANDUCCI *et al.*, 1995; LEME *et al.*, 2002).

2.7 POTENCIAL IMUNOMODULADOR DA CROTAPOTINA EM PBMCs

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* é amplamente estudado por suas propriedades biológicas, incluindo seu potencial imunomodulador sobre células do sistema imune (LIMA *et al.*, 2012). Dentre seus componentes, a crotoxina (CTX) se destaca como um complexo neurotóxico bifuncional, composto por uma fosfolipase A_2 (PLA_2) e pela Crotapotina (CA), subunidade ácida responsável por estabilizar a PLA_2 e modular sua atividade biológica. Embora a CTX tenha sido amplamente caracterizada quanto aos seus efeitos sobre leucócitos, o papel específico da CA nesse contexto ainda não foi elucidado.

Estudos demonstram que a CTX influencia diretamente a resposta imunológica. Miranda *et al.* (2019) avaliaram seus efeitos sobre células dendríticas, demonstrando que a CTX e a PLA_2 , mas não a CA, induzem a produção de interleucina IL-10 em células estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS). Em um estudo subsequente, observou-se que a CTX e a PLA_2 , quando adicionadas a culturas de células dendríticas estimuladas com concanavalina A (ConA) e ovoalbumina/LPS, suprimem a secreção de citocinas pró-inflamatórias, acompanhadas por um aumento significativo na expressão de IL-10 e outras citocinas imunorreguladoras (FREITAS *et al.*, 2021).

Além disso, Xavier *et al.* (2017) investigaram os efeitos do Fator Neutralizante de *Crotalus* (CNF), um inibidor da PLA_2 presente no plasma da serpente *Crotalus durissus terrificus*, sobre PBMCs e neutrófilos humanos. O estudo revelou que o CNF não apresentou citotoxicidade nem induziu a liberação de superóxido (O_2^-) em PBMCs. Quanto à produção de citocinas, não foram detectados níveis significativos de IL-10 e IL-2 nos PBMCs, enquanto nos neutrófilos foi observada liberação de IL-8. De forma complementar, Andrade *et al.* (2019) demonstraram que a CTX apresenta propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e

imunomoduladoras sobre células endoteliais humanas (HUVEC), reduzindo significativamente a produção de IL-6, IL-8 e IL-1 β sem comprometer a viabilidade celular.

Com relação às outras toxinas presentes no veneno de *Crotalus durissus terrificus*, os estudos *in vitro* sobre PBMCs ainda são escassos. Rego *et al.* (2022) avaliaram os efeitos da convulxina, uma lectina do tipo C-like, em PBMCs humanos e observaram que a convulxina induziu a liberação de IL-10, aumentou a produção de ROS e ativou o inflamassoma NLRP3, resultando na liberação de IL-1 β . Esses achados ressaltam o potencial imunomodulador tanto do veneno de *Crotalus durissus terrificus* quanto de componentes desse veneno e destacam a necessidade de mais estudos sobre os mecanismos de ação dessas proteínas.

Embora a crotoxina e suas subunidades já tenham sido avaliadas em diferentes contextos, os efeitos da CA isoladamente ainda são pouco compreendidos. Estudos prévios indicam que a CA pode modular processos inflamatórios, como demonstrado em modelos de edema da pata de rato (LANDUCCI *et al.*, 1995; LANDUCCI *et al.*, 2000), além de estimular a produção de PGE₂ por macrófagos (GARCIA *et al.*, 2003). No entanto, sua ação direta sobre células humanas, especialmente sobre PBMCs, ainda permanece desconhecida.

2.7.1 O papel das citocinas IL-10 e IL-1 β na resposta imune

A resposta imune do hospedeiro desempenha um papel crucial no controle das leishmanioses, especialmente por meio da regulação de citocinas como IL-1 β e IL-10 (FERNÁNDEZ-FIGUEROA *et al.*, 2012). A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória essencial para a ativação inicial da resposta imune, uma vez que facilita o recrutamento de células para o local da infecção e promove a eliminação do parasito *Leishmania* (SANTOS *et al.*, 2018). Em contrapartida, a IL-10 atua como um regulador da resposta inflamatória, prevenindo danos teciduais excessivos e promovendo a homeostase do hospedeiro (ABDOLI *et al.*, 2017). O equilíbrio entre essas citocinas é fundamental para garantir uma resposta eficiente contra o patógeno sem gerar inflamação exacerbada ou imunossupressão prejudicial (LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011).

A IL-1 β é frequentemente associada à ativação do inflamassoma NLRP3, um complexo multiproteico responsável pela detecção de sinais de perigo celular, como estresse oxidativo, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões associados a danos (DAMPs) (MA, 2023).

A ativação do inflamassoma NLRP3 ocorre em duas fases. Inicialmente, estímulos como PAMPs e DAMPs ativam receptores como os TLRs desencadeando a ativação da via do fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B) e induzindo a produção de NLRP3 inativo e das formas precursoras das citocinas pró-inflamatórias, pró-IL-1 β e pró-IL-18. Na segunda fase, o NLRP3 se oligomeriza, recrutando a proteína adaptadora ASC e a pró-caspase-1, o que resulta na ativação da caspase-1 e na conversão das citocinas em suas formas ativas, IL-1 β

e IL-18 (HARRINGTON; GURUNG, 2020; KIHIL *et al.*, 2021). Assim, o inflamassoma NLRP3, ao ser ativado, promove um estado inflamatório que pode ser essencial para a eliminação de patógenos, mas que também pode contribuir para a patogênese de doenças inflamatórias crônicas (KIHIL *et al.*, 2021). Estudos prévios indicam que componentes do veneno de *Crotalus durissus terrificus* podem influenciar essa via.

Conforme demonstrado por Rego *et al.* (2022), a convulxina, uma lectina do tipo C-like, presente no veneno, induziu a ativação do inflamassoma NLRP3 em PBMCs humanos, resultando na liberação de IL-1 β . No entanto, essa mesma toxina também estimulou a produção de IL-10, evidenciando um efeito imunomodulador duplo que pode tanto ativar a resposta inflamatória quanto regulá-la.

Diante desse cenário, os PBMCs representam um modelo experimental relevante para investigar interações imunológicas mediadas por moléculas bioativas, como a CA. Essas células incluem monócitos, linfócitos T, linfócitos B e células NK, isoladas do sangue periférico por técnicas de gradiente de densidade (MAECKER *et al.*, 2012). A utilização dos PBMCs como modelo experimental se deve à sua representatividade da resposta imune sistêmica e à facilidade de manipulação em laboratório (ZHENG *et al.*, 2016). Além disso, essas células são altamente responsivas a estímulos externos, permitindo a análise da produção de citocinas e da ativação de vias bioquímicas relevantes para doenças infecciosas e inflamatórias (DIVENUTO *et al.*, 2023; KIP *et al.*, 2018; MOHAMMADI *et al.*, 2019; MOHAMMADI *et al.*, 2021).

Em função do potencial imunomodulador do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e da relevância dos PBMCs como modelo experimental, torna-se relevante avaliar seus efeitos sobre a produção de IL-1 β e IL-10. Assim, compreender a interação da CA com PBMCs pode fornecer novas informações sobre o potencial imunomodulador do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, assim como um novo mecanismo de ação para a Crotapotina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ESTUDOS *IN SILICO* COM A TRIPANOTONA REDUTASE DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* E CROTAPOTINA DE *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS*

Neste estudo, o modelo estrutural teórico da Tripanotiona redutase (TR) de *Leishmania braziliensis* (ID UniProt: A4H480) em complexo com a crotoxina (ID UniProt: 3R0L) foi gerado utilizando o servidor web AlphaFold 3® (ABRAMSON *et al.*, 2024). Devido ao fato de as simulações serem realizadas com a enzima TRLb homodimérica em sua forma nativa, foi essencial incorporar moléculas de NADPH, FAD e T[S]₂ em seus respectivos sítios de ligação.

Para a validação da estrutura da Tripanotiona redutase de *Leishmania braziliensis* (TRLb), foi utilizado o modelo preditivo gerado pela versão mais recente do AlphaFold 3. A sequência de aminoácidos da TRLb foi submetida ao AlphaFold 3 web server para a predição de sua estrutura tridimensional. A validação da estrutura predita incluiu três etapas principais:

1. **Sobreposição com estrutura cristalográfica:** a estrutura gerada pelo AlphaFold 3 foi sobreposta a uma estrutura cristalográfica previamente resolvida, obtida no Protein Data Bank (PDB), para avaliar a conservação das estruturas secundárias. Essa comparação foi realizada no software UCSF Chimera, destacando as alfa-hélices e pontes dissulfeto.
2. **Avaliação de confiabilidade do modelo:** o AlphaFold 3 gerou um modelo colorido com base na confiabilidade preditiva (pLDDT, sigla em inglês para *predicted Local Distance Difference Test*). Cada resíduo foi classificado em faixas de confiabilidade: muito baixa (<50, vermelho), baixa (50-70, amarelo), alta (70-90, azul claro) e muito alta (>90, azul escuro). Regiões de alta confiabilidade foram priorizadas para análises estruturais posteriores.
3. **Mapa de erro posicional:** um mapa de erro posicional esperado foi gerado pelo AlphaFold 3 para indicar o desvio estimado na posição dos resíduos. Áreas em verde representaram alto grau de confiabilidade, enquanto regiões em branco apresentaram menor precisão.

As análises foram conduzidas com o objetivo de verificar a qualidade do modelo estrutural gerado e identificar possíveis limitações associadas ao preditor. A validação combinada do AlphaFold e da estrutura cristalográfica serviu como base para os ensaios subsequentes de interação proteína-proteína e dinâmica molecular.

Nos ensaios de dinâmica molecular, a configuração do sistema foi conduzida utilizando a ferramenta CHARMM-GUI, posicionando a TRLb dentro de uma caixa de simulação com uma distância de 1,5 nm de cada borda, tomando o átomo mais distante em cada eixo cartesiano como referência. Essa distância garante que a distância mínima entre as moléculas e suas imagens periódicas exceda o limite de interação de Verlet (1,2 nm). A caixa gerada foi

explicitamente solvatada utilizando o modelo de água TIP3P. O pH do sistema foi ajustado para 7,4, com base nos estados de protonação de resíduos ionizáveis e tautômeros de histidina calculados via servidor web APBS. Para neutralizar o sistema, algumas moléculas de água foram substituídas por íons positivos (Na^+) e negativos (Cl^-), distribuídos aleatoriamente na caixa para alcançar uma força iônica de 150 mM. Ligações envolvendo átomos de hidrogênio foram restringidas utilizando o algoritmo LINCS. Além disso, as simulações incorporaram a Repartição de Massa do Hidrogênio (HMR), permitindo um intervalo de integração de até 4 fs (ABRAHAM *et al.*, 2015).

As simulações de dinâmica molecular (DM) foram realizadas utilizando o GROMACS (GAO *et al.*, 2021) e o campo de força CHARMM36m (HUANG *et al.*, 2017). Em seguida, foi realizada a minimização de energia pelo algoritmo do *Steepest Descent*, para eliminar contatos inconsistentes e refinar a camada de solvatação na superfície acessível ao solvente da proteína, reduzindo a energia potencial do sistema para abaixo de 1000 kJ/mol/nm. O sistema foi então equilibrado em um conjunto isocórico-isotérmico (NVT) por 1 ns, gerando velocidades de acordo com a distribuição de Maxwell-Boltzmann com o termostato V-Rescale. Isso foi seguido por um equilíbrio em um conjunto isotérmico-isobárico (NPT) utilizando o barostato de Berendsen a 1 bar (LIN *et al.*, 2017).

Subsequentemente, duplicatas irrestritas de simulações de 100 ns foram conduzidas utilizando o termostato Nose-Hoover (LI *et al.*, 2022; PARRINELLO; RAHMAN, 1980). Interações não ligadas foram calculadas dentro de um raio de 12 Å, utilizando uma função de transição entre 10 e 12 Å. Interações eletrostáticas de longo alcance foram tratadas pelo método de Ewald com malha de partículas. A simulação foi mantida a uma temperatura de 310,15 K e pressão de 1 bar.

Após a simulação, a trajetória foi analisada para extrair medições do desvio quadrático médio (RMSD) da cadeia principal, avaliando a estabilidade. Além disso, foi realizada uma categorização refinada da trajetória pelo método de agrupamento GROMACS (DAURA *et al.*, 1999). Este método foi baseado em um limiar de RMSD de 2 Å para agrupar conformações similares de forma eficaz, equilibrando a necessidade de diferenciação detalhada dos agrupamentos e evitando categorizações excessivamente fragmentadas, garantindo, assim, uma análise abrangente e criteriosa dos dados de trajetória.

3.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA CROTAPOTINA

3.2.1 Do veneno

O veneno da espécie *Crotalus durissus terrificus* utilizado no presente estudo foi obtido no banco de venenos do Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde (CEBio/FIOCRUZ-RO/UNIR). A atividade de acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrada

no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos: CGEN/CNPq 010627/2011-1, IBAMA 27131-2 e CEBio UNIR-FIOCRUZ-RO (registro CGEN A4D12CB e IBAMA/SISBIO 64385-1).

3.2.2 Das análises cromatográficas

Replicatas de 10 mg do pool do veneno seco foram solubilizadas em 1 mL de formiato de amônio a 50 mM, pH 3,5 e centrifugadas a 755 *xg* por 10 minutos. O sobrenadante foi aplicado em coluna Sephadex G-75 (10 x 300 mm) equilibrada com o mesmo tampão de diluição, a um fluxo de 0,8 mL/minuto. As frações foram monitoradas na absorbância de 280 nm, em sistema de cromatografia Akta Purifier 10® (GE Lifescience Healthcare), coletadas e armazenadas em freezer a -20 °C. Após seca, a fração denominada F3, proveniente da cromatografia de gel filtração, foi solubilizada em TFA 0,1% (solução A) e submetida a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em coluna C-18 (25 mm x 4,6 mm, Supelco), previamente equilibrada com a solução A e eluída sob gradiente 0 a 70 % de solução B (acetonitrila 99,9 % e TFA 0,1 %) em 5 volumes de coluna, sob fluxo de 1 mL/min, em sistema de cromatografia Akta Purifier 10® (GE Lifescience Healthcare). A eluição foi monitorada em 280 nm (LAURE, 1975; MACEDO *et al.*, 2025). A fração obtida da cromatografia em fase reversa foi seca e recromatografada em DEAE-Sepharose (10 x 350 mm) em tampão de bicarbonato de amônio 50 mM e pH 8,0.

3.2.3 Dosagem de proteínas

Foi utilizado o Kit DC Protein Assay, BIO-RAD, com a obtenção prévia de uma curva padrão com diluições variadas de BSA (0,125; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,4 mg/mL). O ensaio foi realizado adicionando 5 µL das amostras com 25 µL de solução alcalina de tártaro de cobre (Reagente A) e 200 µL de reagente de Folin diluído (Reagente B) em uma placa de 96 poços seguido de incubação no escuro por 15 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Eon, BioTek) com absorbância de 750 nm. As aferições da amostra foram comparadas com a curva padrão gerada anteriormente. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.4 Eletroforese monodimensional

A eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 % (m/v) e 15% (m/v) na presença de SDS (SDS-PAGE) foi realizada em sistema descontínuo de pH, em condições redutoras com a presença do agente redutor DTT; as amostras analisadas estavam na concentração de 15 µg/mL. A metodologia foi previamente descrita por Laemmli (1970).

3.2.5 Da identificação da proteína por MALDI-TOF2

A amostra foi solubilizada em 100 μ L de 70% acetonitrila e 30% H₂O (1% de TFA), aproximadamente 1,4 mg de amostra. Em seguida, foram retirados 2 μ L da amostra e adicionados diretamente na placa de MALDI; esperou-se a secagem da amostra em temperatura ambiente. Depois disso, foram adicionados sobre a amostra 2 μ L da matriz ionizante, ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico; também se esperou a secagem em temperatura ambiente. O preparo das amostras foi realizado em triplicata. Para calibrar o equipamento, foi utilizado um mix de proteínas padrão na faixa de 700 Da a 3700 kDa. Após secagem das amostras com a matriz, a placa foi inserida no equipamento Autoflex, um espectrofotômetro de massas do tipo TOF/TOF da empresa BRUKER. Para realização da análise, foi utilizado o software FlexControl e, para o tratamento dos dados, foi usado o software flexAnalysis. Para a aquisição de dados, o FlexControl foi configurado inicialmente para um ranger de detecção de massas de 1 kDa até 20 kDa, de acordo com o tamanho das massas das proteínas na amostra. A aquisição dos espectros de massa foi realizada no modo Linear positivo, com adição de 10 mil espectros da amostra analisada. Foi utilizada a supressão da matriz para massas abaixo de 1 kDa. A configuração do equipamento foi: fonte de íon 1 em 19.50 kV, fonte de íon 2 em 18.20 kV e a lente em 7 kV. A energia do laser foi de 70-85%. Para análise dos espectros via software flexAnalysis, foram observados íons na faixa de 1 kDa até 20 kDa.

3.3 EXPRESSÃO RECOMBINANTE E CARACTERIZAÇÃO DA TRIPANOTONA REDUTASE DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*

O gene da TRLb foi inserido no vetor de expressão pET28a(+), adquirido por meio da empresa especializada Fastbio®, contendo etiqueta de poli-histidina. Para replicação plasmidial, este foi submetido à transformação em *E. coli* TG1 e sequente aplicação do QIAprep Spin Miniprep Kit para extração e a concentração determinada por espectrofotometria. Para a expressão, o plasmídeo foi transformado em *E. coli* BL21DE3 eletrocompetente, cultivada em meio de cultura LB suplementado com canamicina 25 μ g/mL até atingir D.O de 0,6 em 600 nm a 38 °C. Na sequência, foi adicionado à cultura o indutor IPTG 1 M, cultivado por 4 h e centrifugado sob refrigeração a 4 °C. Para a lise celular, foi adicionada lisozima 100 mg/mL e aplicada sonda ultrassônica com amplitude de 40% por 10 minutos (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e novamente centrifugada. O sobrenadante foi submetido à purificação por cromatografia de afinidade com resina de Ni²⁺, sendo utilizados sistemas tamponados (TRIS 20 mM, pH 8,0) contendo diferentes concentrações de imidazol (10 mM para o equilíbrio da coluna, 30 mM para lavagem e 500 mM para eluição) com fluxo de 1 ml/minuto, monitorado em 280 nm. A concentração proteica foi determinada por espectrofotometria utilizando o kit DC Protein Assay. A fração coletada foi submetida a

eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12,5% em condições redutoras, conforme Laemmli (1970).

3.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DA CROTAPOTINA

O cálculo do percentual de inibição foi realizado através da equação:

$$100 \times \left(\frac{a}{b} \right) = \text{Atividade (\%)} \quad (5)$$

Sendo que “a” representa o valor de absorbância na presença do composto teste, e “b” representa o valor de absorbância na ausência do composto de teste. A atividade inibitória da Crotapotina sobre a LbTR foi determinada através da medida da metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀). Os valores de IC₅₀ foram calculados utilizando o modelo de regressão não linear disponível no programa GraphPad Prism 9.4:

$$y = \frac{100}{\left(\frac{1+x}{IC_{50}} \right)} \quad (6)$$

O ensaio de inibição enzimática foi realizado pré-incubando a enzima com as toxinas em várias concentrações, de 100 µM a 200 µM por 5 minutos antes da adição de T[S]₂. O controle, sem qualquer inibidor, foi considerado como 100% de atividade enzimática. As condições da reação foram mantidas em 300 µL de volume final contendo a enzima (0,04 µM) na presença de tampão HEPES 40 mM e EDTA 1 mM a pH 7,5, NADPH 0,15 mM, DTNB 25 µM, DMSO < 0,1% e 1 µM T[S]₂. O aumento da absorbância a 412 nm foi monitorado durante um período de 20 minutos a 28 °C.

3.5 ENSAIOS *IN VITRO* COM FORMAS AMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

Parasitos da espécie *L. amazonensis* (cepa IFLA/BR/196/PH-8) foram obtidos de lesão de hamsters infectados experimentalmente e cultivados em meio Schneider's e as formas promastigotas estocadas em freezer a -70 °C – autorização CEUA (IFLA/BR/1967/PH8).

Para transformação em formas amastigotas axênicas e realização dos ensaios, as formas promastigotas foram descongeladas e cultivadas em meio Schneider's pH 7,2 a 26 °C. Após sete dias de cultivo, quando as promastigotas entram na fase estacionária, a cultura foi centrifugada por 10 minutos a 1000 RCF, ressuspensa em meio Schneider's pH 6,0 e incubada a 32 °C. A mudança de pH propiciou a transformação das formas de promastigotas para amastigotas. Após sete dias de cultivo nessas condições, foram obtidas cerca de 90% de formas amastigotas. Com este procedimento, obteve-se reprodutibilidade no protocolo de

transformação e evitaram-se variações a que podem estar sujeitos parasitos submetidos a repiques múltiplos de cultivo. A anfotericina B (AMB) foi usada como droga leishmanicida controle na concentração 0,2 µg/mL.

3.5.1 Ensaio de citotoxicidade por MTT

Os ensaios foram realizados em duplicata, utilizando-se placas de microcultivo de 96 poços. Em cada poço-teste foram adicionados 90 µL de cultura na concentração de 1×10^8 parasitos/mL e 10 µL da Crotapotina na concentração de 20 µg/mL. Aos poços do controle negativo, adicionaram-se 100 µL de cultura na mesma concentração; no controle positivo, adicionaram-se 90 µL de cultura e 10 µL de AMB na concentração de 0,2 µg/mL; no controle de DMSO, adicionaram-se 90 µL de cultura e 10 µL de DMSO a 1% em água de injeção. Como branco, utilizaram-se apenas 100 µL de meio de cultivo. As placas foram incubadas por 72 h em estufa a 32 °C. Após este período, 10 µL de MTT (metil tiazol) 5 mg/mL foram adicionados a cada poço. Decorridas 4 h de incubação, adicionaram-se 100 µL de SDS (lauril sulfato de sódio) 10% em isopropanol 50% para interrupção da reação colorimétrica do MTT. Após 30 minutos à temperatura ambiente, procedeu-se à leitura no leitor de placas no comprimento de ondas de 570 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de morte após 72 h de incubação. O cálculo da porcentagem de morte foi realizado com base na fórmula abaixo, onde Abs é a média das densidades ópticas:

$$\% \text{ morte} = [(Abs \text{ Cn} - Abs \text{ Ex}) / Abs \text{ Cn}] \times 100$$

3.6 ENSAIOS DE IMUNOLOGIA CELULAR

3.6.1 Comissão de ética

O presente trabalho foi submetido à análise da comissão de ética em pesquisa do Centro de Pesquisas em Medicina Tropical (CEPEM) e aprovado para sua execução, sob registro do CEP número 70668423.2.0000.0011.

3.6.2 Isolamento de PBMCs humanos

O sangue foi doado por 18 voluntários, autodeclarados saudáveis, que não fizeram uso de nenhum medicamento nas últimas 48 h. Foram coletados 36 mL de sangue em tubos de coleta a vácuo contendo heparina. Os PBMCs foram isolados pelo método de gradiente de densidade conforme descrito por Rego *et al.* (2022) usando Histopaque 1077 (Sigma Aldrich). O sangue foi suspenso em Histopaque na proporção de 1:1 e submetido à centrifugação a

400 × g por 30 minutos. A nuvem branca de PBMCs foi suavemente aspirada e assepticamente transferida para tubos de centrifuga estéreis. Os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm por 5 minutos para obtenção das células; após centrifugação, o pellet de células contendo os PBMCs foi lavado três vezes com tampão fosfato salino (PBS) 1X e cultivado em meio de cultura RPMI estéril 1640 suplementado com 100 µg/mL de gentamicina, 2 mM de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino (FBS). Alíquotas dos PBMCs isolados foram usadas para determinar o número total de células utilizando câmara de Neubauer, após coloração celular (1:20, v/v) com solução de Turk 0,1% (Sigma Aldrich).

3.6.3 Ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo

Os PBMCs humanos foram isolados conforme item 3.6.2. e 1×10^6 células foram ressuspensas em RPMI suplementado com gentamicina (100 µg/mL), L-glutamina (2 mM) e 10% de soro fetal bovino em microtubos, com um volume final de 200 µL. Os PBMCs foram estimulados com RPMI (controle negativo), paraformaldeído (PFA) 4% (controle positivo), PMA (500 ng/mL), LPS (1 µg/mL), nigericina (15 µg/mL), apocinina (1 µg/mL), disulfiran (2 µg/mL) e Crotapotina (5 e 10 µg/mL) durante 1, 3, 48, 72 e 96 h. Após o tempo de incubação, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD3 (PE), antiCD-14 (PB450) e 7-Aminoactinomicina D (7AAD) durante 20 minutos. Os PBMCs foram adquiridos em citômetro de fluxo (*Cytoflex S - Beckman&Coulter*) com 50.000 eventos e analisados pelo software *FlowJo X*. Células tratadas com PFA 4% foram utilizadas como controle positivo para o ensaio. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software GraphPad Prism 8.0.

3.6.4 Quantificação de lactato desidrogenase

Os sobrenadantes foram coletados após estímulos realizados conforme o item 3.6.3, e armazenados a -20 °C para a quantificação de lactato desidrogenase (LDH) utilizando o kit LDH Liquiform (LABTEST, BRASIL), de acordo com as instruções do fabricante. As leituras de absorbância foram realizadas utilizando o espectrofotômetro BioTek Synergy HT Multi-Detection (Winooski, VT) com comprimento de onda de 340 nm. Os resultados foram expressos em U/L.

3.6.5 Determinação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por espectrofotometria

Uma suspensão de PBMCs (2×10^5) obtida por isolamento e ressuspensão em solução de Hanks (1,26 mM CaCl_2 ; 5,33 mM KCl; 0,44 mM KH_2PO_4 ; 0,50 mM MgCl_2 ; 138 mM NaCl; NaHCO_3 4,0 mM; 0,30 mM Na_2HPO_4 ; 5,60 mM $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) foi colocada em placas pretas para quantificação de ROS por fluorescência. Os PBMCs foram então incubados a 37 °C em

atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ com solução de Hanks (controle negativo), PMA 500 ng/mL (grupo controle positivo) ou Crotapotina (5 e 10 µg/mL, grupo experimental). Após 1,5 h e 3 h de incubação, foram adicionados 100 µL de uma solução contendo a sonda fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFDA) em 10 µM, diluída em solução de Hanks seguida de incubação por 30 min a 37 °C no escuro. A leitura foi realizada com excitação de 485 nm e absorbância de 528 nm em um espectrofotômetro (Synergy HT, Biotek). Os dados foram expressos como absorbância (PIRES *et al.*, 2017).

3.6.6 Determinação da produção de ROS por citometria de fluxo

O DCFDA foi utilizado para medir os níveis intracelulares de ROS por citometria de fluxo. Para este ensaio, 1x10⁶ de PBMCs foram ressuspensos em RPMI sem vermelho de fenol, e as células foram incubadas com RPMI (controle negativo), PMA (500 ng/mL; controle positivo) ou Crotapotina (5 e 10 µg/ mililitros) durante 1 h e 3 h. Após incubação, 100 µL de DCFDA (10 µM), diluídos em PBS, foram adicionados em cada condição experimental e incubados por 30 minutos a 37 °C, ao abrigo da luz. Em seguida, a marcação da superfície celular foi realizada com anticorpo monoclonal PerCP anti-CD3 humano ou PE anti-CD14 humano, incubados por 30 minutos em gelo e protegidos da luz. Os PBMCs foram lavados com PBS para remover anticorpos não ligados, e as células adquiridas utilizando o citômetro de fluxo Cytoflex S (100.000 eventos). As análises foram realizadas utilizando o software FlowJo X (BD), e os resultados foram expressos em porcentagens.

3.6.7 Preparo de lâminas para imunofluorescência

Os PBMCs (4x10⁵ células/lamínula), isolados conforme item 3.6.2, foram incubados com RPMI (controle negativo), LPS (1µg/mL), nigericina (15 µg/mL) e Crotapotina (5 e 10 µg/mL) por 30 minutos. Após incubação, as células foram adicionadas em lamínulas previamente tratadas com poli-L-lisina durante 15 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com tampão de lavagem PAB (PBS, 5 mg/mL de BSA e 0,5 mg/mL de azida de sódio) e fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4% por 20 minutos. As células foram novamente lavadas e incubadas com 20 uL de acetona P.A. durante 5 minutos para completa permeabilização da membrana, e lavadas novamente com PAB, durante 5 minutos, para reidratar. Em seguida foram adicionados 300 µL de solução de bloqueio (PAB + 10% de SFB) por 1 h, e, após mais uma etapa de lavagem, iniciou-se a etapa de marcação com anticorpos específicos. As células foram marcadas com os anticorpos primários: Goat anti IL-1β (AF-401-N-A) R&D (1:200) e Rabbit anti-GSDMD (G7422) SIGMA (1:100) overnight a 4 °C. Posteriormente, as células foram lavadas e foram adicionados os seguintes anticorpos

secundários: Donkey anti-goat FITC (705-095-147) Jackson ImmunoResearch (1:200) e Goat anti-rabbit Cy5 (A10523) Thermo (1:200) por 1 h em temperatura ambiente.

As lamínulas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem PAB, e foram então incubadas com solução de Faloidina-Alexa Fluor 647 (Invitrogen) (diluída 1:40 em PBS 1X) por 30 minutos. Após esse período, foi realizada nova lavagem com tampão PAB, seguida de incubação com DAPI (Sigma) (diluído 1:100 em PBS 1X) por 15 minutos. Por fim, as lamínulas foram lavadas uma vez com tampão PAB, montadas em lâminas com Fluoromount™ (Sigma), armazenadas em geladeira ao abrigo da luz e, posteriormente, analisadas em microscópio confocal a laser Eclipse Ti – AX. Os filtros utilizados foram: DAPI (azul – núcleo celular); IL- β (verde); Faloidina-Alexa Fluor 546 (vermelho) e gasdermina (GSDMD, rosa).

3.6.8 Quantificação de citocinas por EIA

Para este ensaio, 2×10^5 PBMCs ressuspensos em meio de cultura RPMI foram incubados com RPMI (controle negativo), LPS (1 $\mu\text{g/mL}$; controle positivo) e Crotapotina (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) a 37 °C em atmosfera umidificada (5% CO_2) por períodos de 1 h, 2 h e 4 h (para IL- 1 β) e períodos de 6 h, 12 h, 24 h e 48 h (para IL-10). Após a incubação, as células foram centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos e o sobrenadante coletado foi utilizado para a quantificação dos níveis de IL-10 e IL-1 β , por imunoensaio enzimático específico (EIA) de acordo com as instruções do fabricante (*BD OptEIA Human ELISA Set Cat.n.555157*) para quantificação de IL-10 e (*R&D Systems Cat. n. DY201 lote n. P180575*) para IL-1 β . Os resultados foram expressos em pg/mL de cada citocina.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

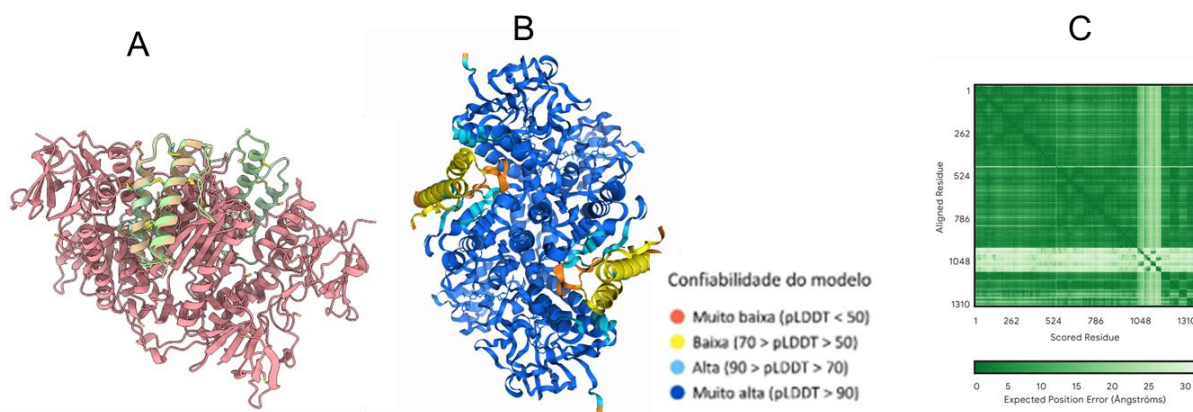
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad 8.0 Prism. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de ANOVA, seguido do teste posterior de Tukey e de Dunnet, onde foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 DOCAGEM MOLECULAR E DINÂMICA MOLECULAR

O modelo estrutural apresentado foi gerado utilizando a versão mais recente do AlphaFold 3, considerando não apenas a interação proteína-proteína, mas também todas as condições de protonação em pH fisiológico, além da presença dos cofatores FAD e NAD. A estrutura predita pelo AlphaFold 3 foi sobreposta à estrutura cristalográfica previamente resolvida, evidenciando um alto grau de conservação das estruturas secundárias, como alfa-hélices e pontes dissulfeto (figura 7). A sobreposição revelou que as estruturas principais da TRLb (representada em rosa) e da Crotapotina (representada em verde na predição do AlphaFold 3) foram amplamente preservadas, com diferenças observadas apenas em uma alça específica da Crotapotina. O AlphaFold 3 também forneceu indicadores de confiabilidade do modelo (pLDDT), com regiões apresentando confiabilidade variada, conforme demonstrado na coloração do modelo tridimensional e no mapa de erro esperado.

Figura 7 – Validação do modelo estrutural da interação entre TRLb e Crotapotina gerado pelo AlphaFold 3

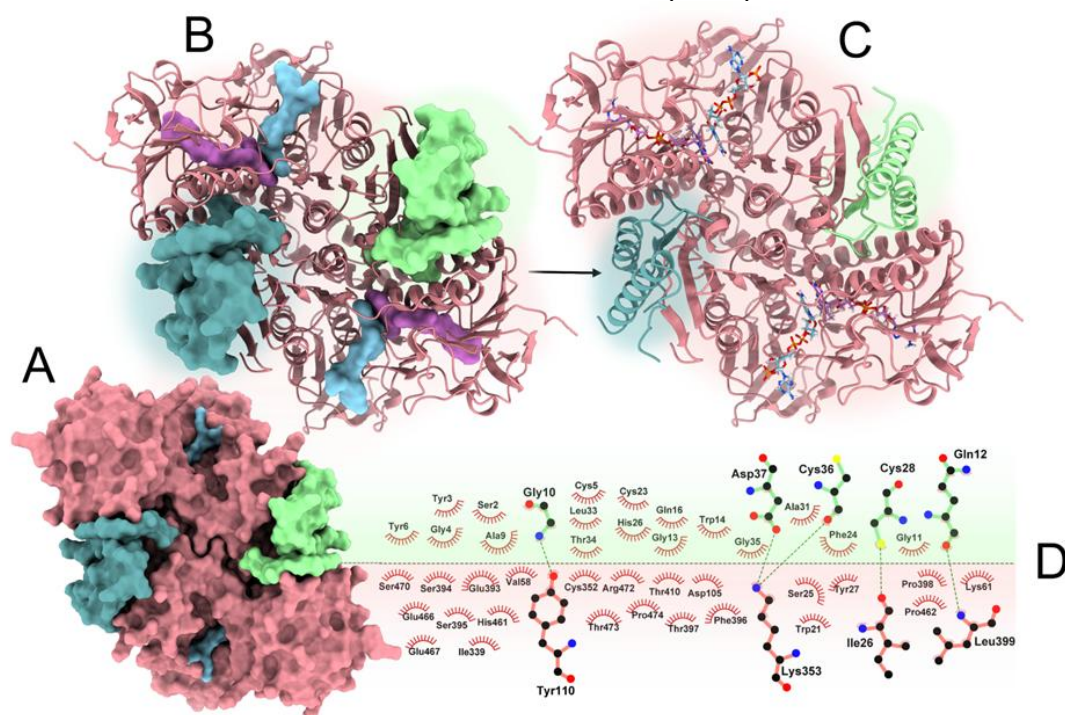


Representação do modelo estrutural gerado pelo AlphaFold para a interação entre a TRLb e a Crotapotina, considerando todas as condições de protonação em pH fisiológico, bem como a presença dos cofatores FAD e NAD. (A) Sobreposição da estrutura cristalográfica da TRLb (rosa) com a estrutura gerada pelo AlphaFold (verde). As estruturas secundárias, incluindo alfa-hélices e pontes dissulfeto, foram conservadas, com variação observada apenas em uma alça da Crotapotina. (B) Modelo tridimensional colorido pela confiabilidade do preditor AlphaFold (pLDDT): regiões com confiabilidade muito baixa (<50, vermelho), baixa (50-70, amarelo), alta (70-90, azul claro) e muito alta (>90, azul escuro). (C) Mapa de erro esperado da posição dos resíduos gerado pelo AlphaFold. Regiões em verde indicam alto grau de confiabilidade na posição dos resíduos, enquanto áreas em branco mostram menor confiabilidade.

O complexo obtido contendo um dímero de TR e duas moléculas de Crotapotina (CA) (figura 8) foi utilizado na geração dos arquivos de entrada para as simulações de dinâmica molecular. A TR é um homodímero com dois sítios ativos idênticos, formados pelos resíduos do domínio FAD e alguns resíduos da interface de cada subunidade da TR. A fenda de ligação

ao substrato está presente na interface do dímero, uma vez que os aminoácidos do sítio ativo são contribuições de ambas as unidades (ALI *et al.*, 2022).

Figura 8 – Previsão de ligação da Crotapotina à Tripanotona redutase de *Leishmania braziliensis* (TRLb)



O modelo representa a TRLb (em salmão) como um homodímero com a Crotapotina (em verde pálido e azul acinzentado) ligada em ambos os sítios ativos. (A) Representação de superfície mostrando o posicionamento espacial da Crotapotina em relação aos sítios ativos da TRLb. (B) Modelo em fita do dímero da TRLb, com FAD, NAD e Crotapotina representados como superfícies, indicando uma possível obstrução no acesso ao substrato. (C) Modelo em fita do dímero da TRLb complexado com FAD, NAD e Crotapotina. (D) Mapa de interações destacando os principais resíduos na interface TRLb-Crotapotina, com ligações de hidrogênio representadas por linhas pontilhadas verdes e interações hidrofóbicas como projeções vermelhas.

A simulação de dinâmica molecular (DM) da TRLb em complexo com a Crotapotina, realizada em duplicatas ao longo de 100 ns, foi avaliada para determinar a estabilidade da interação e o panorama conformacional do complexo. As análises de desvio quadrático médio (RMSD) da Crotapotina-A, da Crotapotina-B e da TRLb foram usadas como principais indicadores de estabilidade, enquanto uma análise de *clustering* foi empregada para identificar as conformações estruturais predominantes do complexo.

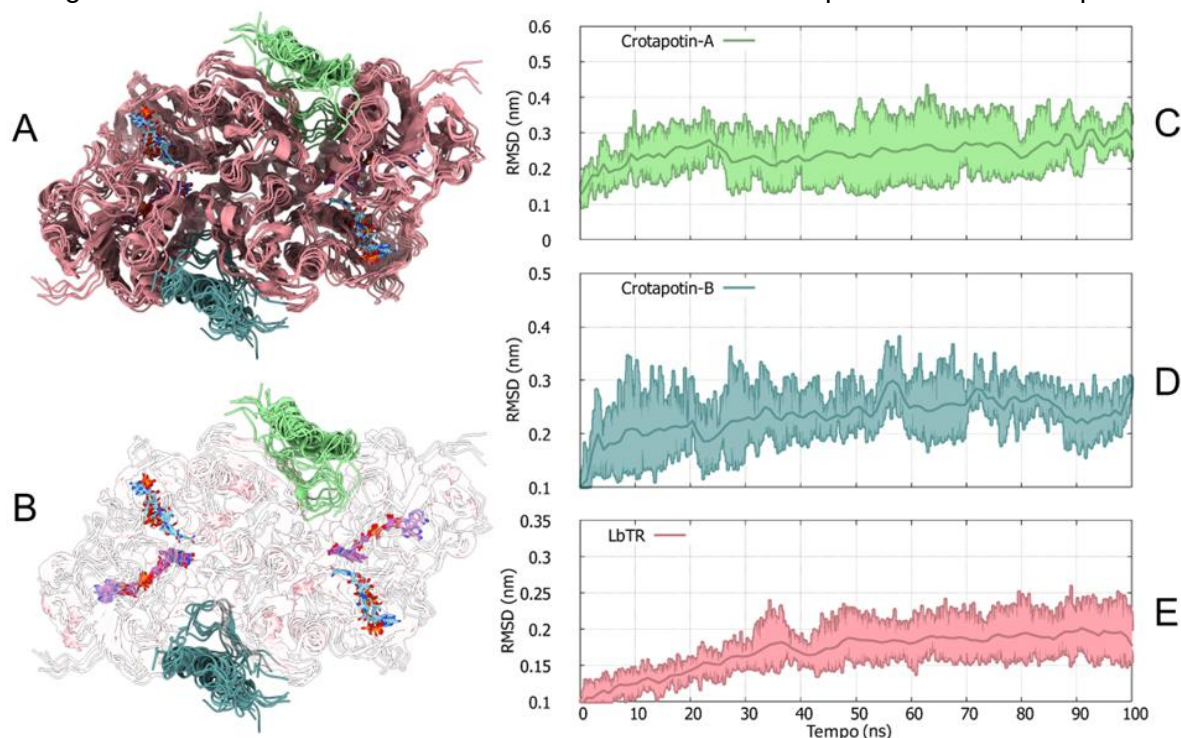
Os perfis de RMSD (painel direito da figura 9) indicam uma ligação estável de ambos os monômeros de Crotapotina (A e B) à TRLb durante toda a simulação. Crotapotina-A e Crotapotina-B apresentaram valores médios de RMSD em torno de 0,3 nm, com apenas pequenas flutuações, sugerindo um engajamento estável com as regiões dos sítios ativos da TRLb. A TRLb, por sua vez, manteve um RMSD próximo de 0,25 nm, evidenciando a integridade estrutural da enzima na presença da Crotapotina ligada. Esses resultados implicam que a Crotapotina não induz distorções estruturais significativas na TRLb, reforçando seu potencial como um parceiro de ligação estável.

Para caracterizar melhor a dinâmica estrutural, foi realizada uma análise de *clustering* na trajetória concatenada das simulações (200 ns), utilizando o método de *clustering* GROMACS – o que resultou em 12 *clusters* distintos. Os cinco *clusters* mais populados são exibidos no painel esquerdo da figura, representando as estruturas centrais para cada um desses estados conformacionais. O *cluster* 1 foi o mais populado, compreendendo 3.398 frames, com um RMSD médio de 0,189 nm em relação à estrutura centroid, sugerindo que este *cluster* representa a conformação estável dominante do complexo TRLb-Crotopotina. *Clusters* 2 e 3, com 3.384 e 1.427 frames, respectivamente, também mantiveram baixos valores médios de RMSD (0,193 nm e 0,183 nm), indicando alta similaridade estrutural e estabilidade entre as conformações amostradas durante a simulação.

Os *clusters* 4 e 5, embora menos populados, também apresentaram valores relativamente baixos de RMSD (0,182 nm e 0,173 nm), contribuindo com configurações adicionais estáveis para o conjunto conformacional do complexo. A presença desses *clusters* intimamente relacionados, com pequenas variações de RMSD, destaca a estabilidade estrutural e a resiliência da interação TRLb-Crotopotina em condições fisiológicas.

A distribuição e a estabilidade desses *clusters* sugerem que o complexo TRLb-Crotopotina existe predominantemente em algumas conformações altamente semelhantes, com a Crotopotina consistentemente ligada de forma a não perturbar a estrutura geral da TRLb. Essa ligação estável sugere que a Crotopotina se associa efetivamente aos sítios ativos da TRLb, atuando potencialmente como um inibidor estruturalmente estável.

Figura 9 – Análise de estabilidade e conformacional do Complexo TRLb – Crotopotina

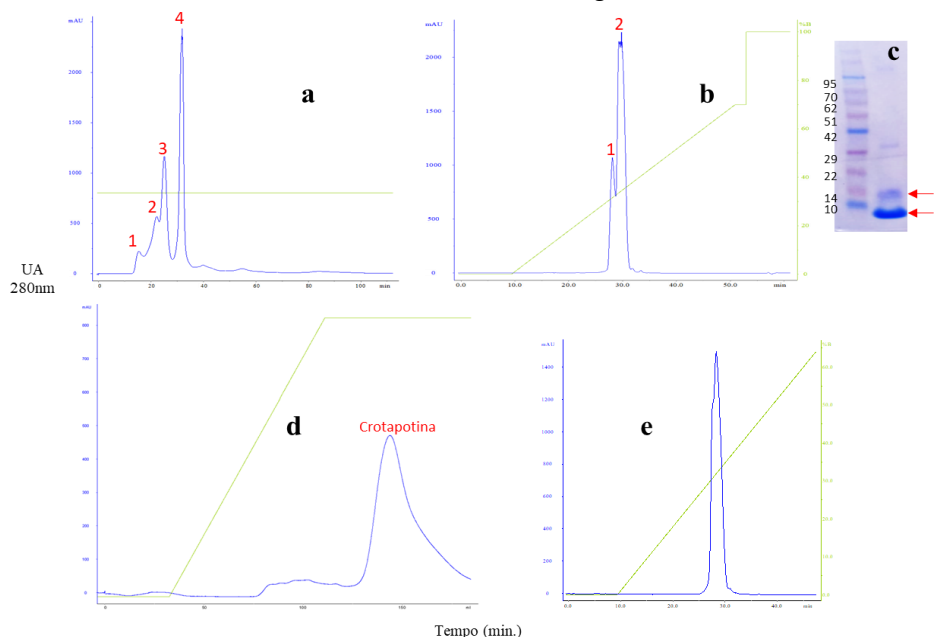


Modelo em fita da TRLb (salmão) com duas moléculas de Crotopotina (verde pálido e azul acinzentado) ligadas aos sítios ativos. Os cinco centros de *clusters* mais populados, extraídos da trajetória concatenada das duplicatas de 100 ns, estão sobrepostos para ilustrar a diversidade conformacional da TRLb (A) e o comportamento estrutural da Crotopotina, juntamente com os cofatores FAD e NADPH da TRLb (B). Perfis de RMSD mostrando a estabilidade estrutural da Crotopotina-A (C), Crotopotina-B (D) e TRLb (E). Os valores de RMSD indicam que a Crotopotina se estabiliza em torno de 0,3 nm, e a TRLb, em torno de 0,25 nm, corroborando uma ligação estável e mínimas mudanças conformacionais ao longo do período de simulação. Cada gráfico destaca as curvas de RMSD para ambas as duplicatas (linhas laterais), traçadas em torno de seus respectivos valores médios (linhas centrais), com cores correspondentes à legenda de cada gráfico.

4.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DA CROTOPOTINA

Para a purificação da Crotopotina, subfigura “a”, foi empregada uma sequência cromatográfica iniciada pela cromatografia de exclusão molecular em resina Superdex G75. Observou-se a eluição de quatro frações, conforme descrito na literatura, sendo o terceiro pico sugestivo para a crotoxina. Esta terceira fração foi recromatografada em coluna de fase reversa e, diferente do perfil descrito na literatura, não foi observada a separação entre a Crotopotina e a PLA₂, subfigura “b”. Esta fração foi recromatografada em coluna DEAE Sepharose e foi observada a separação da Crotopotina, subfigura “d”. Em função da alta concentração do tampão bicarbonato de amônio presente na amostra, esta foi recromatografada em fase reversa, apresentando um pico purificado da Crotopotina, subfigura “e”. Na figura 10 são apresentados os perfis cromatográficos obtidos em cada etapa.

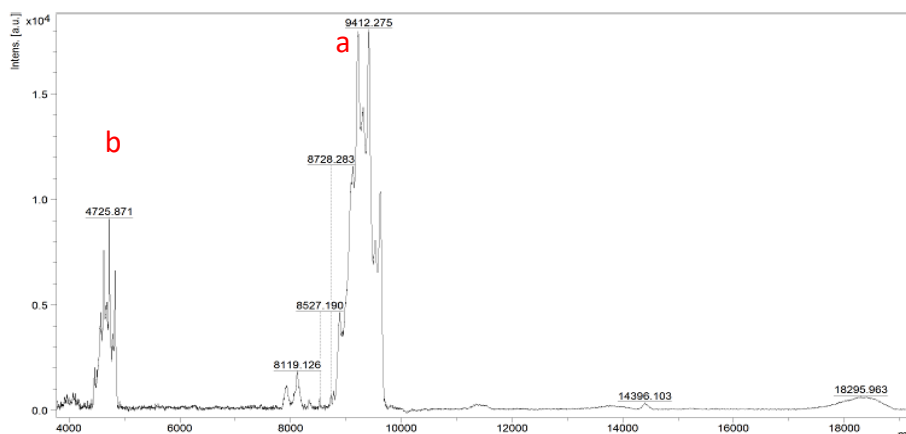
Figura 10 – Perfil cromatográfico da crotoxina e Crotapotina em diferentes técnicas cromatográficas



As figuras “a”, “b”, “c”, “d” e “e” apresentam os perfis de fracionamento cromatográfico para obtenção da Crotapotina. No eixo X, o tempo é medido em minutos; no eixo Y à direita, a concentração do eluente B; e no eixo Y à esquerda, a densidade óptica expressa em AU (280 nm). No inserto “c”, está o SDS-PAGE das frações após RP-HPLC. (a) Perfil cromatográfico do pool de veneno de *Crotalus durissus terrificus*, mostrando quatro frações rotuladas de a1 a a4. O terceiro pico (A3) foi sugestivo de crotoxina. (b) Perfil da fração a3 re-cromatografada em uma coluna C18. As subunidades CA e CB não foram isoladas. (c) A fração foi recromatografada em uma coluna DEAE Sepharose, onde um único pico sugestivo de Crotapotina foi observado. (d) Perfil sugestivo de Crotapotina após recromatografia em uma coluna C18.

O próximo passo envolveu a determinação das sequências de peptídeos e a realização de análise por espectrometria de massa MALDI-TOF2. Por não possuir sequência N-C-terminal, os gaps da Crotapotina foram alinhados e mostraram homologia significativa com as sequências de cadeias peptídicas de *Crotalus durissus terrificus*, corroborando a identidade da proteína isolada. Na identificação por MALDI-TOF2, o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico foi utilizado como matriz de ionização para identificar a molécula isolada como Crotapotina. O espectro de massa gerado (figura 11) revelou um pico principal com m/z de aproximadamente 9412, correspondente à Crotapotina isolada, e um pico secundário em aproximadamente 4735, relacionado ao íon duplamente carregado ($m/z2$). O cromatograma e o espectro de massa confirmam a presença e a identidade da proteína analisada.

Figura 11 – Espectrometria de massa MALDI-TOF2 da Crotapotina

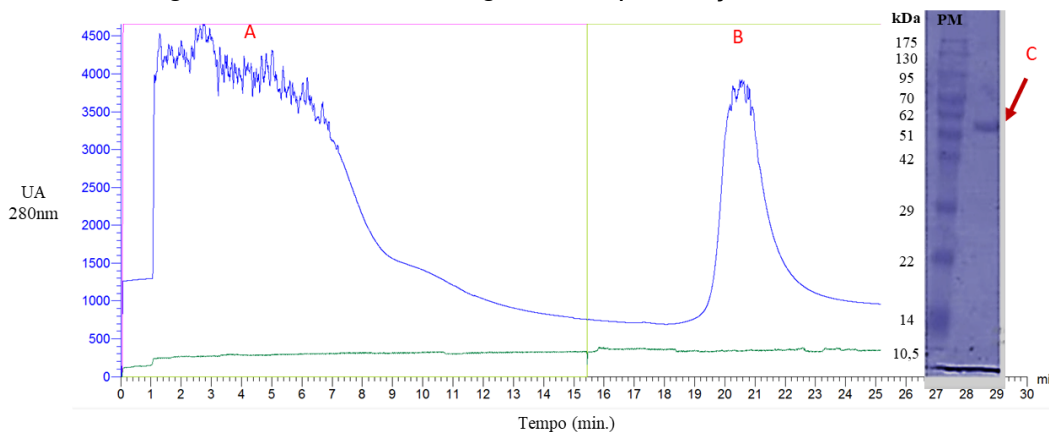


Espectro de massa obtido por MALDI-TOF2, utilizando ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico como matriz de ionização. O espectro apresenta um pico principal com m/z de aproximadamente 9412 (a). À esquerda, observa-se outro pico em aproximadamente 4735 (b), correspondente ao íon com carga dupla (m/z^2).

4.3 EXPRESSÃO RECOMBINANTE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA TRLb

A cromatografia de afinidade em resina de níquel Ni-NTA apresentou dois picos. O primeiro foi constituído de todo o material que não apresentou interação com a fase estacionária, sendo definido como “lisado bacteriano” (Pico A), e o segundo, denominado TRLb, constituído pelo material que ficou retido na coluna e teve a sua eluição ocasionada após a inserção de 100% do tampão de eluição imidazol 500 mM (Pico B).

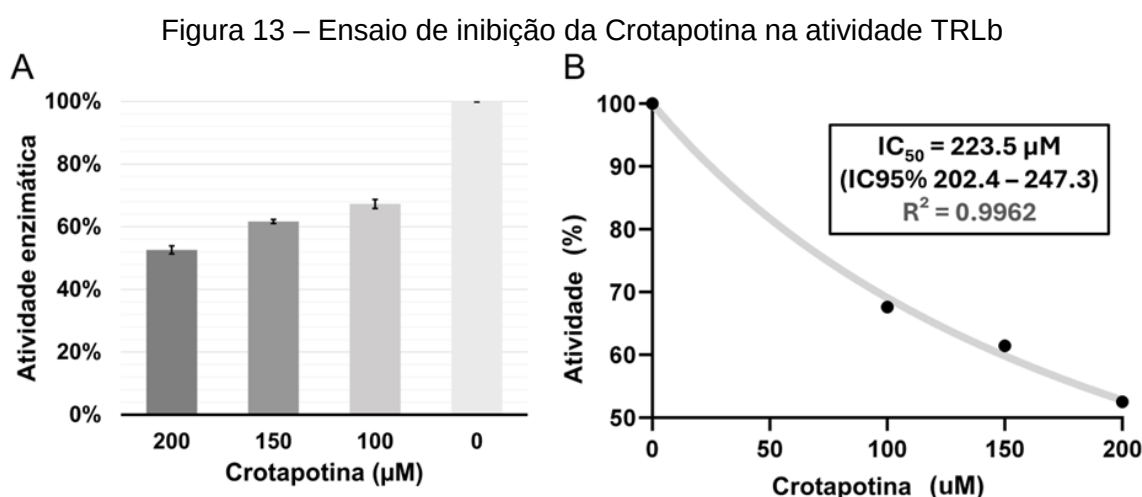
Figura 12 – Perfil cromatográfico da purificação da TRLb



Perfil cromatográfico correspondente ao fracionamento do produto da expressão recombinante proveniente da cromatografia de afinidade com resina Ni-NTA após 4 h de indução. No eixo X, o tempo medido em minutos e, no eixo Y à esquerda, a densidade óptica expressa em UA (280 nm). A linha verde corresponde à concentração da solução tampão B, contendo 500 mM de imidazol. A fração A (0-16 min) corresponde ao material sem afinidade com a resina. A fração B (19-23 min) corresponde ao material eluído após aumento da concentração de imidazol (imidazol 500 mM). No inserto, SDS-PAGE 12,5% em condições desnaturantes, sendo: (PM) Padrão de massa molecular. Raia (1) Fração proveniente da cromatografia de afinidade sob condições redutoras, apresentando massa molecular relativa de 54 kDa.

Em função do observado, constata-se que a primeira fração é proveniente do lisado bacteriano e a segunda fração é composta pela Tripanotona redutase recombinante, fato este comprovado pela eletroforese monodimensional realizada com a respectiva fração, onde é possível observar uma banda com aproximadamente 54 kDa (Inserto C) correspondente a sua forma monomérica, valor semelhante ao descrito na literatura de outras TRs (CLARK, 2001; MATADAMAS-MARTÍNEZ *et al.*, 2019; SARAVANAMUTHU *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2014).

A atividade inibitória da Crotapotina sobre a Tripanotona redutase recombinante de *Leishmania braziliensis* (TRLb) foi avaliada por meio de ensaios em microplacas com diferentes concentrações da proteína (0, 100, 150 e 200 μM). Os resultados, apresentados na figura 13, mostram uma inibição parcial e dependente da concentração, com uma redução progressiva da atividade residual da TRLb à medida que a concentração de Crotapotina aumenta. A análise da resposta à dose determinou um IC_{50} de 223,5 μM ($\text{IC}_{95\%}$: 202,4 – 247,3), indicando que concentrações relativamente elevadas de Crotapotina são necessárias para alcançar 50% de inibição da TRLb. O ajuste da curva revelou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9962, demonstrando a confiabilidade dos dados obtidos.



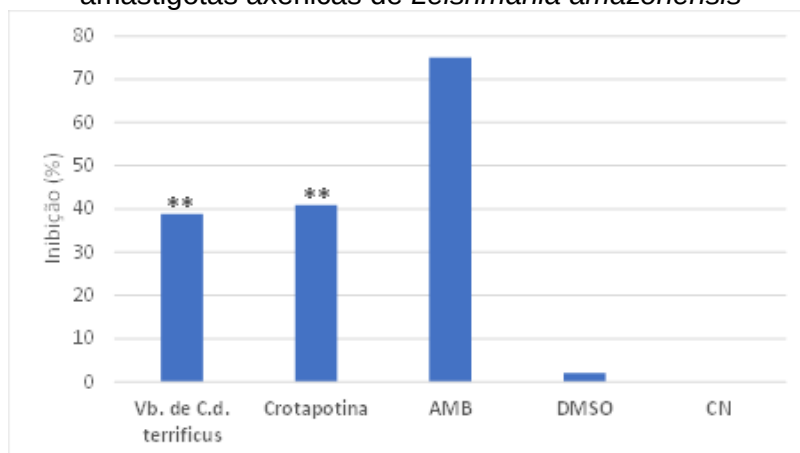
Gráficos dos ensaios de inibição da atividade enzimática da Tripanotona redutase recombinante de *Leishmania braziliensis* (TRLb) pela Crotapotina. (A) Porcentagem de atividade enzimática (Atv%) observada em diferentes concentrações de Crotapotina (0, 100, 150 e 200 μM), indicando inibição dependente da dose. (B) Curva de ajuste para determinação do IC_{50} , com valor estimado de 223,5.

4.4 INIBIÇÃO DAS AMASTIGOTAS AXÊNICAS

Os resultados mostram que o veneno demonstrou atividade inibitória de aproximadamente 39% sobre o crescimento das amastigotas de *Leishmania amazonensis* quando comparado ao controle anfotericina B (AMB), um medicamento conhecido por sua eficácia contra parasitos. Isso indica que o veneno contém componentes que podem afetar negativamente o crescimento do parasito. Além disso, a Crotapotina, isolada do veneno de

Crotalus durissus terrificus, também exibiu atividade inibitória significativa, com aproximadamente 41% de inibição do crescimento das amastigotas, conforme figura 14.

Figura 14 – Atividade inibitória da Crotapotina sobre formas amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*



Efeito inibitório da Crotapotina sobre o crescimento da amastigotas de *Leishmania amazonensis*. As células foram incubadas com 20 µg/mL (2,25 µM de Crotapotina) em pH final de 6.7 a 32 °C; após uma semana de tratamento, foi realizado o ensaio MTT. A anfotericina B (AMB) foi o controle positivo (0.216 µM). A análise estatística utilizando o teste ANOVA One-Way apresentou valor significativo de $p < 0,000$ em relação ao controle negativo (CN).

A análise estatística realizada, utilizando o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via, revelou um valor de $p < 0,0001$. Esse valor indica uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos testados, reforçando a eficácia tanto do veneno bruto quanto da Crotapotina na inibição do crescimento do parasito.

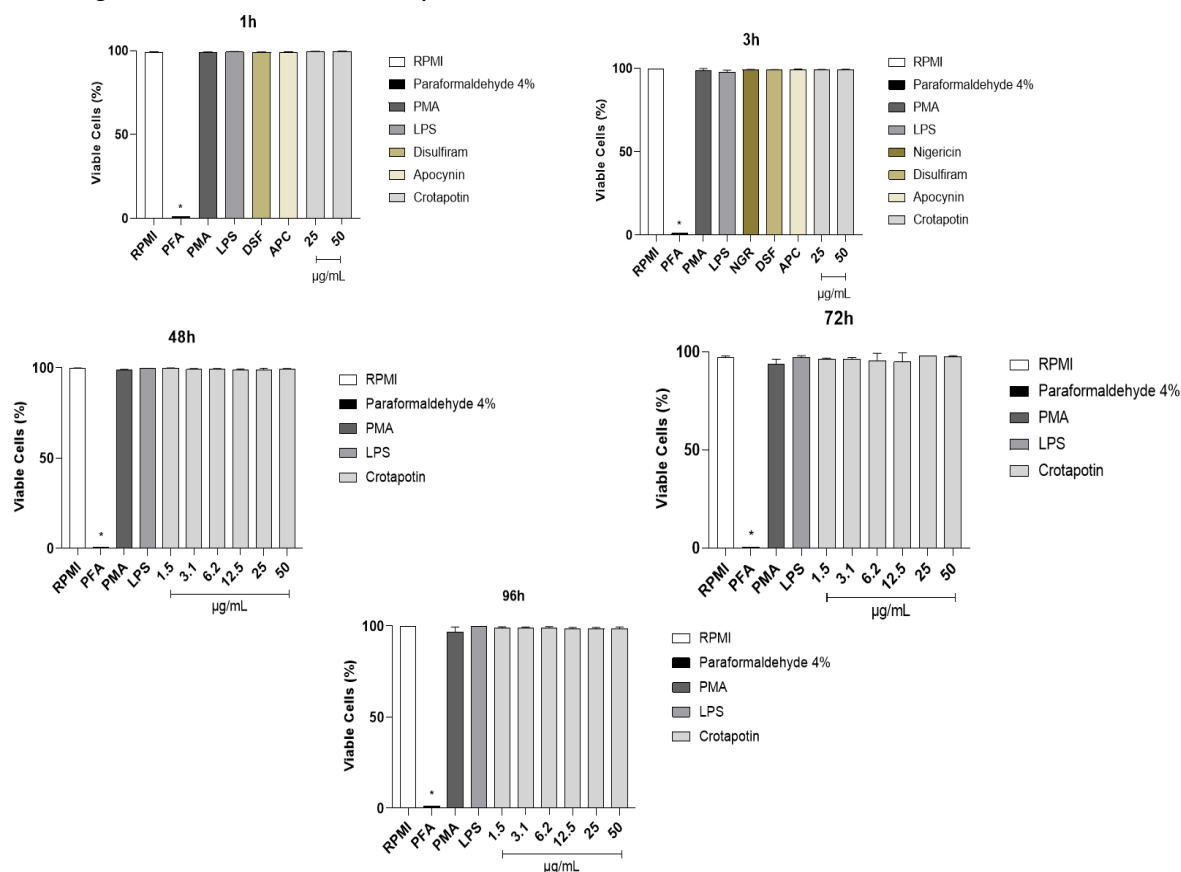
4.5 ENSAIO DE VIABILIDADE DE PBMCs POR CITOMETRIA DE FLUXO

A avaliação da viabilidade celular é essencial na análise de novos compostos bioativos, especialmente em modelos como os PBMCs. Neste estudo, as células foram tratadas com Crotapotina (CTP) nas concentrações de 1,5 a 50 µg/mL, com e sem inibidores (disulfiran – inibidor da formação de poros de gasdermina e apocinina – inibidor de NADPH oxidase), por diferentes tempos (1 h, 3 h, 48 h, 72 h e 96 h), utilizando 7AAD para detecção de morte celular por citometria de fluxo (figura 15).

Os dados demonstraram que, independentemente da concentração ou do tempo de exposição, não houve aumento significativo na permeabilidade de membrana em relação ao controle negativo (RPMI). Somente o PFA 4% (controle positivo) apresentou diferença estatística ($p < 0,05$). Isso evidencia que a Crotapotina não compromete a integridade das membranas celulares de PBMCs humanos, mesmo em altas concentrações e períodos prolongados de exposição.

Esses achados corroboram os resultados de LDH, discutidos na próxima seção, e diferem do perfil observado nas amastigotas de *Leishmania amazonensis*, onde houve inibição parcial do crescimento parasitário. O baixo impacto citotóxico da Crotapotina em PBMCs, associado à sua ação seletiva sobre o parasito, reforça seu potencial para aplicações terapêuticas com segurança imunológica.

Figura 15 – Efeito da Crotapotina sobre a viabilidade celular de PBMCs humanos



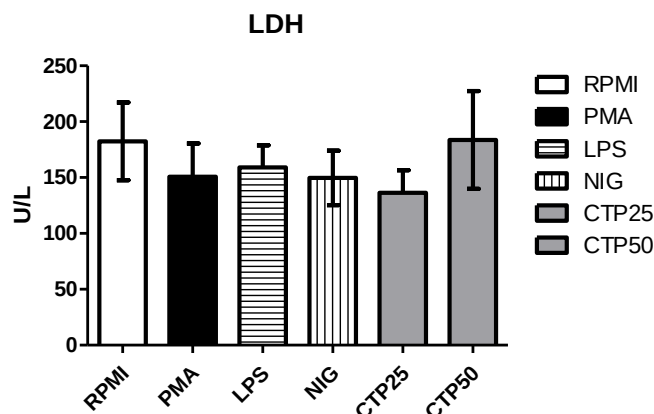
Os ensaios foram realizados nas condições RPMI (controle negativo), PFA 4% (controle positivo) e Crotapotina (50 e 25 µg/mL). Os dados representam a média de tres doadores independentes.

4.6 PRODUÇÃO DE LDH

O ensaio de liberação de LDH foi utilizado como marcador adicional de citotoxicidade. PBMCs tratados com Crotapotina (25 e 50 µg/mL) apresentaram níveis de LDH semelhantes ao controle negativo (RPMI), com ausência de liberação enzimática significativa. Nem mesmo os estímulos com PMA e LPS alteraram o padrão de liberação da enzima (figura 16).

Estes resultados confirmam a ausência de dano à membrana celular, demonstrando que a Crotapotina, mesmo em doses elevadas, não induz necrose ou lise celular. Os dados reforçam o perfil seguro do composto em células humanas, sendo consistentes com os testes de viabilidade celular da figura 15.

Figura 16 – Ensaio bioquímico de LDH



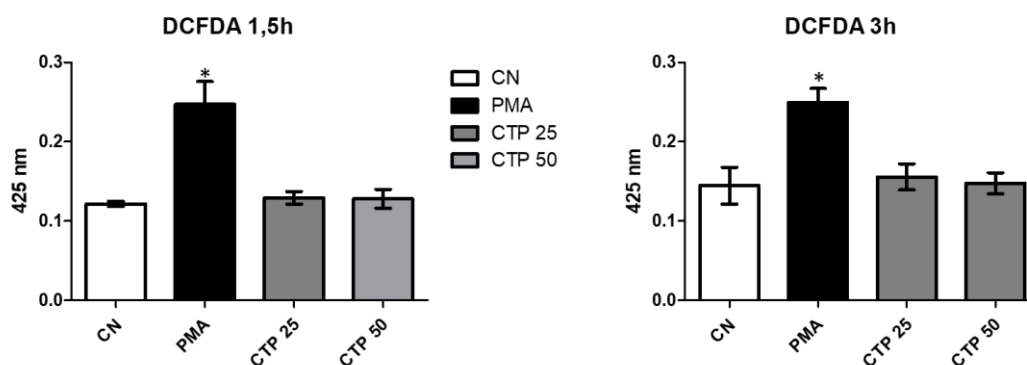
O sobrenadante das incubações de PBMCs foi coletado para a quantificação de LDH liberado por espectrofotometria. Os dados foram representados em U/L.

4.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ROS POR DCFDA

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi avaliada com o corante DCFDA em dois tempos (1,5 h e 3 h), nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de Crotapotina. Não houve aumento estatisticamente significativo da fluorescência relativa em comparação ao controle negativo (RPMI), enquanto o controle positivo (PMA) apresentou aumento esperado (figura 17).

A ausência de indução de ROS indica que a Crotapotina não gera estresse oxidativo notável em PBMCs, ao contrário de compostos que ativam vias inflamatórias ou citotóxicas. Esses dados são coerentes com os ensaios de LDH e viabilidade, sugerindo que a proteína não desencadeia lesões intracelulares por via oxidativa.

Figura 17 – Ensaio de DCFDA



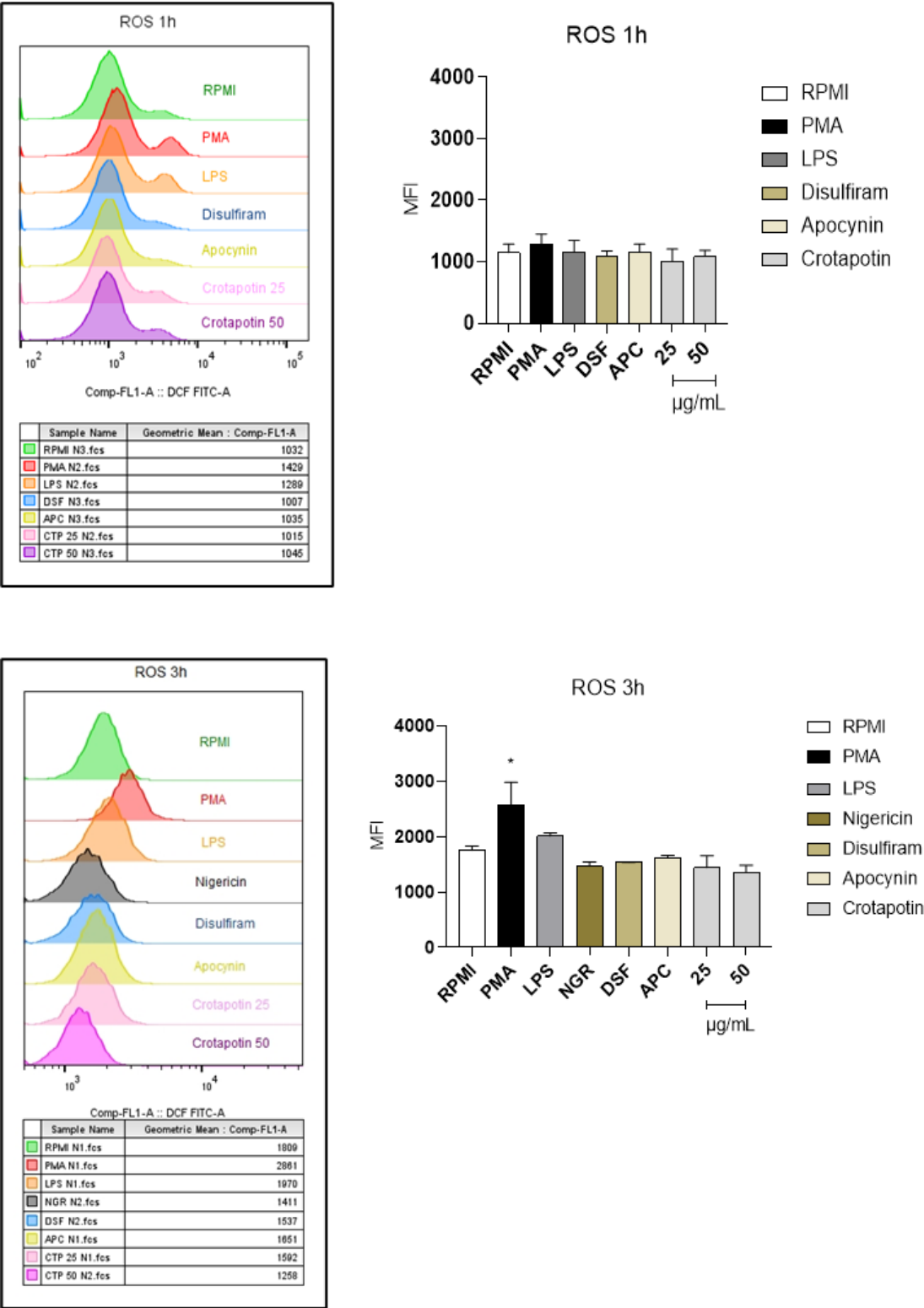
O ensaio de dosagem de ROS foi realizado com PBMCs humanos (2×10^5) de três doadores diferentes (3 Ns) estimulados com RPMI (controle negativo), PMA (1 $\mu\text{g/mL}$; controle positivo), Crotapotina na concentração de 25 ou 50 $\mu\text{g/mL}$ por 1,5 h e 3 h a 37 °C e 5% de CO_2 . Os valores são a média e o erro padrão de três doadores. * $p < 0,05$ em comparação com o controle negativo (os dados foram apresentados com ANOVA seguido de pós-teste de Dunnett).

4.8 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ROS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Complementando o ensaio anterior, a produção intracelular de ROS foi quantificada por citometria em subpopulações CD3⁺ e CD14⁺ (figura 18). O tratamento com Crotapotina (25 e 50 µg/mL) não induziu aumento de ROS em nenhum dos tempos analisados. Inibidores como disulfiran e apocinina reduziram os níveis de ROS nos grupos estimulados com LPS e nigericina, confirmando sua atividade.

Esse resultado reforça que a Crotapotina não ativa mecanismos inflamatórios mediados por estresse oxidativo. Comparando com os dados de ativação de inflamassoma por nigericina, que provoca aumento robusto de ROS, a Crotapotina apresentou perfil mais regulador, o que é interessante para propostas imunomoduladoras.

Figura 18 – Produção de ROS intracelular, mensurado por citometria de fluxo



A determinação de ROS em 1×10^6 células CD3+ e CD14+ com DCFDA foi quantificada por citômetro de fluxo seguido de estimulação com RPMI sem vermelho de fenol (controle negativo), PMA (500 ng/mL; controle positivo), LPS (1 µg/mL), nigericina (10 µg/mL), disulfiran (15 µg/mL), apocinina (15 µg/mL) e Crotopotina (25 e 50 µg/mL). O ROS foi determinado em PBMCs após a adição de DCFDA (10 µM), e a fluorescência do DCF foi determinada no citômetro de fluxo Cytoflex S (Beckman Coulter). Os resultados foram expressos em % de células produtoras de ROS e representam a média $\pm$ SEM de 3 doadores. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo (os dados foram apresentados com ANOVA seguida de pós-teste de Tukey).

4.9 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

A análise morfológica por imunofluorescência demonstrou que os grupos tratados com Crotapotina mantiveram a integridade do citoesqueleto (Faloidina) e do núcleo (DAPI), sem evidências de condensação ou fragmentação nuclear, características típicas de apoptose. Esse achado reforça os dados de viabilidade e LDH, indicando que a Crotapotina não induz morte celular por apoptose ou necrose.

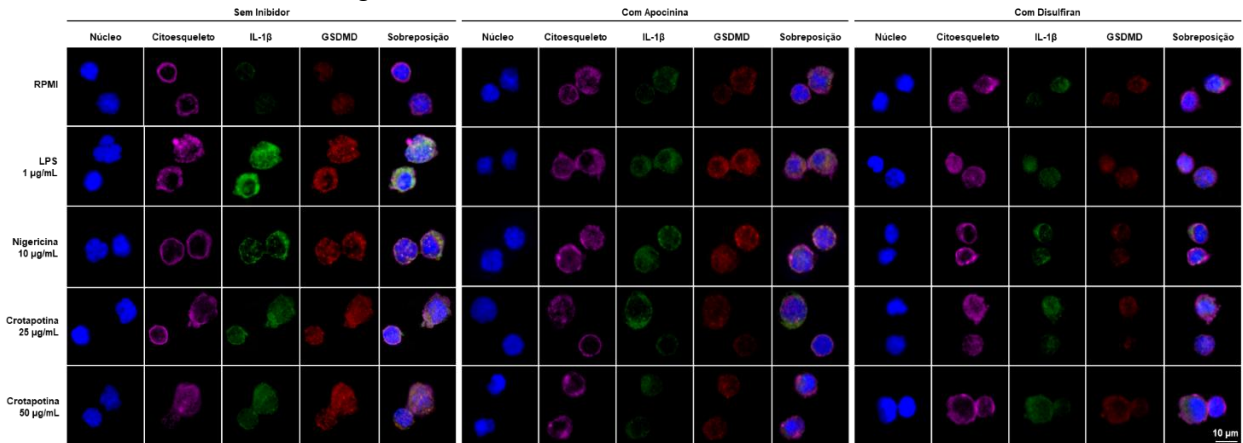
Nos grupos tratados com nigericina (controle positivo para ativação do inflamassoma NLRP3), foi possível observar a reorganização citoplasmática, associada ao aumento da expressão de gasdermina D (GSDMD) e IL-1 β , marcadores clássicos da piroptose e inflamação (figura 19). A coloração mais intensa nesses grupos evidencia a formação de poros e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, corroborando o papel da nigericina como potente ativador do inflamassoma.

Por outro lado, nos grupos tratados com Crotapotina, mesmo nas concentrações mais elevadas, a expressão de GSDMD e IL-1 β foi significativamente menor em relação ao grupo estimulado com nigericina. Quando combinada com os inibidores disulfiran (bloqueador da formação de poros via GSDMD) ou apocinina (inibidor da NADPH oxidase), observou-se uma redução ainda mais acentuada desses marcadores (figura 20). Tal efeito sinérgico reforça a hipótese de que a Crotapotina atua como um agente modulador da ativação do inflamassoma, especialmente da via mediada por NLRP3.

Este padrão é consistente com os dados dos ensaios de ROS, LDH e citocinas, que apontam para um perfil regulador da Crotapotina, capaz de interferir em vias inflamatórias sem desencadear danos estruturais ou morte celular significativa. Ao modular positivamente a expressão de IL-10 e restringir a ativação exacerbada do inflamassoma, a Crotapotina demonstra potencial para uso terapêutico em cenários de inflamação descontrolada.

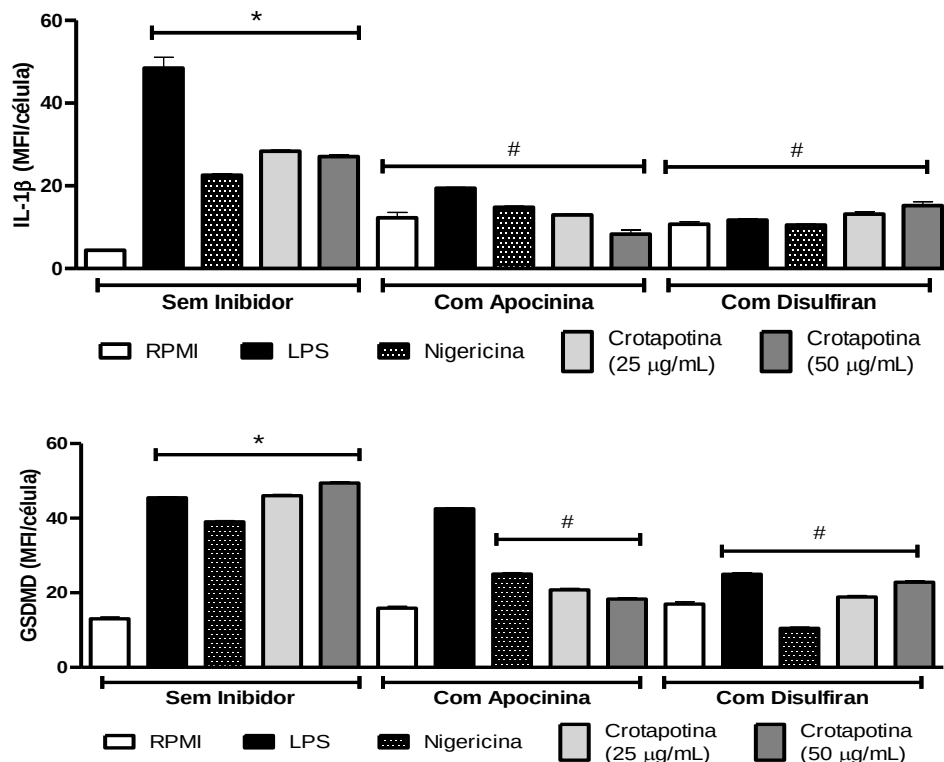
Além disso, o fato de a modulação ser observada tanto na presença quanto na ausência de inibidores sugere que a Crotapotina pode agir de forma independente – ou complementar – às vias clássicas de controle da piroptose.

Figura 19 – Ensaio de imunofluorescência



Os PBMCs humanos (2×10^5) foram incubados com RPMI (controle negativo), LPS (1 $\mu\text{g/mL}$; controle positivo), nigericina (ativador de NLRP3) a 10 $\mu\text{g/mL}$ e Crotopotina (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) em três condições: sem inibidor; com disulfiran, inibidor da formação de poros de GSDMD (15 $\mu\text{g/mL}$); e com apocinina, inibidor de NADPH oxidase (15 $\mu\text{g/mL}$). Foram utilizados anticorpos primários (Goat anti IL-1 β e Rabbit anti-GSDMD) e anticorpos secundários (Donkey anti-goat FITC e Goat anti-rabbit Cy5). O marcador Faloidina-Alexa Fluor 647 foi utilizado para coloração do citoesqueleto e o núcleo foi corado com DAPI. As observações foram feitas para determinar a expressão e a localização dessas moléculas sob diferentes condições de tratamento.

Figura 20 – Análise estatística do ensaio de imunofluorescência

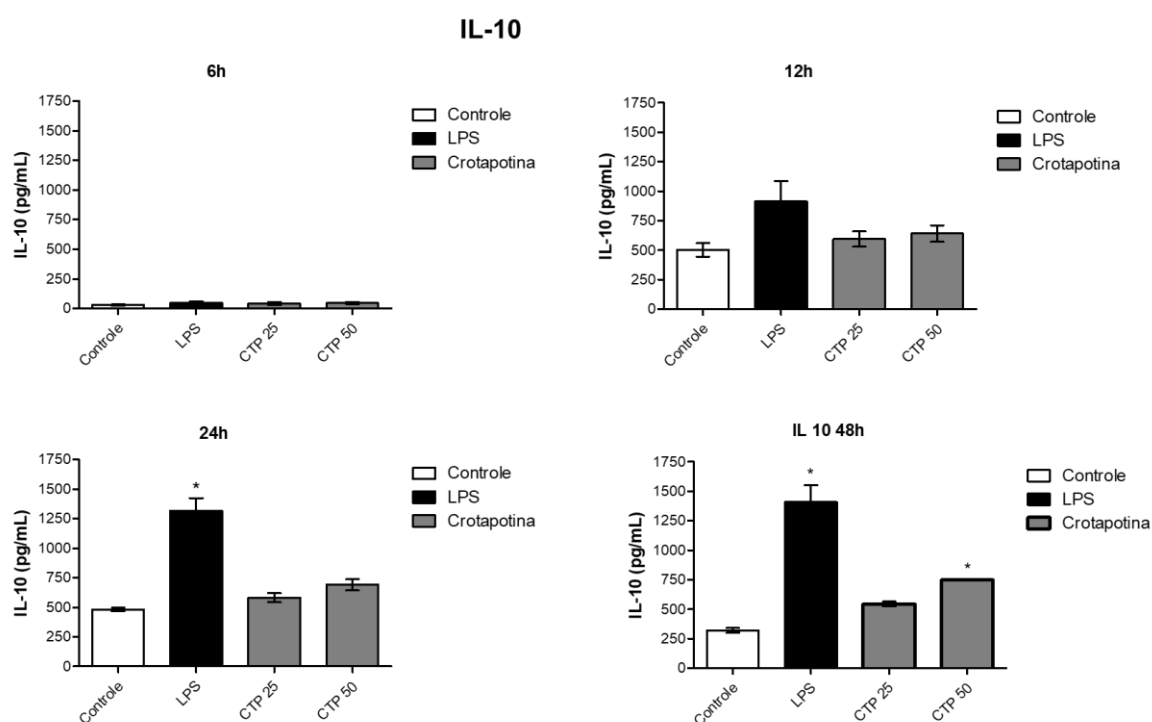


As análises foram realizadas por imunofluorescência após 1 h de incubação com Crotopotina (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$), na presença ou ausência dos inibidores disulfiran (inibidor da formação de poros mediados por GSDMD) e apocinina (inibidor da NADPH oxidase). Os grupos-controle incluíam meio RPMI (negativo), LPS + nigericina (positivo) e LPS isolado. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da densidade óptica relativa dos marcadores fluorescentes. A Crotopotina reduziu significativamente a expressão de IL-1 β e GSDMD quando comparada ao grupo positivo (nigericina), especialmente quando combinada com os inibidores, indicando uma possível interferência na ativação do inflamassoma e na formação de poros inflamatórios. A resposta foi dose-dependente para ambas as proteínas, sob diferentes condições de tratamento. * indica $p < 0.05$ em comparação ao controle. # indica $p < 0.05$ em comparação entre grupos tratados.

4.10 LIBERAÇÃO DE IL-10 E IL-1 β ATRAVÉS DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

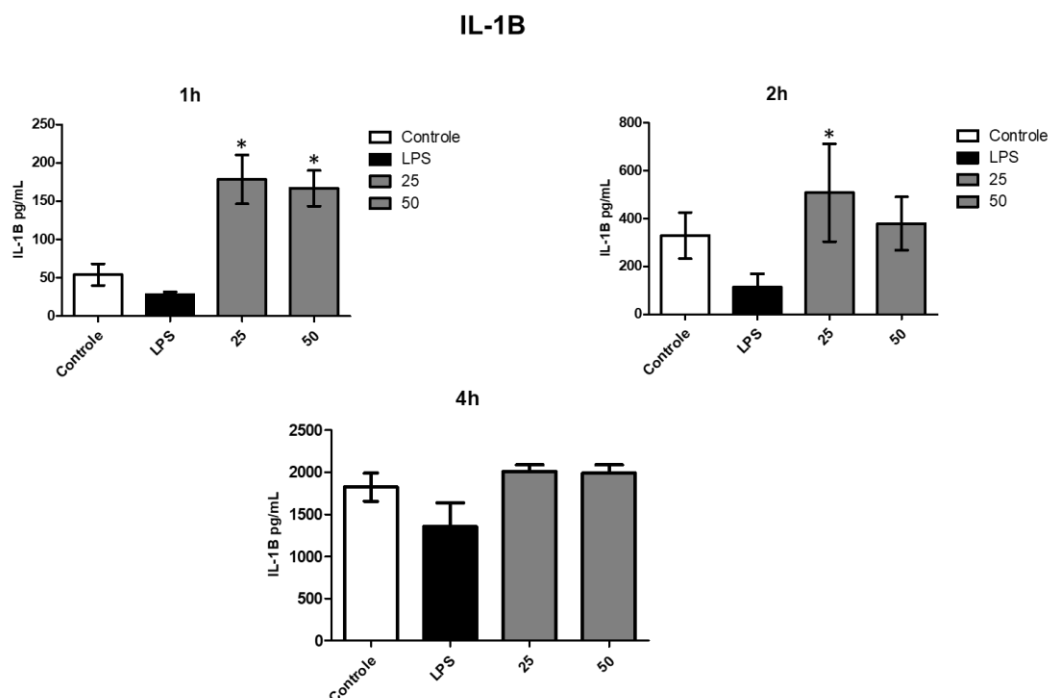
O ensaio imunoenzimático revelou que a Crotapotina induziu um aumento significativo na produção de IL-10 em PBMCs humanos, com início a partir de 24 h e pico evidente no tempo de 48 h, especialmente na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (figura 21). A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória fundamental na regulação da resposta imune, atuando na supressão da produção de mediadores pró-inflamatórios e na preservação da homeostase imunológica. Assim, esses resultados sugerem que a Crotapotina apresenta um perfil imunomodulador favorável, capaz de estimular mecanismos de controle da inflamação.

Figura 21 – Quantificação da citocina IL-10



O ensaio imunoenzimático para IL-10 foi realizada com PBMCs humanos (2×10^5) de três doadores diferentes (3 Ns) estimulados com RPMI (controle negativo), LPS (5 $\mu\text{g/mL}$; controle positivo), Crotapotina na concentração de 25 ou 50 $\mu\text{g/mL}$ por 6, 12, 24 e 48 h a 37 °C e 5% de CO_2 . Os valores são a média e o erro padrão de três doadores. * $p < 0,05$, em comparação com o controle negativo (os dados foram apresentados com ANOVA seguido de pós-teste de Dunnett).

Paralelamente, a dosagem de IL-1 β indicou que a Crotapotina também desencadeia uma resposta inflamatória inicial. Houve liberação significativa dessa citocina nos tempos de 1 h e 2 h de incubação, com queda acentuada nos níveis detectados após 4 h (figura 22). A IL-1 β é um dos principais produtos da ativação do inflamassoma, e sua liberação precoce é indicativa de resposta imune inata funcional. O retorno aos níveis basais em curto intervalo reforça a ideia de um controle ativo dessa resposta, sem manutenção de um estado inflamatório prolongado.

Figura 22 – Dosagem da citocina IL-1 β 

Concentração de IL-1 β em sobrenadantes de culturas de PBMCs humanos (2×10^5 células) provenientes de três doadores diferentes, após estimulação com RPMI (controle negativo), LPS (5 $\mu\text{g/mL}$; controle positivo) e Crotapotina (25 ou 50 $\mu\text{g/mL}$) por 1, 2 e 4 h a 37 °C e 5% de CO₂. Os valores apresentados correspondem à média de três doadores ($n=3$), e as barras de erro representam o desvio padrão da média ($\pm\text{DP}$). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett, com significância estabelecida em $*p < 0,05$, comparando os grupos tratados com o controle negativo.

Essa dinâmica temporal – caracterizada por uma ativação inicial da via inflamatória, seguida pela indução de uma resposta anti-inflamatória compensatória – revela um possível efeito duplamente modulador da Crotapotina. Ao induzir a produção de IL-1 β de forma transitória e promover o aumento sustentado de IL-10, o composto sugere atuar na ativação do sistema imune com um mecanismo autorregulador subsequente. Essa propriedade é particularmente relevante para estratégias terapêuticas que visam ao controle de inflamações sem imunossupressão contínua.

Diferentemente de agentes como o LPS e a nigericina, que mantêm níveis elevados de IL-1 β por períodos prolongados e não promovem estímulo significativo à IL-10, a Crotapotina demonstra um perfil mais equilibrado, com potencial para modular a resposta imune de forma segura. Isso a destaca como candidata promissora em cenários clínicos que exigem regulação imunológica sem risco de indução crônica de inflamação.

5 DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS *IN SILICO*

A importância da docagem molecular e da dinâmica molecular reside na sua capacidade de fornecer informações detalhadas sobre as interações moleculares, permitindo a seleção de compostos com maior potencial de inibição, a análise da estabilidade das interações ao longo do tempo e a compreensão dos mecanismos de ligação. Essas técnicas são cruciais para a bioprospecção de inibidores eficazes e seletivos contra alvos terapêuticos, como a TRLb, e podem fornecer uma base sólida para futuros estudos experimentais e desenvolvimento de fármacos.

Os estudos de docagem são amplamente utilizados em diferentes fases da descoberta de medicamentos, especialmente para prever a estrutura do complexo ligante-receptor e para classificar as moléculas do ligante com base na energia de ligação. Esses procedimentos são fundamentais para identificar a posição de ligação mais energeticamente favorável de um ligante ao seu receptor. Para selecionar um candidato potencial, é essencial que as energias livres de ligação sejam as mais baixas possíveis (MAAMRI *et al.*, 2021; VENKATESAN *et al.*, 2010).

A Tripanotiona redutase (TR) é uma enzima fundamental no metabolismo redox dos tripanossomatídeos, apresentando uma estrutura altamente conservada entre as espécies caracterizadas deste grupo (FIORILLO *et al.*, 2022). As semelhanças estruturais incluem aproximadamente 82% de similaridade entre espécies de *Leishmania* e mais de 80% entre diversas espécies de Trypanosomatidae, como *T. cruzi*, *T. brucei* e *Crithidia fasciculata* (BATTISTA *et al.*, 2020).

A TR é um homodímero simétrico, com cada subunidade composta por três domínios: o domínio de interface (resíduos 361-488), o domínio de ligação ao NADPH (resíduos 161-288) e o domínio de ligação ao FAD (resíduos 1-160 e 289-360). O sítio de ligação da Tripanotiona, que atua como substrato, está localizado em uma grande cavidade na interface entre as duas subunidades. Esta cavidade é formada pelos resíduos do domínio de ligação ao FAD de um monômero e pelos resíduos do domínio de interface do outro monômero (BATTISTA *et al.*, 2020; MAAMRI *et al.*, 2021).

De acordo com Battista *et al.* (2020), essas regiões podem ser agrupadas em três modos principais de inibição: (i) competição com Tripanotiona, devido à ligação à ampla cavidade TS2, compreendendo a maioria dos inibidores caracterizados; (ii) competição com o NADPH, devido à ligação à cavidade do NADPH; (iii) inativação redox de cisteínas, devido à ligação de um metal a Cys52 e Cys57 no sítio catalítico.

O processo catalítico de redução da Tripanotiona envolve a transferência de dois elétrons do NADPH para o FAD, que então reduz a ponte dissulfeto Cys52-Cys57. O substrato

se liga à enzima e ao Cys52, que é desprotonado pelo par His461'-Glu466', realizando um ataque nucleofílico à ponte dissulfeto da Tripanotiona, o que resulta na formação de um dissulfeto misto. Em seguida, um ataque de Cys57 em Cys52 promove a liberação do substrato reduzido (TURCANO *et al.*, 2018).

A simulação de dinâmica molecular é um complemento essencial à docagem molecular, pois permite estudar a evolução temporal das interações entre as moléculas ao longo do tempo. O fato de que as interações entre a CA e a TRLb se mantiveram estáveis ao longo dos 100 ns de simulação, conforme evidenciado pelos baixos valores de RMSD (sigla em inglês para *root mean square deviation*), é encorajador. Isso sugere que as interações observadas durante a docagem molecular são robustas e persistentes durante um período de tempo mais longo, o que pode indicar a possibilidade de um potencial inibitório efetivo da CA em relação à TRLb.

O conhecimento da dinâmica estrutural possibilita o desenho racional, a prospecção e a seleção de potenciais inibidores da atividade desses parasitos. Foram encontrados estudos de *in silico* para prospecção de potenciais inibidores da Tripanotina redutase. No presente estudo, os ensaios de docagem e dinâmica molecular indicaram que a crotapotina interage de forma simétrica tanto nas proximidades do sítio Z, especificamente nas regiões Phe399 e Leu399, quanto no sítio hidrofóbico, abrangendo as regiões V53, V58 e Ile106. As energias calculadas foram -15,4 Kcal para Crotapotina A e 15,5 kcal para Crotapotina B. Corroborando a docagem molecular, os resultados da dinâmica molecular indicaram que as interações entre as moléculas de Crotapotina (CA) e da TR nos sítios indicados se mantiveram estáveis ao longo dos 100 ns de simulação de dinâmica molecular, dados os baixos valores de RMSD.

As energias de ligação do presente estudo são próximas dos resultados de Maamri *et al.* (2021), que obtiveram energias de ligação de -8,4 kcal/mol e -6,2 kcal/mol para os compostos 3-metoxicarpachromeno e ácido masticadienônico, respectivamente. Nesse ensaio, o 3-metoxicarpachromeno interagiu com três ligações de hidrogênio (Glu466: 1,85 Å; His461: 2,58 Å; Asn340: 2,44 Å) e diferentes tipos de interações hidrofóbicas (Π -Alquil, Π -sigma, Π -cátion e Alquil-alquil com Asn340, Arg472, Cys469, Thr457, Ile339 e Ala343).

No estudo de Fiorillo *et al.* (2022), a triagem virtual revelou a existência de uma bolsa alostérica próxima ao local de ligação do NADPH, onde a interação dos ligantes neste local interfere na atividade da TR, dificultando o “movimento de abertura” necessário para permitir a ligação do cofator. O segundo sítio de interação foi o sítio Z, localizado nas proximidades da cavidade da Tripanotiona.

Diante do exposto, pode-se inferir que a Crotapotina apresentou resultados favoráveis que se alinham com estudos anteriores, como os de Maamri *et al.* (2021) e Fiorillo *et al.* (2022), que também identificaram compostos com energias de ligação favoráveis e interações estáveis com a TR.

5.2 PURIFICAÇÃO DA CROTAPOTINA

A purificação das proteínas e posterior caracterização é um passo fundamental na compreensão dos processos bioquímicos em que estão envolvidas. Existem vários métodos de separação proteica com base em características moleculares, mais ou menos específicas de cada proteína. Esses métodos, isoladamente, são de modo geral insuficientes para a obtenção de elevados graus de purificação proteica, a partir de misturas complexas, sendo habitualmente necessária a associação sequencial de dois ou mais métodos, com base em critérios de separação diferentes (FALLON, 1987; LOUREIRO, 1991).

Nesse sentido, para a obtenção da Crotapotina com elevado grau de pureza, foram realizadas quatro sequências cromatográficas envolvendo a cromatografia líquida de alta eficiência: gel filtração, fase reversa utilizando coluna C18, cromatografia por afinidade em coluna DEAE-Sepharose e, por último, uma recromatografia em coluna C18.

5.3 EXPRESSÃO RECOMBINANTE DA TR E ATIVIDADE INIBITÓRIA DA CROTAPOTINA

A Tripanotiona redutase de *Leishmania* spp. é uma oxidoreductase dependente de NADPH, importante para o metabolismo do tiol, essencial para a viabilidade do parasito. A sua ausência no hospedeiro mamífero torna essa enzima um alvo atraente para o desenvolvimento de novos fármacos antileishmania (BAIOCCO *et al.*, 2009; MITTAL *et al.*, 2005). Nesse sentido, o desenvolvimento de um protocolo bem estabelecido para a clonagem, o sequenciamento e a expressão da TR na cepa BL21(DE3) de *Escherichia coli* tem sido amplamente empregado, resultando em uma proteína solúvel, dimérica, com tamanho aproximado de 54 kDa (SULLIVAN *et al.*, 1989; TUNES *et al.*, 2020).

Segundo essas informações, os resultados obtidos da expressão recombinante e purificação da TR apresentaram-se exitosos. O perfil cromatográfico proveniente da cromatografia de afinidade com resina Ni-NTA após 4 h de indução resultou em uma proteína com massa molecular relativa de 54 kDa e rendimento de 4 mg/L.

Como já descrito neste trabalho, o processo de purificação cromatográfico, quando não ajustado às propriedades da proteína, poderá acarretar na perda de sua funcionalidade. Dessa forma, é necessário que a proteína recombinante seja submetida a ensaios de atividade enzimática para confirmar sua atividade.

Cunningham e Fairlamb (1995) observaram em seu estudo que os substratos de dissulfeto de Tripanotiona e NADPH exibem cinética de saturação de Michaelis-Menten, com comportamento semelhante à enzima obtida neste trabalho. A inibição prosseguiu até que um equilíbrio aparente entre enzima ativa/fármaco livre e complexo enzima-fármaco inativo foi alcançado.

Os resultados apresentados indicam que, embora a Crotapotina tenha demonstrado potencial inibitório sobre a TRLb, sua eficácia em condições *in vitro* é limitada, exigindo altas concentrações para atingir níveis significativos de inibição. Essa baixa afinidade pela enzima sugere que fatores estruturais podem dificultar a interação efetiva da Crotapotina com o sítio ativo da TRLb, como o tamanho ou a conformação molecular da proteína, aliados à complexidade do sítio ativo da TR. Apesar do elevado IC₅₀, o efeito observado confirma a capacidade da Crotapotina de se ligar à TRLb e alterar sua atividade, ainda que de forma moderada. Esse achado ressalta a importância de otimizações químicas e estruturais em derivados de Crotapotina para melhorar a afinidade e a eficácia, além de reforçar a necessidade de estudos complementares para validar sua aplicabilidade como inibidor em contextos mais próximos ao biológico, como sistemas celulares ou modelos animais.

5.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA DA CROTAPOTINA SOBRE AMASTIGOTAS AXÊNICAS DE *L. AMAZONENSIS*

Os resultados indicam que a Crotapotina tem uma atividade inibitória moderada contra *Leishmania amazonensis*, com uma inibição de 41%. Este resultado é significativo, considerando que a Crotapotina não é uma substância convencionalmente conhecida por suas propriedades antiparasitárias. A anfotericina B, como controle positivo, mostrou alta eficácia com 75% de inibição, confirmando a validade do ensaio. O DMSO, como controle negativo, demonstrou resultados esperados com mínima inibição.

Já foram relatadas a ação de outras frações do veneno de *Crotalus durissus* sobre linhagens celulares de *Leishmania* spp. Passero *et al.* (2007, 2008) compararam a ação do veneno de três subespécies de *Crotalus durissus* – *C. d. terrificus*, *C. d. cascavella* (*Cdca*) e *C. d. collilineatus* (*Cdcol*) contra amastigotas de *Leishmania amazonensis*. O veneno de *C. d. terrificus* apresentou a maior atividade inibitória entre as três amostras (IC₅₀ de $4,70 \pm 1,72$ µg/mL). Dentre as frações isoladas, as mais ativas foram de *Cdca*, giroxina e crotamina, que apresentaram valores de IC₅₀ de $3,80 \pm 0,52$ µg/mL e $19,95 \pm 4,21$ µg/mL, respectivamente. A convulxina também inibiu a taxa de crescimento do parasito, embora este efeito não seja dose-dependente. A crotoxina foi a fração menos eficaz, com um valor de IC₅₀ de $99,80 \pm 2,21$ µg/mL. Em outro estudo, foi avaliado o efeito da PLA₂ de *Cdca* sobre formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Observou-se um aumento da taxa de crescimento dos parasitos. Estudos *in vivo* mostraram que as promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com PLA₂ aumentaram o tamanho das lesões em camundongos BALB/c, e a análise histopatológica mostrou numerosas regiões necróticas apresentando maior densidade de células polimorfonucleares, mononucleares e amastigotas (PASSERO *et al.*, 2007, 2008).

Em outro estudo, avaliou-se a atividade da PLA₂ contra macrófagos peritoneais infectados por formas amastigotas de *L. infantum chagasi*. A avaliação da citotoxicidade mostrou IC₅₀ de 98 µg/mL. Observou-se estimulação no crescimento dos parasitos e da produção de H₂O₂ e NO (BARROS *et al.*, 2015). Katz *et al.* (2020) também avaliaram o efeito de frações de *C. d. terrificus* contra macrófagos infectados com *L. amazonensis*. A crotamina apresentou o maior IC₅₀ (25.65 ± 0.52), enquanto a convulxina apresentou a menor ação IC₅₀ (52.7 ± 2.21). A crotoxina também foi avaliada por Valentim Silva *et al.* (2020). Esta toxina aumentou o efeito da anfotericina B contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, diminuindo a toxicidade da droga em diferentes linhagens celulares, e induziu a produção de importantes citocinas Th1-like e NO por macrófagos infectados (VALENTIM SILVA *et al.*, 2020). A ação de uma LAAO-I de *Cdcol* foi avaliada sobre parasitos de *L. infantum* e *L. amazonensis*. Os ensaios de citotoxicidade revelaram IC₅₀ de 18,49 e 11,66 µg/mL para *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum*, respectivamente. Foi observado que a LAAO-I aumentou significativamente a concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) e reduziu o potencial mitocondrial de ambas as espécies de *Leishmania* e a capacidade do parasito de infectar macrófagos em cerca de 70% (FREITAS *et al.*, 2023).

Observa-se que em nenhum dos estudos citados se avaliou a atividade da Crotapotina contra parasitos de *Leishmania*. Somente no estudo de Oliveira (2022) foi avaliada a atividade das isoformas desta proteína sobre *L. amazonensis*. A Crotapotina não apresentou inibição sobre o crescimento parasitário na concentração máxima (IC < 200 µg/mL) em comparação à pentamidina (3 µg/mL), com valor de p<0,05. Quanto à toxicidade, não foi observada contra células HepG2 em concentrações superiores a 500 µg/mL.

O valor de IC₅₀ (concentração inibitória 50%) é uma medida crucial na farmacologia que indica a concentração de um inibidor necessário para reduzir a atividade de uma enzima em 50%. Valores baixos de IC₅₀ indicam alta eficácia do inibidor, o que é desejável no desenvolvimento de novos fármacos.

De acordo com os estudos apresentados, observa-se que há escassez de pesquisas voltadas a avaliar uma possível atividade inibitória da Crotapotina sobre cepas de *Leishmania* spp. Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho apresentam informações inéditas sobre sua ação *in silico* e *in vitro* contra *Leishmania* spp. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar completamente seu mecanismo de ação e otimizar sua eficácia, especialmente em modelos *in vivo*.

5.5 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA CROTAPOTINA SOBRE PBMCS

Os resultados obtidos indicam que a Crotapotina, apesar da eficácia limitada nos ensaios de inibição direta contra *Leishmania*, apresenta um perfil imunológico relevante e

seguro, com potencial para aplicação terapêutica em modulação da resposta imune. Nos ensaios com PBMCs humanos, a proteína demonstrou ser biologicamente ativa sem induzir efeitos tóxicos em concentrações de até 50 µg/mL e por períodos de incubação prolongados (até 96 h). A ausência de morte celular significativa, verificada tanto pelos baixos níveis de LDH quanto pela manutenção da integridade celular na citometria de fluxo com 7AAD, demonstra que a Crotapotina não compromete a viabilidade das células imunológicas, condição essencial para candidatos a imunomoduladores.

Complementarmente, os ensaios de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), realizados por dois métodos independentes (DCFDA e citometria de fluxo), mostraram que a Crotapotina não induz aumento mensurável na produção de ROS em PBMCs. Essa ausência de estresse oxidativo destaca um importante diferencial da Crotapotina em comparação com compostos inflamatórios clássicos, como LPS e nigericina, que dependem fortemente da geração de ROS para ativação do inflamassoma NLRP3. A Crotapotina, por sua vez, parece atuar por mecanismos distintos e menos agressivos, o que é vantajoso em cenários terapêuticos que demandam controle da inflamação sem prejuízo às células do hospedeiro.

No contexto da resposta imunológica, a leishmaniose é marcada por desequilíbrio entre ativação inflamatória e regulação imune, sendo a IL-1 β uma citocina central nesse processo. A ativação persistente do inflamassoma NLRP3 tem sido correlacionada com pior prognóstico da doença (SANTOS *et al.*, 2018), e estudos recentes indicam que a função da gasdermina D (GSDMD), ao formar poros na membrana celular, favorece a perpetuação do processo inflamatório (SÁ *et al.*, 2023). Nesse cenário, a Crotapotina demonstrou comportamento pleiotrópico interessante: induziu liberação precoce de IL-1 β (1 h e 2 h), porém com retorno aos níveis basais em 4 h, e, paralelamente, estimulou a produção sustentada de IL-10, com pico às 48 h.

Essa cinética sugere que a Crotapotina pode promover uma ativação inicial da imunidade inata – essencial para reconhecimento e resposta frente a patógenos – seguida por um mecanismo de autorregulação anti-inflamatório, representado pelo aumento de IL-10. O equilíbrio entre essas duas respostas é desejável em terapias para doenças infecciosas crônicas, como a leishmaniose, nas quais a inflamação exacerbada contribui para o dano tecidual. Ao contrário do LPS e da nigericina, que induzem liberação contínua de IL-1 β e não estimulam IL-10, a Crotapotina demonstra um perfil mais regulado e compatível com modulação terapêutica.

O uso de disulfiran (inibidor da GSDMD) e apocinina (inibidor da NADPH oxidase) nos ensaios funcionais revelou que a ação da Crotapotina está, ao menos parcialmente, vinculada a vias dependentes do inflamassoma NLRP3 e da formação de poros. A redução expressiva na liberação de IL-1 β e na expressão de GSDMD nos grupos com inibidores sugere que a Crotapotina pode interagir com essas vias, embora sua ativação pareça ser mais controlada

e menos citotóxica do que a provocada por agonistas clássicos. Interessantemente, em determinados casos, a formação de poros foi mais pronunciada quando a Crotapotina estava associada ao disulfiran. Isso sugere a ativação de vias compensatórias ou mecanismos alternativos de modulação da GSDMD, que ainda requerem uma análise mais aprofundada para serem completamente compreendidos.

Os ensaios de imunofluorescência reforçam essa hipótese e mostram que, apesar de não causar desorganização evidente da estrutura celular, a Crotapotina modula a expressão de GSDMD e IL-1 β , sobretudo em combinação com os inibidores. Essa modulação sem comprometimento estrutural sugere um papel regulador, e não destrutivo, da proteína. Além disso, os baixos níveis de ROS e a ausência de apoptose confirmam um efeito seletivo, o que é fundamental para manter a integridade funcional das células do sistema imune.

A literatura oferece suporte adicional para esse perfil imunomodulador da Crotapotina. Estudos anteriores demonstraram seus efeitos anti-inflamatórios em modelos de inflamação aguda (LANDUCCI *et al.*, 2000) e sua capacidade de interferir na ativação de linfócitos T e na liberação de prostaglandinas por macrófagos (GARCIA *et al.*, 2003), mecanismos envolvidos na regulação do microambiente inflamatório. Esses dados, aliados aos resultados atuais, indicam que a Crotapotina pode atuar como agente regulador da resposta inflamatória, promovendo ativação imune inicial com posterior resolução controlada.

Por fim, embora a eficácia direta contra parasitos tenha sido limitada nos modelos *in vitro*, os resultados *in silico* demonstraram interação favorável entre a Crotapotina e a enzima Tripanotiona redutase (TRLb), o que, somado ao seu perfil imunomodulador seguro, reforça seu valor como protótipo para novas terapias imunomoduladoras. A dualidade funcional observada – com estímulo inicial pró-inflamatório seguido por uma resposta anti-inflamatória reguladora – já foi relatada em alguns componentes de venenos de serpentes, como a crotoxina e suas subunidades, incluindo a própria Crotapotina. No entanto, a caracterização detalhada dessa modulação em células humanas primárias, com definição temporal clara da liberação de IL-1 β e IL-10, associada à investigação mecanística com inibidores específicos, representa um avanço relevante na compreensão do potencial imunomodulador dessas toxinas. Esses achados reforçam a necessidade de mais estudos funcionais e estruturais para elucidar os mecanismos envolvidos e explorar possíveis aplicações terapêuticas da Crotapotina em condições inflamatórias e infecciosas crônicas.

6 CONCLUSÕES

Os estudos conduzidos nesta tese demonstraram que a Crotapotina, componente da crotoxina, possui propriedades relevantes tanto do ponto de vista molecular quanto do imunológico. As análises *in silico* indicaram forte afinidade da Crotapotina com a Tripanotona redutase de *Leishmania braziliensis* e estabilidade estrutural significativa em simulações de dinâmica molecular, sugerindo sua viabilidade como inibidor potencial. No entanto, os ensaios *in vitro* revelaram eficácia limitada contra a enzima recombinante e amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*, o que evidencia uma lacuna entre o potencial teórico e a atividade prática, reforçando a importância de estudos adicionais para otimização estrutural e validação funcional.

Por outro lado, os ensaios imunológicos com PBMCs humanos revelaram um perfil imunomodulador promissor. A Crotapotina não apresentou citotoxicidade, não induziu estresse oxidativo e manteve a integridade celular nos períodos avaliados. Além disso, promoveu uma resposta pleiotrópica de citocinas, com liberação precoce e transitória de IL-1 β e aumento sustentado de IL-10, demonstrando sua capacidade de ativar e regular a resposta imune de forma controlada. Essa combinação de efeitos – segurança celular, modulação inflamatória e ausência de agressão oxidativa – posiciona a Crotapotina como uma candidata relevante para terapias adjuvantes ou imunomoduladoras.

Embora sua ação antiparasitária direta precise ser aprimorada, os dados obtidos evidenciam o potencial terapêutico da Crotapotina na ótica da imunologia. Estratégias futuras, como modificações estruturais, estudos de formulação e testes em modelos animais de infecção, poderão expandir seu escopo de aplicação. A convergência entre os achados *in silico*, *in vitro* e imunológicos oferece uma base sólida para o avanço da Crotapotina como protótipo para novas abordagens terapêuticas em doenças infecciosas e inflamatórias.

REFERÊNCIAS

- ABDOLI, A.; MASPI, N.; GHAFARIFAR, F. Wound healing in cutaneous leishmaniasis: a double edged sword of IL-10 and TGF- β . *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 51, p. 15-26, 2017.
- ABRAHAM, M.J.; MURTOLA, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S.; SMITH, J.C.; HESS, B. *et al.* GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, v. 1-2, p. 19-25, 2015.
- ABRAMSON, J.; ADLER, J.; DUNGER, J.; EVANS, R.; GREEN, T.; PRITZEL, A. *et al.* Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, v. 630, n. 8016, p. 493-500, 2024.
- ACOSTA DE PEREZ, O.; KOSCINCZUK, P.; TEIBLER, P.; RUIZ, R.; SANCHEZ NEGRETTE, M.; MARUÑAK, S. *et al.* *Crotalus durissus terrificus* (cascabel) venom poisoning in rats. *Acta Toxicologica Argentina*, v. 5, n. 2, p. 71-74, 1997.
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: a review. *Acta Tropica*, v. 172, p. 86-90, 2017.
- ALI, V.; BEHERA, S.; NAWAZ, A.; EQUBAL, A.; PANDEY, K. Unique thiol metabolism in trypanosomatids: redox homeostasis and drug resistance. In: ROLLINSON, D.; STOTHARD, R. (ed.). *Advances in Parasitology*. v. 117. London: Academic Press, 2022. p. 75-155.
- ALMEIDA-SANTOS, S.M.; SALOMÃO, M.G. Long-term sperm storage in the female Neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). *Japanese Journal of Herpetology*, v. 17, n. 2, p. 46-52, 1997.
- ALVES, B.F.A.; FERREIRA JR., R.S. Antineoplastic properties and pharmacological applications of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 55, article ID e0323, p. 1-10, 2022.
- ANDRADE, C.M.; REY, F.M.; CINTRA, A.C.O.; SAMPAIO, S.V.; TORQUETTI, M.R. Effects of crotoxin, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on human endothelial cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 134, p. 613-621, 2019.
- ANVERSA, L.S.; TIBURCIO, M.G.S.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; RAMIREZ, L.E. Human leishmaniasis in Brazil: a general review. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 64, n. 3, p. 281-289, 2018.
- ARGÁEZ, M.A.H. *Ecologia da cascavel (Viperidae, Crotalus durissus) no Cerrado brasileiro*. 2006. 47 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- ASSIS, L.M. *Predição de epítomos de célula B em proteínas de Leishmania infantum: uma análise in silico*. 2013. 65 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.
- AZANZA PEREA, J.R. Liposomal amphotericin B: clinical pharmacology, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 38, n. 2, p. 52-55, 2021.
- BAILEY, M.S.; LOCKWOOD, D.N. Cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*, v. 25, n. 2, p. 203-211, 2007.

BAIOCCO, P.; FRANCESCHINI, S.; ILARI, A.; COLOTTI, G. Trypanothione reductase from *Leishmania infantum*: cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray data analysis. *Protein and Peptide Letters*, v. 16, n. 2, p. 196-200, 2009.

BARROS, G.A.C.; PEREIRA, A.V.; BARROS, L.C.; LOURENÇO JR., A.; CALVI, S.A.; SANTOS, L.D. *et al.* In vitro activity of phospholipase A2 and of peptides from *Crotalus durissus terrificus* venom against amastigote and promastigote forms of *Leishmania (L.) infantum* chagasi. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 21, article ID 48, p. 1-9, 2015.

BASTOS, E.G.M.; ARAÚJO, A.F.B. de; SILVA, H.R. Records of the rattlesnakes *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti) (Serpentes, Viperidae) in the State of Rio de Janeiro, Brazil: a possible case of invasion facilitated by deforestation. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 22, n. 3, p. 812-815, 2005.

BATTISTA, T.; COLOTTI, G.; ILARI, A.; FIORILLO, A. Targeting Trypanothione Reductase, a key enzyme in the redox trypanosomatid metabolism, to develop new drugs against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Molecules*, v. 25, n. 8, article ID 1924, p. 1-17, 2020.

BAXEVANIS, A.D.; OUELLETTE, B.F.F. *Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins*. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.

BERHE, H.; SRIDHAR, M.K.C.; ZERIHUN, M.; QVIT, N. The potential use of peptides in the fight against Chagas disease and leishmaniasis. *Pharmaceutics*, v. 16, n. 2, article ID 227, p. 1-41, 2024.

BLANCO, V.R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N.M. Leishmaniose: aspectos gerais relacionados com a doença, o ciclo do parasita, fármacos disponíveis, novos protótipos e vacinas. *Revista Virtual de Química*, v. 9, n. 3, p. 861-876, 2017.

BON, C. Synergism of the two subunits of crotoxin. *Toxicon*, v. 20, n. 1, p. 105-109, 1982.

BON, C.; CHANGEUX, J.P.; JENG, T.W.; FRAENKEL-CONRAT, H. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *European Journal of Biochemistry*, v. 99, n. 3, p. 471-482, 1979.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Leishmaniose Tegumentar*. [s. d.]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt>. Acesso em: 20 jan. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Leishmaniose Tegumentar*. 2022. Disponível em: [https://leishmanioses.aids.gov.br/app/dashboards?auth_provider_hint=anonymous1#/view/5fc3a7ec-22b9-4402-9a52-a5001ca659ad?embed=true&_g=\(\)&show-top-menu=false](https://leishmanioses.aids.gov.br/app/dashboards?auth_provider_hint=anonymous1#/view/5fc3a7ec-22b9-4402-9a52-a5001ca659ad?embed=true&_g=()&show-top-menu=false). Acesso em: 10 fev. 2024.

BRIONES NIEVA, C.A.; CID, A.G.; ROMERO, A.I.; GARCÍA-BUSTOS, M.F.; VILLEGAS, M.; BERMÚDEZ, J.M. An appraisal of the scientific current situation and new perspectives in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, v. 221, article ID 105988, 2021.

BRITES, V.L.C.; BAUAB, F.A. Fauna ofidiana do município de Uberlândia, Minas Gerais - Brasil. I. Ocorrência na área urbana. *Revista do Centro de Ciências Biomédicas*, v. 4, n. 1, p. 3-8, 1988.

BURGHARDT, G.M. Chemical-cue preferences of inexperienced snakes: comparative aspects. *Science*, v. 157, n. 3789, p. 718-721, 1967.

BURZA, S.; CROFT, S.L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. *The Lancet*, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018.

CABRAL, M.A.F. *Estudo dos potenciais terapêuticos do veneno da serpente Bothrops jararaca*. 2011. 25 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

CALDEIRA COSTA, H.; BERNILS, R.S. Répteis do Brasil e suas unidades federativas: lista de espécies. *Herpetologia Brasileira*, v. 7, n. 1, p. 2018.

CALVETE, J.J.; SANZ, L.; CID, P.; DE LA TORRE, P.; FLORES-DÍAZ, M.; SANTOS, M.C. *et al.* Snake venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *Journal of Proteome Research*, v. 9, n. 1, p. 528-544, 2010.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. *The venomous reptiles of Latin America*. Ithaca: Cornell University Press, 1989.

CARAUS, I.; ALSUWAILEM, A.A.; NADON, R.; MARARENKOV, V. Detecting and overcoming systematic bias in high-throughput screening technologies: a comprehensive review of practical issues and methodological solutions. *Briefings in Bioinformatics*, v. 16, n. 6, p. 974-986, 2015.

CASTRO, F.R.; FARIAS, A.S.; PROENÇA, P.L.F.; LA HOZ, C.; LANGONE, F.; OLIVEIRA, E.C. *et al.* The effect of treatment with crotafotin on the evolution of experimental autoimmune neuritis induced in Lewis rats. *Toxicon*, v. 49, n. 3, p. 299-305, 2007.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*, v. 2, n. 2, p. 167-176, 2010.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.

CLARK, E.D. Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, n. 2, p. 202-207, 2001.

CROFT, S.L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research*, v. 123, n. 3, p. 399-410, 2006.

CUNNINGHAM, M.L.; FAIRLAMB, A.H. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*: purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. *European Journal of Biochemistry*, v. 230, n. 2, p. 460-468, 1995.

DAURA, X.; GADEMANN, K.; JAUN, B.; SEEBACH, D.; VAN GUSTEREN, W.F.; MARK, A.E. Peptide folding: when simulation meets experiment. *Helvetica Chimica Acta*, v. 38, n. 1-2, p. 236-240, 1999.

DE VRIES, H.J.C.; SCHALLIG, H.D. Cutaneous leishmaniasis: a 2022 updated narrative review into diagnosis and management developments. *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 23, n. 6, p. 823-840, 2022.

DEL CISTIA, C.D.N. *Modelagem molecular aplicada ao estudo de reações de inibição enzimática com aplicação potencial no controle de Leishmania amazonenses*. 2010. 219 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

DÍAZ, J.J.A.R. *Cruzaína de Trypanosoma cruzi*: prospecção e identificação de inibidores com potencial atividade tripanomicida. 2019. 114 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2019.

DINIZ-SOUSA, R.; CALDEIRA, C.A.S.; PEREIRA, S.S.; SILVA, S.L.; FERNANDES, P.A.; TEIXEIRA, L.M.C. *et al.* Therapeutic applications of snake venoms: an invaluable potential of new drug candidates. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 238, article ID 124357, 2023.

DIVENUTO, F.; MARASCIO, N.; QUIRINO, A.; GIANCOTTI, A.; FILICE, A.; GIGLIOTTI, S. *et al.* Cellular mediators in human leishmaniasis: critical determinants in parasite killing or disease progression. *Acta Tropica*, v. 248, article ID 107037, 2023.

DOLEY, R.; KINI, R.M. Protein complexes in snake venom. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 66, n. 17, p. 2851-2871, 2009.

FAIRLAMB, A.H.; BLACKBURN, P.; ULRICH, P.; CHAIT, B.T.; CERAMI, A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*, v. 227, n. 4693, p. 1485-1487, 1985.

FALLON, A. *Applications of HPLC in biochemistry*. New York: Elsevier, 1987.

FARINA, J.M.; GARCÍA-MARTÍNEZ, C.E.; SILDARRIAGA, C.; PÉREZ, G.E.; MELO, M.B.; WYSS, F. *et al.* Leishmaniasis and heart. *Archivos de Cardiología de México*, v. 92, n. 1, p. 85-93, 2022.

FAURE, G.; XU, H.; SAUL, F.A. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β -neurotoxin. *Journal of Molecular Biology*, v. 412, n. 2, p. 176-191, 2011.

FERNÁNDEZ-FIGUEROA, E.A.; RANGEL-ESCARÉÑO, C.; ESPINOSA-MATEOS, V.; CARRILLO-SÁNCHEZ, K.; SALAIZA-SUAZO, N.; CARRADA-FIGUEROA, G. *et al.* Disease severity in patients infected with *Leishmania mexicana* relates to IL-1 β . *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 5, article ID e1533, p. 1-9, 2012.

FIGUEIREDO, K.A.; FIGUEIREDO, J.F.S.; COSTA, R.K.M.; ALVES, M.M.M.; MAGALHÃES, J.L.; CARVALHO, A.L.M. *et al.* Prospecção de alvos bioquímicos para estudo *in silico* na quimioterapia antileishmaniasis. *Revista Virtual de Química*, v. 10, n. 5, p. 1485-1501, 2018.

FIORILLO, A.; COLOTTI, G.; EXERTIER, C.; LIUZZI, A.; SEGNETTI, F.; SALERNO, A. *et al.* Innovative approach for a classic target: fragment screening on trypanothione reductase reveals new opportunities for drug design. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 9, article ID 900882, 2022.

FONSECA, F.V.; ANTUNES, E.; MORGANTI, R.P.; MONTEIRO, H.S.A.; MARTINS, A.M.C.; TOYAMA, D.O. *et al.* Characterization of a new platelet aggregating factor from crotoxin *Crotalus durissus cascavella* venom. *Protein Journal*, v. 25, n. 3, p. 183-192, 2006.

FRARE, B.T.; RESENDE, Y.K.S.; DORNELAS, B.C.; JORGE, M.T.; RICARTE, V.A.S.; ALVES, L.M. *et al.* Clinical, laboratory, and therapeutic aspects of *Crotalus durissus* (South American rattlesnake) victims: a literature review. *BioMed Research International*, v. 2019, article ID 1345923, p. 1-11, 2019.

FREITAS, A.P.; CLISSA, P.B.; SOTO, D.R.; CÂMARA, N.O.S.; FAQUIM-MAURO, E.L. The modulatory effect of crotoxin and its phospholipase A2 subunit from *Crotalus durissus terrificus* venom on dendritic cells interferes with the generation of effector CD4⁺ T lymphocytes. *Immunology Letters*, v. 240, p. 56-70, 2021.

FREITAS, V.; COSTA, T.R.; NOGUEIRA, A.R.; POLLONI, L.; FERNANDES, T.A.M.; CORREIA, L.I.V. *et al.* Biochemical characterization and assessment of leishmanicidal effects of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus collilineatus* snake venom (CollinLA AO-I). *Toxicon*, v. 230, article ID 107156, 2023.

FUSCO, L.S.; NETO, E.B.; FRANCISCO, A.F.; ALFONSO, J.; SOARES, A.; PIMENTA, D.C. *et al.* Fast venom analysis of *Crotalus durissus terrificus* from northeastern Argentina. *Toxicon: X*, v. 7, article ID 100047, 2020.

GAO, Y., LEE, J.; SMITH, I.P.S.; LEE, H.; KIM, S.; QI, Y. *et al.* CHARMM-GUI supports hydrogen mass repartitioning and different protonation states of phosphates in lipopolysaccharides. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 61, n. 2, p. 831-839, 2021.

GARCIA, F.; TOYAMA, M.H.; CASTRO, F.R.; PROENÇA, P.L.; MARANGONI, S.; SANTOS, L.M.B. Crota-potin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE₂ synthesis. *Toxicon*, v. 42, n. 4, p. 433-437, 2003.

GEORGIEVA, D.; OHLER, M.; SEIFERT, J.; VON BERGEN, M.; ARNI, R.K.; GENOV, N. *et al.* Snake venom of *Crotalus durissus terrificus* – correlation with pharmacological activities. *Journal of Proteome Research*, v. 9, n. 5, p. 2302-2316, 2010.

GIAROLA, N.L.; SILVEIRA, T.S.; INACIO, J.D.F.; VIEIRA, L.P.; ALMEIRA-AMARAL, E.E.; MEYER-FERNANDES, J.R. *Leishmania amazonensis*: increase in ecto-ATPase activity and parasite burden of vinblastine-resistant protozoa. *Experimental Parasitology*, v. 146, p. 25-33, 2014.

GÓMEZ GARAY, A.F.; ALFONSO, J.J.; FRANCISCO, A.F.; ARAÚJO, E.C.S.; FONTES, M.R.M.; FERNANDES, C.A.H. *et al.* Structural and kinetic profiling of *Leishmania braziliensis* trypanothione reductase: A molecular model for the development of targeted therapies. *Biochimie*, v. 235, p. 14-28, 2025.

GUIDO, R.V.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. *Current Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 1, p. 37-46, 2008.

GUIDOLIN, F.R.; TAMBOURGI, D.V.; GUIDOLIN, R.; MARCELINO, J.R.; OKAMOTO, C.K.; MAGNOLI, F.C. *et al.* Characterization of anti-crotalic antibodies. *Toxicon*, v. 66, p. 7-17, 2013.

GUREL, M.S.; TEKIN, B.; UZUN, S. Cutaneous leishmaniasis: a great imitator. *Clinics in Dermatology*, v. 38, n. 2, p. 140-151, 2020.

GUZMAN-RIVERO, M.; VERDUGUEZ-ORELLANA, A.; MONTAÑO, K.; CLOETENS, L.; ROJAS, E.; AKESSON, B. *et al.* The immune response in patients with cutaneous leishmaniasis and the influence of zinc supplementation. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 69, p. 56-62, 2015.

HARRINGTON, V.; GURUNG, P. Reconciling protective and pathogenic roles of the NLRP3 inflammasome in leishmaniasis. *Immunological Reviews*, v. 297, n. 1, p. 53-66, 2020.

HASHIGUCHI, Y.; GOMEZ, E.L.; KATO, H.; MARTINI, L.R.; VELEZ, L.N.; UEZATO, H. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. *Tropical Medicine and Health*, v. 44, article n. 2, p. 1-9, 2016.

HENDRICKX, S.; CALJON, G.; MAES, L. Need for sustainable approaches in antileishmanial drug discovery. *Parasitology Research*, v. 118, n. 10, p. 2743-2752, 2019.

HERAS-MOSTEIRO, J.; MONGE-MAILLO, B.; PINART, M.; PEREIRA, P.L.; GARCIA-CARRASCO, E.; CUADRADO, P.C. *et al.* Interventions for Old World cutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 11, article ID CD005067, 2017.

HERNÁNDEZ, M.; SCANNONE, H.; FINOL, H.J.; PINEDA, M.E.; FERNÁNDEZ, I.; VARGAS, A.M. *et al.* Alterations in the ultrastructure of cardiac autonomic nervous system triggered by crotoxin from rattlesnake (*Crotalus durissus cumanensis*) venom. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 59, n. 2, p. 129-137, 2007.

HOYOS, M.A.; ALMEIDA-SANTOS, S.M. The South-American rattlesnake *Crotalus durissus*: feeding ecology in the central region of Brazil. *Biota Neotropica*, v. 16, n. 3, 2016.

HUANG, J.; RAUSCHER, S.; NAWROCKI, G.; RAN, T.; FEIG, M.; GROOT, B.L. *et al.* CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nature Methods*, v. 14, n. 1, p. 71-73, 2017.

HURRELL, B.P.; REGLI, I.B.; TACCHINI-COTTIER, F. Different *Leishmania* species drive distinct neutrophil functions. *Trends in Parasitology*, v. 32, n. 5, p. 392-401, 2016.

JOSEPH, S.; WHITMAN, T.J.; BUCKNER, F.S.; COGEN, A.L. Case report: miltefosine failure and spontaneous resolution of Cutaneous *Leishmaniasis braziliensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 105, n. 1, p. 142-143, 2021.

KATZ, S.; BARBIÉRI, C.L.; SOLER, F.P.M.; SOARES, A.M.; CHAVANTES, M.C.; ZAMUNER, S.T. Effect of isolated proteins from *Crotalus durissus terrificus* venom on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. *Protein and Peptide Letters*, v. 27, n. 8, p. 718-724, 2020.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M.A.; KEELING, J.H. New World and Old World *Leishmania* infections: a practical review. *Dermatologic Clinics*, v. 33, n. 3, p. 579-593, 2015.

KIHEL, A.; HAMMI, I.; DARIF, D.; LEMRANI, M.; RIYAD, M.; GUESSOUS, F. *et al.* The different faces of the NLRP3 inflammasome in cutaneous leishmaniasis: a review. *Cytokine*, v. 147, article ID 155248, 2021.

KIP, A.E.; CASTRO, M.D.M.; GOMEZ, M.A.; COSSIO, A.; SCHELLENS, J.H.M.; BEIJNEN, J.H. *et al.* Simultaneous population pharmacokinetic modelling of plasma and intracellular PBMC miltefosine concentrations in New World cutaneous leishmaniasis and exploration of exposure-response relationships. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 73, n. 8, p. 2104-2111, 2018.

KOH, C.Y.; KINI, R.M. From snake venom toxins to therapeutics – cardiovascular examples. *Toxicon*, v. 59, n. 4, p. 497-506, 2012.

KRZEMIŃSKI, W.; KRZEMIŃSKA, E. Triassic Diptera: descriptions, revisions and phylogenetic relations. *Acta Zoologica Cracoviensia*, v. 46, suppl. Fossil Insects, p. 153-184, 2003.

KUMAR, A.; SINGH, V.K.; TIWARI, R.; MADHUKAR, P.; RAJNEESH; KUMAR, S. *et al.* Post kala-azar dermal leishmaniasis in the Indian sub-continent: challenges and strategies for elimination. *Frontiers in Immunology*, v. 14, article ID 1236952, p. 1-10, 2023.

KUSHWAHA, V.; CAPALASH, N. Evaluation of immunomodulatory potential of recombinant histidyl-tRNA synthetase (rLdHisRS) protein of *Leishmania donovani* as a vaccine candidate against visceral leishmaniasis. *Acta Tropica*, v. 241, article ID 106867, 2023.

- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LAGO, T.S.; SILVA, J.A.; LAGO, E.L.; CARVALHO, E.M.; ZANETTE, D.L.; CASTELUCCI, L.C. The miRNA 361-3p, a regulator of GZMB and TNF, is associated with therapeutic failure and longer time healing of cutaneous leishmaniasis caused by *L. (viannia) braziliensis*. *Frontiers in Immunology*, v. 9, article ID 2621, p. 1-9, 2018.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (ed.). *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press, 1972. p. 1-121.
- LANDUCCI, E.C.; ANTUNES, E.; DONATO, J.L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S. *et al.* Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. *British Journal of Pharmacology*, v. 114, n. 3, p. 578-583, 1995.
- LANDUCCI, E.C.; TOYAMA, M.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E. *et al.* Effect of crotapotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A2. *Toxicon*, v. 38, n. 2, p. 199-208, 2000.
- LAURE, C.J. Die Primärstruktur des Crotaaminins. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, v. 356, p. 213-215, 1975.
- LEME, A.S.; LICHTENSTEIN, A.; ARANTES-COSTA, F.M.; LANDUCCI, E.C.; MARTINS, M.A. Acute lung injury in experimental pancreatitis in rats: pulmonary protective effects of crotapotin and N-acetylcysteine. *Shock*, v. 18, n. 5, p. 428-433, 2002.
- LI, W.; SHI, S.; YANG, S. On integrability of the Nosé–Hoover oscillator and generalized Nosé–Hoover oscillator. *International Journal of Geometric Methods in Modern Physics*, v. 19, n. 8, article ID 2250117, 2022.
- LIMA, G.S. *Estudo da atividade tripanossomicida e leishmanicida de extrato, frações e terpenos de Croton cajucara Benth.* 2014. 59 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2014.
- LIMA, T.S.; CATANEO, S.C.; IRITUS, A.C.C; SAMPAIO, S.C.; DELLA-CASA, M.S.; CIRILLO, M.C. Crotoxin, a rattlesnake toxin, induces a long-lasting inhibitory effect on phagocytosis by neutrophils. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, v. 237, n. 10, p. 1219-1230, 2012.
- LIN, Y.; PAN, D.; LI, J.; ZHANG, L.; SHAO, X. Application of Berendsen barostat in dissipative particle dynamics for nonequilibrium dynamic simulation. *Journal of Chemical Physics*, v. 146, n. 12, article ID 124108, 2017.
- LINNAEU, C. *Systema naturae per regna tria naturae*. 13. ed. v. 7. Viena: Typis Ioannis Thomae, 1767.
- LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 22, n. 4, p. 189-195, 2011.
- LOUREIRO, J.R. Purificação proteica. *Actas de Bioquímica*, v. 5, p. 97-109, 1991.
- LUNA, E.J.A.; CAMPOS, S.R.S.L.C. Vaccine development against neglected tropical diseases. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 36, supl. 2, article ID e00215720, p. 1-14, 2020.
- MA, Q. Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome: structure, molecular activation, and inhibitor-NLRP3 interaction. *Pharmacological Reviews*, v. 75, n. 3, p. 487-520, 2023.

MAAMRI, S.; BENAROUS, K.; YOUSFI, M. Identification of 3-methoxycarpachromene and masticadienonic acid as new target inhibitors against trypanothione reductase from *Leishmania infantum* using molecular docking and ADMET prediction. *Molecules*, v. 26, n. 11, article ID 3335, p. 1-10, 2021.

MACEDO, J.M.; LIMA, A.M.; KAYANO, A.M.; SOUZA, M.F.; OLIVEIRA, I.S.; GÓMEZ GARAY, A.F. *et al.* Literature review on *Crotalus durissus terrificus* toxins: from a perspective of structural biology and therapeutic applications. *Current Protein & Peptide Science*, v. 24, n. 7, p. 536-550, 2023.

MACEDO, J.M.; SOUZA, M.F.; LIMA, A.M.; FRANCISCO, A.F.; KAYANO, A.M.; GUSMÃO, M.E.M.L. *et al.* Molecular interaction assays *in silico* of crotapotin from *Crotalus durissus terrificus* against the molecular target trypanothione reductase from *Leishmania braziliensis*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 31, article ID e20240049, 2025.

MAECKER, H.T.; MCCOY, J.P.; NUSSENBLATT, R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, n. 3, p. 191-200, 2012.

MAGALHÃES, R.A.; RIBEIRO, M.M.F.; REZENDE, N.A.; AMARAL, C.F.S. Rhabdomyolysis following *Crotalus durissus terrificus* snake bite. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 28, n. 3, p. 228-233, 1986.

MANN, S.; FRASCA, K.; SCHERRER, S.; HENAO-MARTÍNEZ, A.F.; NEWMAN, S.; RAMANAN, P. *et al.* A review of leishmaniasis: current knowledge and future directions. *Current Tropical Medicine Reports*, v. 8, n. 2, p. 121-132, 2021.

MARQUES, O.A.V.; ETEROVIC, A.; SAZIMA, I. *Serpentes da Mata Atlântica: guia ilustrado para a Serra do Mar*. Ribeirão Preto: Holos, 2001.

MARTÍNEZ, D.Y.; VERDONCK, K.; KAYE, P.M.; ADAUI, V.; POLMAN, K.; LLANOS-CUENTAS, A. *et al.* Tegumentary leishmaniasis and coinfections other than HIV. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 3, article ID e0006125, p. 1-20, 2018.

MATADAMAS-MARTÍNEZ, F.; HERNÁNDEZ-CAMPOS, A.; TÉLLEZ-VALENCIA, A.; VÁZQUEZ-RAYGOZA, A.; COMPARÁN-ALARCÓN, S.; YÉPEZ-MULIA, L. *et al.* *Leishmania mexicana* trypanothione reductase inhibitors: computational and biological studies. *Molecules*, v. 24, n. 18, article ID 3216, p. 1-18, 2019.

MATHISON, B.A.; BRADLEY, B.T. Review of the clinical presentation, pathology, diagnosis, and treatment of leishmaniasis. *Laboratory Medicine*, v. 54, n. 4, p. 363-371, 2023.

MCGWIRE, B.S.; SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM: An International Journal of Medicine*, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2014.

MEIRELES, C.B.; MAIA, L.C.; SOARES, G.C.; TEODORO, I.P.P.; GADELHA, M.S.V.; SIVA, C.G.L. *et al.* Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. *Acta Tropica*, v. 172, p. 240-254, 2017.

MELGAREJO-GIMÉNEZ, A.R. Criação e manejo de serpentes. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. (org.). *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. p. 175-199.

MELOS, J.L.R.; ECHEVARRIA, A. Sistemas enzimáticos de tripanossomatídeos como potenciais alvos quimioterápicos. In: PINTO, A.C.; DA SILVA, F.C. (org.). *Doenças*

negligenciadas: coletânea de artigos da Revista Virtual de Química. Rio de Janeiro: E-papers, 2015. p. 52-67.

MIRANDA, L.F.C.; PACHECO, R.S.; PIMENTEL, M.I.F.; SALGUEIRO, M.M.; SILVA, A.F.; MELLO, C.X. *et al.* Geospatial analysis of tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro state, Brazil from 2000 to 2015: species typing and flow of travelers and migrants with leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 11, article ID e0007748, 2019.

MITTAL, M.K.; MISRA, S.; OWAIS, M.; GOYAL, N. Expression, purification, and characterization of *Leishmania donovani* trypanothione reductase in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, v. 40, n. 2, p. 279-286, 2005.

MOHAMED ABD EL-AZIZ, T.; SOARES, A.G.; STOCKAND, J.D. Snake venoms in drug discovery: valuable therapeutic tools for life saving. *Toxins (Basel)*, v. 11, n. 10, article ID 564, p. 1-25, 2019.

MOHAMMADI, A.M.; DUTHIE, M.S.; REED, S.G.; JAVADI, A.; KHAMESIPOUR, A. Evolution of antigen-specific immune responses in cutaneous leishmaniasis patients. *Parasite Immunology*, v. 43, n. 4, article ID e12814, 2021.

MOHAMMADI, A.M.; JAVADI, A.; FIROOZ, A.; KHAMESIPOUR, A. Comparison of cytokine profile of IFN- γ , IL-5 and IL-10 in cutaneous leishmaniasis using PBMC vs. whole blood. *Iranian Journal of Microbiology*, v. 11, n. 5, p. 431-439, 2019.

MORAIS, V.; BERASAIN, P.; IFRÁN, S.; CARREIRA, S.; TORTORELLA, M.N.; NEGRÍN, A. *et al.* Humoral immune responses to venom and antivenom of patients bitten by *Bothrops* snakes. *Toxicon*, v. 59, n. 2, p. 315-319, 2012.

MOREIRA, A.M. *et al.* Aspectos fundamentais da leishmaniose cutânea no Brasil. In: TOLEDO, M.M. *Ações de saúde e geração de conhecimento nas ciências médicas 3*. Ponta Grossa: Atena, 2020. p. 69-79.

MÜLLER, J.; HEMPHILL, A. Drug target identification in protozoan parasites. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 11, n. 8, p. 815-824, 2016.

NASCIMENTO, M.T.; VIANA, D.L.; PEIXOTO, F.C.; ARRUDA, S.M.; CARVALHO, E.M.; CARVALHO, L.P. Prostaglandin E2 contributes to *L. braziliensis* survival and therapeutic failure in cutaneous leishmaniasis. *Emerging Microbes & Infections*, v. 12, n. 2, article ID 2261565, p. 1-9, 2023.

NEVES, C.L.; BARBOSA, C.M.V.; RANÉIA-SILVA, P.A.; FAQUIM-MAURO, E.L.; SAMPAIO, S.C. Crotoxin modulates macrophage phenotypic reprogramming. *Toxins (Basel)*, v. 15, n. 10, article ID 616, p. 1-16, 2023.

OLIVEIRA, L.A. *Prospecção das funções biotecnológicas da crotapotina e suas subunidades em protozoários, bactérias e células de mamíferos*. 2022. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

OLIVEIRA, R.B.; ZANI, C.L.; FERREIRA, R.S.; LEITE, R.S.; ALVES, T.; SILVA, T.H.A. *et al.* Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of arylfurans as potential trypanothione reductase inhibitors. *Química Nova*, v. 31, n. 2, p. 261-267, 2008.

PACE, D. Leishmaniasis. *Journal of Infection*, v. 69, suppl. 1, p. S10-S18, 2014.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Crystal structure and pair potentials: a molecular-dynamics study. *Physical Review Letters*, v. 45, n. 14, p. 1196-1199, 1980.

PASSERO, L.F.D.; TOMOKANE, T.Y.; CORBETT, C.E.P.; LAURENTI, M.D.; TOYAMA, M.H. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. *Parasitology Research*, v. 101, n. 5, p. 1365-1371, 2007.

PASSERO, L.F.D.; LAURENTI, M.D.; TOMOKANE, T.Y.; CORBETT, C.E.P.; TOYAMA, M.H. The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Parasitology Research*, v. 102, n. 5, p. 1025-1033, 2008.

PEREIRA, L.O.R.; SOUSA, C.S.; RAMOS, H.C.P.; TORRES-SANTOS, E.C.; PINHEIRO, L.S.; ALVES, M.R. *et al.* Insights from *Leishmania (Viannia) guyanensis* in vitro behavior and intercellular communication. *Parasites & Vectors*, v. 14, n. 1, article ID 556, p. 1-14, 2021.

PIANKA, E.R. Convexity, desert lizards, and spatial heterogeneity. *Ecology*, v. 47, n. 6, p. 1055-1059, 1966.

PIMENTA, L.A.; ALMEIDA, M.E.S.; BRETONES, M.L.; CIRILLO, M.C.; CURI, R.; SAMPAIO, S.C. Crotoxin promotes macrophage reprogramming towards an antiangiogenic phenotype. *Sci Rep*, v. 9, article ID 4281, 2019.

PINART, M.; RUEDA, J.-R.; ROMERO, G.A.S.; PINZÓN-FLÓREZ, C.E.; OSORIO-ARANGO, K.; MAIA-ELKHOURY, A.N.S. *et al.* Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 8, n. 8, article ID CD004834, 2020.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

PIRES, W.L.; CASTRO, O.B.; KAYANO, A.M.; SETÚBAL, S.S.; PONTES, A.S.; NERY, N.M. *et al.* Effect of BjcUL, a lectin isolated from *Bothrops jararacussu*, on human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology In Vitro*, v. 41, p. 30-41, 2017.

PRADHAN, S.; SCHWARTZ, R.A.; PATIL, A.; GRABBE, S.; GOLDUST, M. Treatment options for leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 47, n. 3, p. 516-521, 2022.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESÚS, M.N.; MARZA, P.C. Antimonials employed in the treatment of leishmaniasis: the state of the art. *Química Nova*, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REGO, C.M.A.; FRANCISCO, A.F.; BOENO, C.N.; PALOSCHI, M.V.; LOPES, J.A.; SILVA, M.D.S. *et al.* Inflammasome NLRP3 activation induced by Convulxin, a C-type lectin-like isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, article ID 4706, 2022.

ROSENFELD, G. Acidentes por animais peçonhentos: serpentes, aranhas, escorpiões. In: VERONESI, R. (org.). *Doenças infecciosas e parasitárias*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 951-962.

RÜBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 270, n. 3, p. 274-288, 1971.

SÁ, K.S.G.; AMARAL, L.A.; RODRIGUES, T.S.; ISHIMOTO, A.Y.; ANDRADE, W.A.C.; ALMEIDA, L. *et al.* Gasdermin-D activation promotes NLRP3 activation and host resistance to *Leishmania* infection. *Nature Communications*, v. 14, n. 1, article ID 1049, p. 1-19, 2023.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3. ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMPAIO, S.C.; HYSLOP, S.; FONTES, M.R.M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; ZAMBELLI, V.O.; MAGRO, A.J. *et al.* Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. *Toxicon*, v. 55, n. 6, p. 1045-1060, 2010.

SANTOS, D.; CAMPOS, T.M.; SALDANHA, M.; OLIVEIRA, S.C.; NASCIMENTO, M.; ZAMBONI, D.S. *et al.* IL-1 β production by intermediate monocytes is associated with immunopathology in cutaneous leishmaniasis. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 138, n. 5, p. 1107-1115, 2018.

SANTOS, M.C.; MARTINS, M.; BOECHAT, A.L.; SÁ NETO, R.P.; OLIVEIRA, M.E. *Serpentes de interesse médico da Amazônia*. Manaus: Universidade do Amazonas, 1995.

SARAVANAMUTHU, A.; VICKERS, T.J.; BOND, C.S.; PETERSON, M.R.; HUNTER, W.N.; FAIRLAMB, A.H. Two interacting binding sites for quinacrine derivatives in the active site of trypanothione reductase: a template for drug design. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 28, p. 29493-29500, 2004.

SCORZA, B.M.; CARVALHO, E.M.; WILSON, M.E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 6, article ID 1296, p. 1-26, 2017.

SERENO, D.; AKHOUNDI, M.; DORKELD, F.; OURY, B.; MOMEN, H.; PERRIN, P. What pre-Columbian mummies could teach us about South American leishmaniasis? *Pathogens and Disease*, v. 75, n. 3, 2017.

SILVA, J.F.M., QUEIROZ, A.C.; LEITE, A.B.; SILVA, J.K.S.; ARAÚJO, M.V.; RODRIGUES, E.E.S. *et al.* Leishmaniasis: standard treatment and recent advances. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 9, n. 10, p. 254-257, 2017.

SILVA-JÚNIOR, L.N.; ABREU, L.S.; RODRIGUES, C.F.B.; GALIZIO, N.C.; AGUIAR, W.S.; SERINO-SILVA, C. *et al.* Geographic variation of individual venom profile of *Crotalus durissus* snakes. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 26, article ID e20200016, p. 1-16, 2020.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

SINGH, B.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. *Vaccine*, v. 30, n. 26, p. 3834-3842, 2012.

SINGH, R.K.; PANDEY, H.P.; SUNDAR, S. Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. *The Indian Journal of Medical Research*, v. 3, p. 331-440, 2006.

SLOTTA, K.; FRAENKEL-CONRAT, H. Two active proteins from rattlesnake venom. *Nature*, v. 142, n. 213, 1938.

SULLIVAN, F.X.; SHAMES, S.L.; WALSH, C.T. Expression of *Trypanosoma congolense* trypanothione reductase in *Escherichia coli*: overproduction, purification, and characterization. *Biochemistry*, v. 28, n. 12, p. 4986-4992, 1989.

SUNDAR, S.; JHA, T.K.; THAKUR, C.P.; ENGEL, J.; SINDERMAN, H.; FISCHER, C. *et al.* Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*, v. 347, n. 22, p. 1739-1746, 2002.

TASIMA, L.J.; SERINO-SILVA, C.; HATAKEYAMA, D.M.; NISHIDUKA, E.S.; TASHIMA, A.K.; SANT'ANNA, S.S. *et al.* Crotonamine in *Crotalus durissus*: distribution according to subspecies and geographic origin, in captivity or nature. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 26, article ID e20190053, p. 1-14, 2020.

TEIXEIRA, L.A.; COSTA, L.T.; ZAHER, E.H. Vital Brazil: um pioneiro na prática da ciência cidadã. *Cadernos de História da Ciência*, v. 10, n. 1, p. 33-55, 2014.

TOZETTI, A.M. *Uso do ambiente, atividade e ecologia alimentar da cascavel (Crotalus durissus) em área de Cerrado na região de Itirapina, SP*. 2006. 93 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

TOZETTI, A.M.; MARTINS, M. Habitat use by the South-American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in south-eastern Brazil. *Journal of Natural History*, v. 42, n. 19-20, p. 1435-1444, 2008.

TUNES, L.G.; MORATO, R.E.; GARCIA, A.; SCHMITZ, V.; STEINDEL, M.; CORRÊA-JUNIOR, J.D. *et al.* Preclinical gold complexes as oral drug candidates to treat leishmaniasis are potent trypanothione reductase inhibitors. *ACS Infectious Diseases*, v. 6, n. 5, p. 1121-1139, 2020.

TURCANO, L.; TORRENTE, E.; MISSINEO, A.; ANDREINI, M.; GRAMICCIA, M.; DI MUCCIO, T. *et al.* Identification and binding mode of a novel Leishmania Trypanothione reductase inhibitor from high throughput screening. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 11, article ID e0006969, 2018.

VALENTIM SILVA, J.R.; BARROS, N.B.; MACEDO, S.R.A.; FERREIRA, A.S.; DILL, L.S.M.; ZANCHI, F.B. *et al.* A natural cell-penetrating nanopeptide combined with pentavalent antimonial as experimental therapy against cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, v. 217, article ID 107934, 2020.

VASCONCELOS, J.M.; GOMES, C.G.; SOUSA, A.; TEIXEIRA, A.B.; LIMA, J.M. American tegumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. *RBAC*, v. 50, n. 3, p. 221-227, 2018.

VENKATESAN, S.K.; SHUKLA, A.K.; DUBEY, V.K. Molecular docking studies of selected tricyclic and quinone derivatives on trypanothione reductase of *Leishmania infantum*. *Journal of Computational Chemistry*, v. 31, p. 2463-2475, 2010.

VOLPEDO, G.; PACHECO-FERNANDEZ, T.; HOLCOMB, E.A.; CIPRIANO, N.; COX, B.; SATOSKAR, A.R. Mechanisms of immunopathogenesis in cutaneous leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, article ID 685296, p. 1-16, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Leishmaniasis*. 12 jan. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 17 jan. 2025.

XAVIER, C.V.; SETÚBAL, S.S.; LACOUTH-SILVA, F.; PONTES, A.S.; NERY, N.M.; CASTRO, O.B. *et al.* Phospholipase A₂ inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* rattlesnake: effects on human peripheral blood mononuclear cells and human neutrophils cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 105 (Pt 1), p. 1117-1125, 2017.

YANG, T.; WU, J.C.; YAN, C.; WANG, Y.; LUO, R.; GONZALES, M.B. *et al.* Virtual screening using molecular simulations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 79, n. 6, p. 1940-1951, 2011.

ZHENG, L.; LEUNG, E.T.Y.; WONG, H.K.; LUI, G.; LEE, N.; TO, K.-F. *et al.* Unraveling methylation changes of host macrophages in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinburgh)*, v. 98, p. 139-148, 2016.

Review > [Curr Protein Pept Sci. 2023;24\(7\):536-550. doi: 10.2174/1389203724666230607105355.](#)

Literature Review on *Crotalus durissus terrificus* Toxins: From a Perspective of Structural Biology and Therapeutic Applications

Jamile Mariano Macedo ^{1 2 3}, Anderson Maciel de Lima ², Anderson Makoto Kayano ^{2 4},
Mateus Farias Souza ^{2 5}, Iolanda da Silva Oliveira ², Ana Fidelina Gomez Garay ⁶,
Anderson Maciel Rocha ⁷, Juliana Pavan Zuliani ^{8 9}, Andreimar Martins Soares ^{2 10}

Affiliations + expand

PMID: 37287292 DOI: [10.2174/1389203724666230607105355](#)

Abstract

Background: The venom of *Crotalus durissus terrificus*, as well as its fractions, has intrigued research groups worldwide who are working to isolate, characterize, and find possible biotechnological applications. A number of studies have elucidated that these fractions and their derivatives possess pharmacological properties, which can enable the development of new drug prototypes with anti-inflammatory, antinociceptive, antitumor, antiviral, and antiparasitic applications.

Objective: This review presents a systematic study on *Crotalus durissus terrificus*, the most notable crotalid subspecies in South America, focusing on the composition, toxicological mechanisms, structural aspects, and applications of the main venom toxins (convulxin, gyroxin, crotamine, crotoxin, and their subunits).

> J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2024 Mar 18;30:e20230062.
doi: 10.1590/1678-9199-JVATID-2023-0062. eCollection 2024.

Cytotoxic effects of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake in canine mammary tumor cell lines

Giovana Pedro ¹, Felipe César da Silva Brasileiro ¹, Jamile Mariano Macedo ^{2 3 4},
Andreimar Martins Soares ^{2 3 4 5 6}, Gabriel Caporale Mafra ¹, Carlos Eduardo Fonseca Alves ¹,
Renée Laufer-Amorim ^{1 5 6}

Affiliations + expand

PMID: 38505509 PMCID: PMC10950368 DOI: 10.1590/1678-9199-JVATID-2023-0062

Abstract

Background: Mammary gland tumors are the most prevalent neoplasm in intact female dogs, and they are good natural models to study comparative oncology. Most canine mammary malignancies, as in women, are commonly refractory to conventional therapies and demand continuous new therapeutic approaches. *Crotalus durissus terrificus*, also called rattlesnake, has more than 60 different proteins in its venom with multiple pharmaceutical uses, such as antitumor, antiviral, and antimicrobial action. Crotoxin, a potent β -neurotoxin formed by the junction of two subunits, a basic subunit (CB-PLA₂) and an acidic subunit (crotopotin), has already been reported to have anticancer properties in different types of cancers.

Methods: In this work, we describe the cytotoxic potential of crotoxin and its subunits compared to doxorubicin (drug of choice) in two canine mammary carcinoma cell lines.

Results: Crotoxin, CB-PLA₂, crotalic venom, and doxorubicin decreased cell viability and the ability to migrate in a dose-dependent manner, and crotopotin did not present an antitumoral effect. For all compounds, the predominant cell death mechanism was apoptosis. In addition, crotoxin did not show toxicity in normal canine mammary gland cells.

Conclusion: Therefore, this work showed that crotoxin and CB-PLA₂ had cytotoxic activity, migration inhibition, and pro-apoptotic potential in canine mammary gland carcinoma cell lines, making their possible use in cancer research.

Keywords: Biological compounds; Comparative oncology; *Crotalus durissus terrificus* venom; Mammary tumor.

[PubMed Disclaimer](#)

Biomedical and Biotechnological Potential of Animal Venoms: Bothrops Snake Venoms and their Antimicrobial Applications

Raissa Reimann¹, Breno Barreto¹, Filippo Romano¹, Jade Medeiros¹, Bruna C Camargo¹, Josiel N da Silva¹, Ana Luiza B Soares¹, Mateus F de Souza^{2 3}, Jamile M Macedo^{2 3}, Anderson M Kayano^{2 3 4}, Juliana P Zuliani³, Ana N de Oliveira³, Saulo L da Silva^{3 5}, Rafaela Diniz-Sousa^{1 3}, Andreimar M Soares^{1 2 3 3}

Affiliations + expand

PMID: 38676530 DOI: 10.2174/0109298673290981240416070550

Abstract

The pursuit of novel treatment alternatives to address the accumulated resistance to antimicrobials over the years has prompted the scientific community to explore biodiversity, particularly animal venom, as a potential source of new antimicrobial drugs. Snake venoms, with their complex mixtures of components, are particularly promising targets for investigation in this regard. The search for novel molecules exhibiting antimicrobial activity against multidrug-resistant strains is of paramount importance for public health and numerous research groups worldwide. High expectations within the healthcare field are supported by the scientific literature, which highlights the potential development of innovative drugs through in vivo and in vitro application, depending on dose titration. Snake venoms and their molecules and peptides offer exponential possibilities for biotechnological

> [Phytochemistry](#). 2025 Jul;235:114446. doi: 10.1016/j.phytochem.2025.114446. Epub 2025 Feb 14.

Production of two novel antifungal peroxidase isoenzymes from *Tabernaemontana catharinensis* using a bubble-column bioreactor

Leonice Dos Reis-Costa ¹, Jamile M Macedo ², Anderson M Lima ³, Mateus F Souza ³, Erika C S Araújo ⁴, Silvana Marcussi ⁵, Juliana Coppede ¹, Paulo S Pereira ¹, Miriam V Lourenço ¹, Marlei B Pasotto ⁶, Jonas Contiero ⁷, Suzelei C França ¹, Marcos R M Fontes ⁸, Andreimar M Soares ⁹, Aleff Ferreira Francisco ¹⁰

Affiliations + expand

PMID: 39956444 DOI: [10.1016/j.phytochem.2025.114446](#)

Abstract

Plant peroxidases are enzymes with significant antioxidative properties and catalytic versatility, making them valuable for various applications in biotechnology. However, their commercial use is often constrained by inefficient production methods. In this study, we isolated and characterized two peroxidase isoenzymes, TcPOX-I and TcPOX-II, from *Tabernaemontana catharinensis* using scalable plant cell culture techniques, offering a sustainable alternative to traditional enzyme production methods. By successfully scaling up cultures from flasks to a 3 L bubble-column bioreactor equipped with optimized aeration, aseptic conditions, and real-time monitoring, we enhanced peroxidase production efficiency. Although biomass in the bioreactor was lower than in flask cultures, peroxidase secretion per unit of mass was higher, demonstrating that the bioreactor conditions favored enzyme production over cell proliferation. TcPOX-I and II were isolated via size-exclusion chromatography,

➤ J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2025 Apr 4;31:e20240049.
doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2024-0049. eCollection 2025.

Molecular interaction assays *in silico* of crotapotin from *Crotalus durissus terrificus* against the molecular target trypanothione reductase from *Leishmania braziliensis*

Jamile Mariano Macedo^{1 2 3 4}, Mateus Farias Souza^{2 3 4}, Anderson Maciel Lima^{2 3 4}, Aleff Ferreira Francisco^{2 4}, Anderson Makoto Kayano^{2 4 5}, Maria Elisabeth Moreira de Lima Gusmão^{2 4}, Erika Crhistina Santos de Araújo^{6 7}, Guilherme Henrique Marchi Salvador⁸, Marcos Roberto de Mattos Fontes^{4 8 9}, Juliana Pavan Zuliani^{3 4 7 10}, Andreimar Martins Soares^{2 3 4 10}

Affiliations + expand

PMID: 40190838 PMCID: PMC11970842 DOI: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2024-0049

Abstract

Background: Leishmaniasis is a neglected disease that mainly affects impoverished populations and receives limited attention from governments and research institutions. Current treatments are based on antimonial therapies, which present high toxicity and cause significant side effects, such as cardiotoxicity and hepatotoxicity. This study proposes using crotapotin, isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom, as a potential inhibitor of the enzyme trypanothione reductase from *Leishmania braziliensis* (LbTR).