

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Caracterização bioquímica e avaliação *in vitro* da ativação de fibroblastos e do potencial leishmanicida de uma L-aminoácido oxidase (LAAO) da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Gisele Adriano Wiesel

Orientadora: Prof^a Dr^a Eliane C. A. Braga

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 02/09/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Ribeirão Preto

2016

RESUMO

WIEZEL, G. A. **Caracterização bioquímica e avaliação *in vitro* da ativação de fibroblastos e do potencial leishmanicida de uma L-aminoácido oxidase (LAAO) da peçonha de *Crotalus durissus terrificus***. 2016. 145 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Acidentes causados por animais peçonhentos representam um grave problema de saúde pública, principalmente em áreas de difícil acesso da população ao serviço de saúde. No Brasil, o gênero *Crotalus* é o gênero de serpente cuja peçonha apresenta o maior índice de letalidade. As L-aminoácido oxidases (LAAOs) estão presentes na peçonha crotálica e são flavoenzimas que catalisam a oxidação de L-aminoácidos, produzindo, concomitantemente, peróxido de hidrogênio e amônia. LAAOs têm demonstrado atividade citotóxica, antimicrobiana, antitumoral, antiparasitária e na agregação plaquetária. Os objetivos desse estudo incluíram o isolamento e a caracterização bioquímica da LAAO de *C. d. terrificus*, assim como a avaliação de seu potencial leishmanicida e da ativação de fibroblastos. Foram desenvolvidos dois protocolos para isolamento da LAAO. O primeiro consistiu em cromatografias de troca catiônica, filtração molecular e de interação hidrofóbica. O segundo protocolo diferiu do primeiro na terceira etapa (cromatografia de afinidade). Cromatografia de fase reversa da LAAO isolada demonstrou um alto grau de pureza e a separação do cofator FAD. A massa molecular da LAAO foi determinada por espectrometria de massas MALDI-TOF (58.702,196 Da). A caracterização estrutural dessa LAAO também incluiu a dedução da sua sequência primária e a localização do sítio de glicosilação e das ligações dissulfeto através de espectrometria de massas em equipamentos LC-MS/MS com diferentes tipos de fragmentação (HCD, ETD e EThcD). A sequência primária (498 resíduos) foi obtida após digestão da LAAO com diferentes proteases e o sítio de glicosilação foi localizado na Asn361. Análise por SDS-PAGE da LAAO em condições reduzida e reduzida/deglicosilada mostrou que cerca de 5% da massa da proteína é relativa à presença de açúcar. As ligações dissulfeto (Cys10-Cys171 e Cys331-Cys412) foram localizadas após digestão da enzima em pH ácido e análise por LC-MS/MS. A avaliação qualitativa da especificidade de substratos mostrou preferência por L-aminoácidos hidrofóbicos e, a ordem de especificidade (L-Phe>L-Leu>L-Met>L-Trp>L-Ile) foi determinada através da cinética enzimática. A estabilidade da LAAO foi avaliada em diferentes temperaturas, tempos e condições de armazenamento. A enzima mostrou grande perda de atividade ao longo do tempo, sendo que a liofilização e o congelamento a -20 °C inibiram sua atividade completamente. A estabilidade térmica, avaliada pela técnica do *Termofluor*, mostrou que a LAAO é mais estável na presença de pH ácido, diferentes concentrações de substratos e ausência de NaCl. Promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram estimulados com a LAAO (55 mUAE) e cerca de 30% dos parasitas foram mortos. Fibroblastos L929 também foram estimulados com a LAAO e em baixa concentração da enzima (1,83 mUAE) a viabilidade celular foi próxima de zero. Nas concentrações sem morte celular significativa, a ativação dos fibroblastos foi avaliada através da dosagem de óxido nítrico e citocinas, mas, em nenhum dos casos, houve ativação das células e maior produção desses compostos. Portanto, no presente estudo, foi isolada e caracterizada uma LAAO de *C. d. terrificus* que apresentou ação contra promastigotas de *L. amazonensis* e alta citotoxicidade para fibroblastos, sem causar a ativação dessas células.

Palavras-chave: *Crotalus durissus terrificus*. LAAO. Flavoproteínas. Modificações pós-traducionais. Estabilidade térmica. Citotoxicidade. Atividade leishmanicida.

1. INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos representam um grave problema de saúde em países tropicais e subdesenvolvidos, principalmente em áreas mais remotas e de difícil acesso da população ao sistema de saúde. Todo o dano causado pelas peçonhas de serpentes é decorrente de diferentes classes de componentes proteicos (enzimáticos e não enzimáticos) e compostos orgânicos e minerais, que, em conjunto, formam uma mistura complexa capaz de afetar inúmeros processos biológicos.

Todavia, essas peçonhas podem ser estudadas não apenas para o desenvolvimento de anti-venenos mais específicos para o tratamento dos acidentes ofídicos, como também as toxinas dessas peçonhas podem ser potenciais ferramentas para estudos de alvos e interações moleculares, vias envolvidas na hemostasia, mecanismos fisiológicos e ainda o desenvolvimento de novos fármacos e reagentes para diagnóstico.

Em 2003, aproximadamente, 40% dos medicamentos no mercado eram provenientes de fontes naturais e 3% oriundos de fontes animais. Quando são analisados os antibióticos e antitumorais, esse percentual chega até 70% (CALIXTO, 2003). O presente trabalho tem como objetivos o isolamento e a caracterização bioquímica da uma L-aminoácido oxidase presente na peçonha da serpente brasileira *Crotalus durissus terrificus*, bem como a avaliação *in vitro* da ativação de fibroblastos e da atividade leishmanicida causadas por essa enzima, tendo como alvo sua potencial aplicação biotecnológica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As serpentes representam um dos grupos de animais mais antigos do mundo. Acredita-se que tenham surgido no final do período Jurássico, há mais de 135 milhões de anos atrás (RAGE¹, 1994 apud FRANCO, 2003). Estima-se que existam 3.567 espécies de serpentes distribuídas pelo planeta Terra (UETZ, 2015), das quais aproximadamente 600 espécies são peçonhentas e cerca de 200 espécies apresentam importância médica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

As serpentes peçonhentas estão amplamente distribuídas no mundo, com exceção das regiões mais frias (como a região da Cordilheira dos Andes na América do Sul, o Polo Sul, a Groenlândia e norte da América do Norte, Europa e Ásia) e de Madagascar e Nova Zelândia (HARRISON et al., 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

2.1. Serpentes peçonhentas brasileiras e envenenamento

Devido à frequência com que ocorrem e à morbimortalidade que causam, os acidentes ofídicos são considerados um sério problema de saúde pública em países tropicais (PINHO; PEREIRA, 2001). Um estudo realizado por Harrison et al. (2009) coloca o envenenamento por serpentes como “uma doença da pobreza”, pois a associação negativa entre as mortes por acidentes ofídicos e os gastos do governo com a saúde é mais elevada nos países que são menos capazes de lidar com os custos financeiros de uma picada de serpente (HARRISON et al., 2009).

As serpentes peçonhentas brasileiras estão agrupadas em duas famílias: Viperidae e Elapidae. Os gêneros *Leptomicrurus* e *Micrurus* pertencem à família Elapidae e os gêneros *Bothrops* e *Bothrocophias* (anteriormente denominados apenas *Bothrops*), *Crotalus* e *Lachesis* pertencem à família Viperidae (COSTA; BÉRNILS, 2014; FENWICK et al., 2009; WUSTER; BERNILS, 2011).

A peçonha é resultado do processo evolutivo de algumas serpentes, auxiliando na digestão de presas que, muitas vezes, possuem um tamanho maior do que elas. Portanto, os compostos presentes na peçonha têm múltiplas funções, incluindo imobilização, morte e digestão da presa. Em geral, essas peçonhas são misturas complexas de proteínas (com ou sem ação enzimática), peptídeos, compostos orgânicos e minerais, que afetam uma enorme

¹ RAGE, J. C. Origin and Evolution of Snakes. In: Bauchot, R. (Ed.). **Snakes, a natural history**. New York: Sterling Publishing Co., Inc., 1994. p. 26-33.

variedade de processos biológicos (BAZAA et al., 2005; CALVETE; MARCINKIEWICZ; SANZ, 2007; HAMZA et al., 2010; JUÁREZ; SANZ; CALVETE, 2004; SANZ et al., 2006;).

Segundo os dados de acidentes por animais peçonhentos do Ministério da Saúde (BRASIL, 2016) ainda sujeitos a revisão, no ano de 2015, foram notificados 15.458 acidentes por serpentes peçonhentas, dos quais 1.422 para o gênero *Crotalus*, 13.373 para *Bothrops*, 524 para *Lachesis* e 139 para *Micrurus* (Fig. 1A). *Crotalus* é o gênero de serpente brasileira que apresenta o maior índice de letalidade (Fig. 1B). Para esse mesmo ano, o índice foi de 1,55%, sendo seguido por *Lachesis* (1,34%) e *Bothrops* (0,39%). Para o gênero *Micrurus*, até o momento não foram observadas mortes decorrentes do envenenamento.

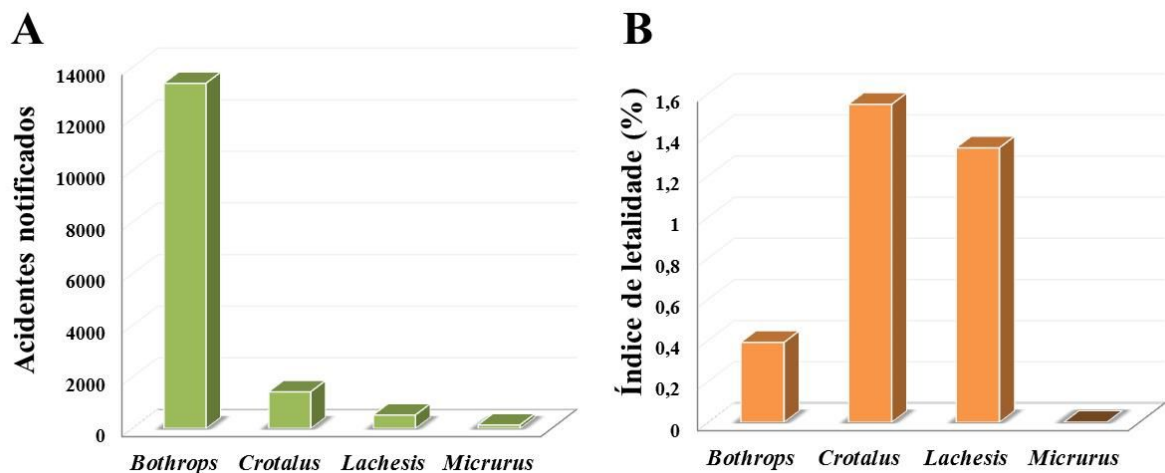


Figura 1. Acidentes causados por serpentes peçonhentas brasileiras. A) Número de acidentes notificados e **B)** Índice de letalidade para cada gênero de serpente peçonhenta. Dados do Ministério da Saúde brasileiro (BRASIL, 2016).

2.1.1. *Crotalus durissus terrificus*

O gênero *Crotalus*, no Brasil, é representado pela espécie *Crotalus durissus*, popularmente conhecida como cascavel (MELGAREJO, 2003). Essa espécie foi primeiramente identificada por Linnaeus em 1758 (KLAUBER, 1972, p. 35) e é subdividida em cinco subespécies: *C. d. terrificus*, *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. ruruima* e *C. d. marajoensis*, sendo a *C. d. terrificus*, a mais abundante no território brasileiro (Fig. 2).

As serpentes *Crotalus durissus* habitam áreas abertas, como savanas, e estão propensas a habitar áreas perturbadas por atividades humanas, incluindo áreas que sofreram com o desmatamento, como a da Mata Atlântica (DUARTE; MENEZES, 2013; SANT'ANNA; ABE, 2007;). A subespécie *C. d. terrificus* está distribuída pela região sul do

país, estendendo-se pelo oeste e até algumas áreas do Mato Grosso, Rondônia, Amazonas e Pará. As serpentes do gênero *Crotalus* são terrestres, robustas, pouco ágeis e sua característica mais marcante é a presença de uma estrutura denominada guizo na extremidade de sua cauda (Fig. 3) (MCDOWELL², 1987 apud LOURENÇO et al., 2013; MELGAREJO, 2003).

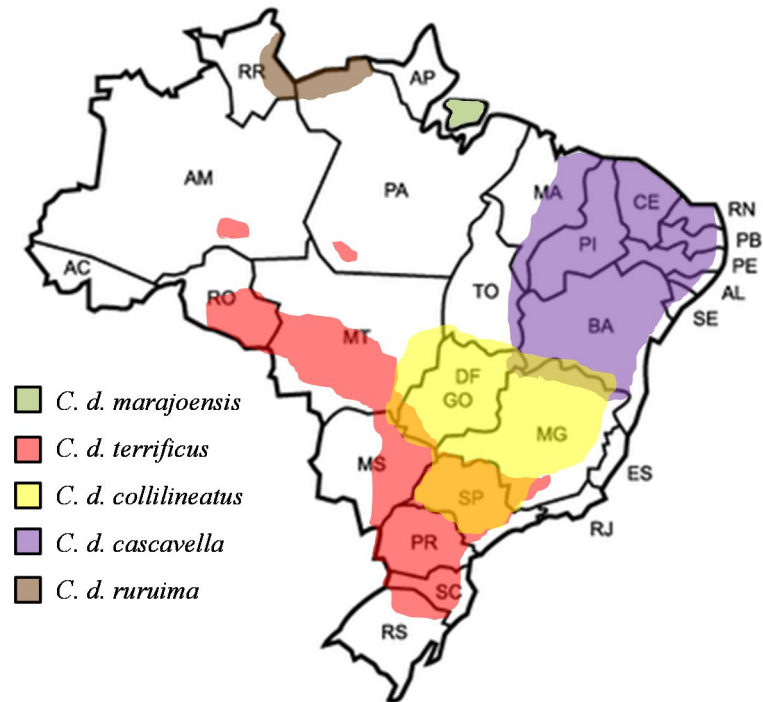


Figura 2. Distribuição geográfica das serpentes brasileiras do gênero *Crotalus*. Dados de distribuição com base nos trabalhos de MELGAREJO (2003) e Boldrini-França et al. (2010).



Figura 3. Espécime de *Crotalus durissus terrificus*. Arquivo pessoal.

² MCDOWELL, S. B. Systematics. In: SIEGEL, R. A., COLLINS, J. T., NOVAK, S. S. (Eds.), **Snakes: Ecology and Evolutionary Biology**. New York: Macmillan, 1987, p. 3–50.

A peçonha crotálica quase não produz lesão local. Essa peçonha apresenta, principalmente, ações neurotóxicas, miotóxicas e ação na coagulação sanguínea. Entre as manifestações clínicas, já foram relatadas: dor na região do pescoço, diminuição e até perda da visão, sonolência, obnubilação, ptose palpebral bilateral, intensa dor muscular generalizada, discreto edema muscular, insuficiência respiratória, cefaleia intensa, febre, hiper e/ou hipotensão acompanhada de taqui e/ou bradicardia e alterações renais e hematológicas (FERNANDES; AGUIAR; DAHER, 2008).

A peçonha de *C. d. terrificus* é composta principalmente por crotoxina e crotamina (CALVETE et al., 2010; FAURE et al., 1994). A crotamina é uma toxina com ação miotóxica que pode levar ao desenvolvimento da insuficiência renal aguda devido ao acúmulo nos túbulos renais da mioglobina liberada dos músculos. Já a crotoxina possui ação principalmente no sistema nervoso central, levando aos sintomas neurotóxicos apresentados durante o envenenamento por *Crotalus* e também pode ser responsável pela mio e nefrotoxicidade (CHANG; TSENG, 1978; FERNANDES; AGUIAR; DAHER, 2008; KATTAH et al., 2000; MONTEIRO et al., 2001). Outras classes de componentes também encontrados nessa peçonha são: L-aminoácido oxidase, serinoproteases, moléculas lectinas do tipo C símile, metaloproteases da classe P-III e peptídeos vasoativos (CALVETE et al., 2010).

2.2. L-aminoácido oxidases

As L-aminoácido oxidases (LAAOs) são flavoproteínas diméricas e foram descritas pela primeira vez em 1944 (ZELLER; MARITZ³, 1944 apud PAWELEK et al., 2000). Recentemente, as atividades funcionais de svLAAOs (LAAOs isoladas de peçonha de serpente, do inglês *snake venom LAAOs*) têm demonstrado grande interesse para diversas áreas como biologia molecular, bioquímica, fisiologia e medicina (ZULIANI et al., 2009).

As svLAAOs são responsáveis, pelo menos em parte, pela cor amarela da peçonha. Ainda não se sabe ao certo o papel dessa enzima durante o envenenamento, mas acredita-se que por atuarem na agregação plaquetária possam realçar as injúrias do envenenamento e por sua ação apoptótica causem morte dos tecidos atingidos (GUO et al., 2012; MOUSTAFA et

³ ZELLER, A. MARITZ, A. Über eine neue l-Aminosäure-oxydase. **Helvetica chimica acta**, v. 27, p. 1888-1903, 1944.

al., 2006; TEMPONE et al., 2001). Peçonhas secas apresentam, em geral, 3% ou menos de LAAO. Entretanto, algumas peçonhas apresentam quantidades superiores, como é o caso, por exemplo, das peçonhas de *Bothrops atrox* (10,5%) e *Calloselasma rhodostoma* (30%) (CALVETE et al., 2010; KOHLHOFF et al., 2012; PONNUDURAI; CHUNG; TAN, 1994; SANZ et al., 2008; ZELLER, 1977).

2.2.1. Características bioquímicas

As LAAOS são glicoproteínas diméricas e possuem como cofator o grupo FAD (flavina-adenina dinucleotídeo) ou FMN (flavina mononucleotídeo) interagindo através de ligações não covalentes com a enzima. Elas apresentam massa molecular entre 110 e 150 kDa na sua forma dimérica e entre 50 e 70 kDa na sua forma monomérica (FOX, 2013; GUO et al., 2012; ZULIANI et al., 2009). Acredita-se que a glicosilação seja responsável pela interação da enzima com células do hospedeiro, o que faria com que a liberação do peróxido de hidrogênio ficasse concentrada em um ponto da célula, levando a um dano mais rápido devido à alta concentração do peróxido liberado (GEYER et al., 2001; MOUSTAFA et al., 2006; PAWELEK et al., 2000; TORII et al., 2000).

O ponto isoelétrico apresentado por essas enzimas varia desde valores ácidos (4,4) até básicos (8,5) e em uma mesma peçonha podem coexistir formas ácidas, básicas e neutras de LAAOs. As isoformas de LAAOs podem ocorrer devido à codificação dessas enzimas por genes diferentes ou por diferentes padrões de glicosilação assumidos pelas proteínas codificadas por um mesmo gene. Existem peçonhas para as quais já foram descritas até cinco isoformas de LAAOs, como é o caso da peçonha de *Calloselasma rhodostoma* (ALI et al., 2013; GUO et al., 2012; HAYES; WELLNER, 1969; ZULIANI et al., 2009).

A estrutura das svLAAOs é altamente conservada e os protômeros dessas enzimas são compostos por três domínios: helicoidal, de ligação ao FAD e de ligação ao substrato. Entre os domínios helicoidal e de ligação ao substrato existe um funil através do qual o substrato consegue acesso ao sítio ativo da enzima. O domínio de ligação ao FAD é o único sítio redox da LAAO e está profundamente enterrado na estrutura da enzima, fazendo interações com resíduos de aminoácidos e com moléculas de água que são conservadas nos protômeros (MOUSTAFA et al., 2006; PAWELEK et al., 2000).

Está presente ainda na estrutura das svLAAOs um canal para entrada de O_2 , localizado entre os domínios helicoidal e de ligação ao FAD, e um canal para a saída de peróxido de hidrogênio, localizado no domínio de ligação ao substrato em uma região próxima à região N-terminal da proteína (MOUSTAFA et al., 2006).

2.2.2. Reação enzimática

As LAAOs catalisam a oxidação estereoespecífica de L-aminoácidos (Fig. 4). O L-aminoácido é oxidado a α -cetoácido via um intermediário iminoácido. Para a formação do intermediário, ocorre a abstração de um próton do L-aminoácido e a transferência de um hidreto para o cofator da enzima, que é reduzido. O intermediário formado, espontaneamente, é transformado em α -cetoácido, ocorrendo de modo simultâneo a formação de amônia. Durante a reoxidação do cofator para retornar à forma capaz de receber o hidreto, peróxido de hidrogênio é produzido a partir de oxigênio. Desse modo, a oxidação do L-aminoácido leva à produção de α -cetoácido, amônia e peróxido de hidrogênio (PAWELEK et al., 2000; POLLEGIONI; MOTTA; MOLLA, 2013; WELLNER; MEISTER, 1961). É interessante notar que a forma oxidada do cofator faz com que a enzima assuma coloração amarela, mas, na sua forma reduzida, essa coloração passa a ser transparente (PAWELEK et al., 2000).

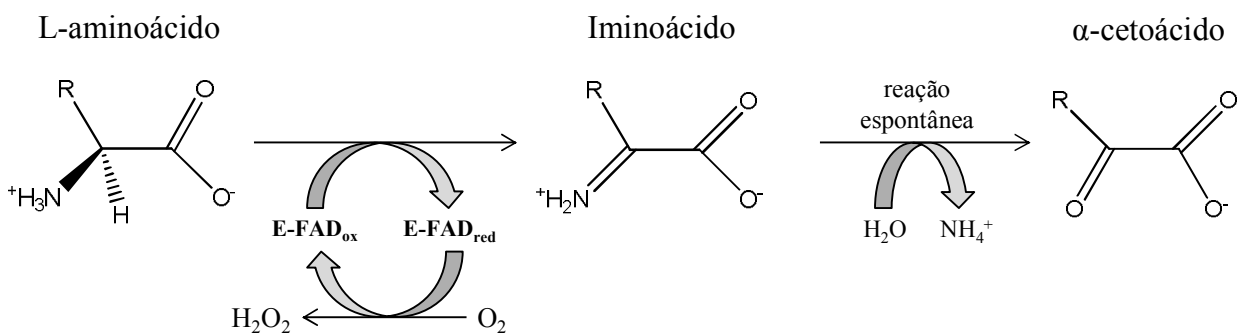


Figura 4. Oxidação de L-aminoácidos catalisada pelas LAAOs.

2.2.3. Atividades biológicas

As svLAAOs são amplamente conhecidas devido à toxicidade celular que são capazes de causar e essa atividade tem sido extensivamente estudada visando à aplicação terapêutica de LAAOs, por exemplo, como agente antitumoral, antimicrobiano e antiparasitário.

Atualmente, a pesquisa antitumoral de svLAAOs está focada principalmente no seu efeito indutor de apoptose. Já foram relatados efeitos citotóxicos e indução de apoptose em linhagens celulares como células T leucêmicas, de carcinoma gástrico, de carcinoma pulmonar, de feocromocitoma e de melanoma (ALVES et al., 2008; BREGGE-SILVA et al., 2012; LIU et al., 2002; MURAKAWA et al., 2001; SOUZA et al., 1999; SUHR; KIM, 1999; TORII et al., 2000; ZHANG; CUI, 2007).

As svLAAOs também já demonstraram efeitos antimicrobianos sem causar resistência bacteriana. As seletividades e especificidades mostram significativa variação entre diferentes svLAAOs. Como exemplos, Akbu-LAAO suprime especificamente o crescimento de *Staphylococcus aureus* de maneira dose dependente, enquanto a DRS-LAAO, uma LAAO isolada da peçonha de *Bothrops jararaca*, e a LAAO isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu* mostram clara inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Além disso, a DRS-LAAO mostrou atividade contra cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina. Outras cepas sensíveis à ação de L-aminoácido oxidases incluem *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Xanthomonas axonopodis* (CISCOTTO et al., 2009; GUO et al., 2012; SUN et al., 2010; ZHONG et al., 2009).

Já a ação antiparasitária de svLAAOs é vista, principalmente, contra parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*. Vários trabalhos mostram que espécies de *Leishmania* são sensíveis à ação de L-aminoácido oxidases e que a atividade leishmanicida é dependente da produção de peróxido de hidrogênio (BREGGE-SILVA et al., 2012; DE MELO ALVES PAIVA et al., 2011; IZIDORO et al., 2006; NAUMANN et al., 2011; RODRIGUES et al., 2009; TEMPONE et al., 2001; TOYAMA et al., 2006). O peróxido de hidrogênio é forte indutor de apoptose nas formas promastigotas de *Leishmania* ssp e o estresse oxidativo induzido por essa molécula poderia ativar *heat shock proteins* e iniciar a desorganização da membrana e do citoplasma, levando à morte celular (GUO et al., 2012). As LAAOs também são capazes de causar morte em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Essa forma do

parasita habita o intestino dos triatomíneos (barbeiros) e dão origem à forma promastigota, que é a forma capaz de infectar o homem (DEOLINDO et al., 2010).

Adicionalmente, algumas svLAAOs têm demonstrado atividade anti-HIV. Essa ação já foi relatada para LAAOs encontradas nas peçonhas de *Trimeresurus stejnegeri*, *Calloselasma rhodostoma* e *Bothrops moojeni*. Um exemplo dessa atividade é a inibição da infecção e replicação do vírus HIV-1 pela LAAO de *T. stejnegeri* (MOUSTAFA et al., 2006; STÁBELI et al., 2007; ZHANG et al., 2003).

Embora não se saiba a função exata das L-aminoácido oxidases no envenenamento, além do seu efeito citotóxico, as atividades biológicas de svLAAOs também incluem efeitos sobre a função plaquetária. No entanto, esse efeito ainda é controverso, podendo as L-aminoácido oxidases atuarem como indutores ou inibidores da agregação plaquetária. Essa contradição ocorre mesmo com LAAO proveniente de uma mesma espécie, como a LAAO isolada da peçonha de *Ophiophagus hannah*, cujos estudos de Li, Yu e Lian (1994) mostram uma ação de indução de agregação plaquetária e Jin et al. (2007) mostram inibição da agregação plaquetária induzida por ADP. Essa diferente ação na agregação plaquetária pode estar relacionada a diferenças experimentais, seja por variáveis relacionadas aos laboratórios ou executores do experimento ou às diferenças nas próprias metodologias (DU; CLEMETSON, 2002; GUO et al., 2012; JIN et al., 2007; LI; YU; LIAN, 1994; SAKURAI et al., 2001; ZHONG et al., 2009).

2.3. O uso de técnicas “ômicas” no estudo de toxinas animais

Nas últimas décadas, as técnicas “ômicas” vêm ganhando destaque no campo da Toxinologia, englobando principalmente os estudos de transcriptoma (com as reconhecidas bibliotecas de cDNA) e proteoma (ZELANIS; TASHIMA, 2014).

O proteoma de uma célula ou tecido reflete o conjunto de proteínas que é expresso em determinado tempo e determinadas condições. Assim, o proteoma representa os reais contribuintes para a função celular e, como resultado, expressões proteicas distintas podem ser características de diferentes tipos celulares e funções, bem como de diferenças fenotípicas em um dado tipo celular (KINTER; SHERMAN, 2000a).

O estudo do proteoma de venenos e peçonhas animais, também denominado “venômica” (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007), possibilita, principalmente, maior conhecimento da composição dos mesmos, auxiliando no desenvolvimento de anti-venenos mais específicos e, portanto, mais eficazes. Para a execução de tais estudos, a espectrometria de massas se destaca como uma poderosa ferramenta para o alcance dos objetivos requeridos.

A espectrometria de massas é uma técnica analítica utilizada desde meados do século passado para análise das massas de várias moléculas. Com o passar dos anos, os espectrômetros de massa foram melhorados, mas exibem, basicamente, um modelo geral, no qual a amostra é introduzida no equipamento e vai para uma região sob vácuo, onde é ionizada, e sua massa é, então, analisada e detectada. Os resultados obtidos são expressos como espectros de massa que, posteriormente, são analisados manualmente e/ou com o auxílio de *softwares* (KINTER; SHERMAN, 2000b).

Existem várias técnicas de ionização de amostras, porém as técnicas mais adequadas à análise peptídeos e proteínas são a ionização por eletrospray (do inglês *Electrospray Ionization* – ESI) e a ionização por MALDI (do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*). Após a análise das massas, os íons gerados também podem ser fragmentados e cada fragmento ter sua massa determinada. A esse tipo de análise dá-se o nome de espectrometria de massas sequencial (MANN; HENDRICKSON, PANDEY, 2001).

Os peptídeos e proteínas das peçonhas e venenos podem ser fragmentados, principalmente, por CID (do inglês *collision induced dissociation*) ou ETD (do inglês *electron transfer dissociation*). Cada tipo de fragmentação apresenta suas particularidades e a utilização de ambos, em conjunto, tem permitido uma análise mais aprofundada das características estruturais de toxinas, permitindo, além da descoberta de novas sequências, o estudo e caracterização de suas modificações pós-traducionais, como ligações dissulfeto e glicosilações (ANAND et al., 2014; BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010; CARREGARI et al., 2016; GAJEWIAK et al., 2014; LAI; HER, 2002; UEBERHEIDE et al., 2009; WIEZEL et al., 2015).

Consequentemente, a espectrometria de massas tem se mostrado uma grande aliada no campo da Toxinologia, proporcionando um melhor conhecimento sobre a composição dos venenos e peçonhas e, ainda, auxiliando na caracterização estrutural de biomoléculas que podem ser biotecnologicamente empregadas.

2.4. A Toxinologia e a descoberta de novos fármacos

Em 1933, Calmette, Saenz e Costil propuseram que compostos fisiologicamente ativos de peçonhas de serpentes poderiam apresentar potencial terapêutico, mostrando que a peçonha de cobra poderia ser utilizada no tratamento de câncer em camundongos (CALMETTE; SAENZ; COSTIL⁴, 1933 apud BISWAS et al., 2012). Mais de 80 anos se passaram e muitos estudos têm demonstrado a utilização de toxinas animais como possíveis fármacos e/ou adjuvantes terapêuticos.

O exemplo mais famoso talvez seja o do fármaco Captopril[®], um potente inibidor da enzima conversora de angiotensina utilizado no tratamento da hipertensão. Os pesquisadores Sérgio Ferreira e Maurício da Rocha e Silva da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto descobriram um peptídeo na peçonha da serpente brasileira *Bothrops jararaca* que potencializava a ação da bradicinina (através da inibição da sua degradação) e diminuía a produção da angiotensina II (através da inibição da enzima conversora de angiotensina). Esse peptídeo serviu como base para o desenho da molécula do captopril que, atualmente, é um dos anti-hipertensivos mais utilizados no mundo e rende mais de US\$ 5 bilhões de dólares de faturamento anual à indústria farmacêutica Squibb (CAMARGO et al., 2012; CUSHMAN et al., 1977; FERREIRA; ROCHA E SILVA, 1965; HAYASHI; CAMARGO, 2005; IZIQUE, 2001).

Outro exemplo de medicamento inclui o VIPRINEX[®], cujo princípio ativo é o ANCROD, uma serinoprotease trombina-símile encontrada na peçonha da serpente *Calloselasma rhodostoma*. Esse medicamento foi inicialmente estudado para o tratamento de acidente vascular isquêmico agudo, mas foi reprovado no estudo clínico de fase 3 por não ser capaz de atingir seus objetivos. Atualmente, o ANCROD está em estudo clínico de fase 2 para o tratamento de pacientes com surdez súbita (ANCROD [...], 2016; Ancrod (ViprinexTM) [...], 2005; EDGAR, PRENTICE, 1973; EFFICACY [...], 2013; NEUROBIOLOGICAL [...], 2016).

Um último exemplo inclui o fármaco ¹³¹I-TM-601, um análogo radioativo da clorotoxina (encontrada na peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus*). Esse peptídeo se liga especificamente a canais para cloreto ativados por Ca²⁺ e que são expressos em gliomas.

⁴CALMETTE, A.; SAENZ, A.; COSTIL, L. Effets du venin de cobra sur les greffes cancéreuses et sur le cancer spontané (adenocarcinoma) de la souris. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 197, p. 205-210, 1933.

Recentemente, o ^{131}I -TM-601 está em estudo clínico de fase 2 para o tratamento de gliomas (131-I-TM-601 [...], 2004; CHENG et al., 2014).

Além dos exemplos acima, várias toxinas têm sido estudadas como potenciais antibacterianos, antivirais, antifúngicos e antiparasitários. Entre os últimos, já foram realizados, por exemplo, estudos com parasitas dos gêneros *Leishmania*, *Plasmodium* e *Trypanosoma* (SAEZ et al., 2010; ADADE et al., 2014; CHEN et al., 2012; CONLON; KOLODZIEJEK; NOWOTNY, 2004).

2.4.1. Leishmaniose

A Leishmaniose é considerada um problema de saúde pública em 98 países, estando 350 milhões de pessoas sob risco de infecção, além de apresentar cerca de 2 milhões de novos casos por ano (REVEIZ et al., 2013). Atualmente, essa doença vem ganhando interesse, principalmente devido à expansão de viagens internacionais e ao grande crescimento da população. Na América do Sul, a leishmaniose é considerada uma doença tropical endêmica e possui poucas abordagens terapêuticas.

Essa doença é causada por agentes do gênero *Leishmania* e é transmitida por insetos flebotomíneos (popularmente conhecidos como “mosquitos-palha”). Durante a picada do inseto, a forma promastigota do parasita é inoculada no hospedeiro, que é então fagocitada por vários tipos celulares no local da picada. Após isso, o parasita se transforma em formas amastigotas não flageladas e se reproduz nas células do hospedeiro. As células então se rompem e liberam as formas amastigotas, que infectam outros fagócitos e que também podem ser ingeridas pelo mosquito durante o repasto sanguíneo, fechando o ciclo da doença (KAYE; SCOTT, 2011).

A leishmaniose é uma doença de alta complexidade. As diferentes apresentações clínicas da doença dependem das variadas espécies de *Leishmania* causadora da infecção e também de fatores relacionados ao hospedeiro. Pele, mucosa e sistema fagocítico mononuclear são os locais possivelmente afetados por esse gênero de parasitas (MASMOUDI et al., 2013). Algumas *Leishmania* spp. são causadoras de uma doença crônica, com cura lenta, conhecida como leishmaniose cutânea. Outras espécies de *Leishmania* disseminam-se em órgãos internos, como fígado, baço e medula óssea, causando a leishmaniose visceral (KAYE; SCOTT, 2011).

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como Kala-Azar, é causada principalmente pelos agentes *L. donovani* e *L. infantum* (sinônimo de *L. chagasi* na América do Sul). Entretanto, *L. tropica* e *L. amazonensis* também podem ser a causa dessa doença. A LV clássica é caracterizada clinicamente por febre prolongada, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia e, geralmente, é fatal se não tratada adequadamente (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013a; ROMERO; BOELAERT, 2010; WERNECK et al., 2003).

Por sua vez, a leishmaniose cutânea (LC) é prevalente em 82 países, entre eles, o Brasil, com uma grande concentração de casos. Essa doença começa inicialmente com uma pápula eritematosa no sítio de inoculação do parasita, normalmente em sítios descobertos, como face, membros superiores e extremidades baixas. Essa pápula torna-se maior e rompe-se, formando uma úlcera indolor com borda elevada e bem demarcada. Uma cicatriz deprimida é o resultado final após a cicatrização e constitui o principal problema dessa doença. A LC pode ser causada por patógenos como *L. aethiopica*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana*. É proposto que a infecção de células estromais, como os fibroblastos, possa contribuir para que esses patógenos possam evadir do sistema imune (KAYE; SCOTT, 2011). Os tratamentos atuais são pobremente justificados, possuem efetividade sub-ótima e estão baseados em regimes tópicos ou sistêmicos (MASMOUDI et al., 2013; MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013b).

Existe ainda a leishmaniose tegumentar americana (LTA), conhecida como leishmaniose mucocutânea ou úlcera de Bauru, que inclui a LC e a leishmaniose mucosa (LM). Essa doença se estende por todo o continente americano e no Brasil está presente em todos os estados. Na apresentação cutânea, na maioria das vezes, existe uma lesão localizada. Já a apresentação mucosa surge após o tratamento da lesão cutânea, às vezes meses ou anos após a resolução da doença, e não se consegue identificar a porta de entrada do parasita. Os principais causadores da LTA no Brasil são *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) naiffi* e *L. (Viannia) shawi* (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2000; BRASIL, 2010).

O tratamento de primeira escolha para a leishmaniose padronizado pela Organização Mundial de Saúde é o antimonial pentavalente. Outros fármacos também utilizados incluem a anfotericina B e o stibugluconato de pentamidina (BASANO; CAMARGO, 2004). Mas a

resistência às drogas atuais e inseticidas, a toxicidade dos medicamentos disponíveis e dificuldades financeiras e operacionais dificultam o controle da leishmaniose. Ainda, é aparente uma necessidade maior em focar o desenvolvimento de novas drogas ao invés de tentar otimizar a atividade dos compostos já conhecidos (BASANO; CAMARGO, 2004; MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010).

Vários trabalhos demonstram que espécies de *Leishmania* são sensíveis a L-aminoácido oxidases e que a atividade leishmanicida é dependente da produção de peróxido de hidrogênio, uma vez que na presença de catalase, essa atividade é diminuída ou completamente abolida (BREGGE-SILVA et al., 2012; DE MELO ALVES PAIVA et al., 2011; DU; CLEMETSON, 2002; FERNANDEZ-GOMEZ et al., 1994; IZIDORO et al., 2006; NAUMANN et al., 2011; PAVLI; MALTEZOU, 2010; RODRIGUES et al., 2009; STÁBELI et al., 2007; TEMPONE et al., 2001; TOYAMA et al., 2006).

Assim, o presente estudo pretende isolar e caracterizar uma L-aminoácido oxidase presente na peçonha de *C. d. terrificus* e ainda avaliar *in vitro* a ativação de fibroblastos induzida por essa enzima, bem como sua atividade leishmanicida. A caracterização estrutural da LAAO foi um trabalho inovador, que contou com as mais novas técnicas do “estado da arte” da espectrometria de massas. Através deste trabalho, visa-se também ampliar o conhecimento sobre o mecanismo de ação desta enzima, a sua relevância na resposta imunológica observada no envenenamento e, adicionalmente, sua possível aplicação como agente e/ou adjuvante terapêutico para o tratamento da leishmaniose.

6. CONCLUSÕES

Embora as peçonhas e venenos animais possuam como principais funções a imobilização e digestão das presas, componentes isolados têm sido extensivamente estudados para aplicação como potenciais agentes terapêuticos.

Neste trabalho, foram desenvolvidos dois protocolos para o isolamento de uma L-aminoácido oxidase presente na peçonha da serpente brasileira *Crotalus durissus terrificus* que foram capazes de isolar essa enzima com alto grau de pureza. A LAAO também foi estruturalmente caracterizada através da dedução de sua sequência primária de aminoácidos, determinação da massa molecular e localização do sítio de glicosilação e das ligações dissulfeto.

A LAAO de *C. d. terrificus* mostrou melhor atividade enzimática na presença de L-aminoácidos hidrofóbicos, sendo a L-fenilalanina o substrato preferido por essa enzima. Estudos de estabilidade mostraram inibição da atividade da LAAO ao longo do tempo e também após processo de liofilização ou congelamento. Também foi avaliada a estabilidade estrutural da enzima, que mostrou ser mais estável em pH ácido, diferentes concentrações de substratos e na ausência de cloreto de sódio. Valores básicos de pH ou a utilização das soluções-tampão PBS, MES ou HEPES causam enorme desestabilização da estrutura da LAAO.

Adicionalmente, a LAAO demonstrou atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. amazonensis*, mas em uma concentração de enzima muito mais alta do que a concentração que causou a morte da linhagem celular de fibroblastos também estimulada pela LAAO. Em doses de estímulo mais baixas, foram avaliadas a liberação de citocinas e óxido nítrico pelos fibroblastos, mas nenhum dos componentes teve sua produção interferida pela LAAO de *C. d. terrificus*, indicando que essa enzima não deve exercer efeitos inflamatórios locais durante o envenenamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

131-I-TM-601 Study in Adults With Recurrent High-Grade Glioma. 2004. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00114309?term=chlorotoxin&rank=1>>. Acesso em: 17 mai. 2016.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 7th ed. Philadelphia: ELSEVIER SAUNDERS, 2012.

ABDELKAFI-KOUBAA, Z. et al. A thermoactive L-amino acid oxidase from *Cerastes cerastes* snake venom: purification, biochemical and molecular characterization. **Toxicon**, Oxford, v. 89, p. 32-44, 2014.

ADADE, C. M. et al. Crovirin, a snake venom cysteine-rich secretory protein (CRISP) with promising activity against Trypanosomes and *Leishmania*. **PloS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. e3252, 2014.

ALI, S. A. et al. Proteomic comparison of *Hypnale hypnale* (hump-nosed pit-viper) and *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit-viper) venoms. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 91, p. 338-343, 2013.

_____. Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v. 384, n. 2, p. 216-226, 2000.

ALLEY, W. R.; MECHREF, Y.; NOVOTNY, M. V. Characterization of glycopeptides by combining collision-induced dissociation and electron-transfer dissociation mass spectrometry data. **Rapid communications in mass spectrometry**, Chichester, v. 23, n. 1, p. 161-170, 2009.

ALLISON, S. D. et al. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v. 365, n. 2, p. 289-298, 1999.

ALVES, R. M. et al. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comparative biochemistry and physiology - Part A - Molecular and integrative physiology**, New York, v. 151, n. 4, p. 542-550, 2008.

ANAND, P. et al. Sample limited characterization of a novel disulfide-rich venom peptide toxin from terebrid marine snail *Terebra variegata*. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. e94122, 2014.

ANCROD project – from raw venom to highly purified drug substance. 2016. Disponível em: <<http://www.nordmark-pharma.de/en/r-d/project-ancrod.html>>. Acesso em: 17 mai. 16.

ANCROD (Viprinex™) for the Treatment of Acute, Ischemic Stroke. 2005. Acesso em: 17 mai. 2016.

ANDE, S. R. et al. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, London, v. 11, n. 8, p. 1439-1451, 2006.

ARAKAWA, T. et al. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. **Advanced drug delivery reviews**, Amsterdam, v. 46, n. 1-3, p. 307-326, 2001.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista brasileira de epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BAZAA, A. et al. Snake venomics: comparative analysis of the venom proteomes of the Tunisian snakes *Cerastes cerastes*, *Cerastes vipera* and *Macrovipera lebetina*. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, n. 16, p. 4223-4235, 2005.

BERN, M.; KIL, Y. J.; BECKER, C. Byonic: advanced peptide and protein identification software. **Current protocols in bioinformatics**, New York, v. Chapter 13, p. Unit 13.20, 2012.

BHATIA, S. et al. Constrained de novo sequencing of conotoxins. **Journal of proteome research**, Washington v. 11, n. 8, p. 4191-4200, 2012.

BISWAS, A. et al. Nanoparticle-conjugated animal venom-toxins and their possible therapeutic potential. **Journal of Venom Research**, Oxford, v. 3, p. 15-21, 2012.

BOIVIN, S.; KOZAK, S.; MEIJERS, R. Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. **Protein expression and purification**, San Diego, v. 91, n. 2, p. 192-206, 2013.

BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. Snake venomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 73, n. 9, p. 1758-1576, 2010.

BORDON, K. C. et al. Isolation, enzymatic characterization and antiedematogenic activity of the first reported rattlesnake hyaluronidase from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Biochimie**, Paris, v. 94, n. 12, p. 2740-2748, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 5 ed. Brasília, DF, 2000. 62 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2 ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 180 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **ACIDENTE POR ANIMAIS PEÇONHENTOS - NOTIFICAÇÕES REGISTRADAS NO SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO – BRASIL**. Notificações por Tipo Serpente segundo Evolução Caso. Ano do acidente: 2015. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>>. Acesso em: 16 mai. 2016.

BREGGE-SILVA, C. et al. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. **Toxicon**, Oxford, v. 60, n. 7, p. 1263-1276, 2012.

BRUICE, P. Y. Os mecanismos orgânicos das coenzimas – metabolismo. **Química Orgânica**. 4. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006. cap. 25, p. 458. v. 2.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **Journal of mass spectrometry**, Chichester, v. 42, n. 11, p. 1405-1414, 2007.

CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; SANZ, L. Snake venomics of *Bitis gabonica gabonica*. Protein family composition, subunit organization of venom toxins, and characterization of dimeric disintegrins bitisgabonin-1 and bitisgabonin-2. **Journal of proteome research**, Washington, v. 6, n. 1, p. 326-336, 2007.

CALVETE, J. J. et al. Snake venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive pedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. **Journal of proteome research**, Washington, v. 9, n. 1, p. 528-544, 2010.

CAMARGO, A. C. et al. Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril. **Toxicon**, Oxford, v. 59, n. 4, p. 516-523, 2012.

CARREGARI, V. C. et al. Revealing the functional structure of a new PLA₂ K49 from *Bothriopsis taeniata* snake venom employing automatic "de novo" sequencing using CID/HCD/ETD MS/MS analyses. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 131, p. 131-139, 2016.

CATALINA, M. I. et al. Electron transfer dissociation of N-glycopeptides: loss of the entire N-glycosylated asparagine side chain. **Rapid communications in mass spectrometry**, Chichester, v. 21, n. 6, p. 1053-1061, 2007.

CHANG, C. C.; TSENG, K. H. Effect of crotamine, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. **British journal of pharmacology**, London, v. 63, n. 3, p. 551-559, 1978.

CHANG, K. P. *Leishmania* infection of human skin fibroblasts *in vitro*: absence of phagolysosomal fusion after induced phagocytosis of promastigotes, and their intracellular transformation. **American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 27, n. 6, p. 1084-1096, 1978.

CHELIUS, D. et al. Formation of pyroglutamic acid from N-terminal glutamic acid in immunoglobulin gamma antibodies. **Analytical chemistry**, Washington, v. 78, n. 7, p. 2370-2376, 2006.

CHEN, Y. et al. Anti-HIV-1 activity of a new scorpion venom peptide derivative Kn2-7. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. e34947, 2012.

CHENG, Y. et al. Recent advances in diagnosis and treatment of gliomas using chlorotoxin-based bioconjugates. **American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, Madison, v. 4, n. 5, p. 385-405, 2014.

CHI, A. et al. Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. **Proceedings of the national**

academy of sciences of the United States of America, Washington, v. 104, n. 7, p. 2193-2198, 2007.

CHOUHDARY, C. et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. **Science**, Washington, v. 325, n. 5942, p. 834-840, 2009.

CISCOTTO, P. et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, Oxford, v. 53, n. 3, p. 330-341, 2009.

CLOS, J.; BRANDAU, S.; HOYER, C. Chemical stress does not induce heat shock protein synthesis in *Leishmania donovani*. **Protist**, Jena, v. 149, n. 2, p. 167-172, 1998.

COHN, C. A. et al. Adenine oxidation by pyrite-generated hydroxyl radicals. **Geochemical transactions**, London, v. 11, n. 1, p. 2, 2010.

CONLON, J. M.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1696, n. 1, p. 1-14, 2004.

COON, J. J. Collisions or electrons? Protein sequence analysis in the 21st century. **Analytical chemistry**, Washington, v. 81, n. 9, p. 3208-3215, 2009.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic acids research**, London, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis brasileiros: Lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, São Paulo, v. 3 n. 3, p. 11, 2014.

COSTA TORRES, A. F. et al. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, Oxford, v. 55, n. 4, p. 795-804, 2010.

COSTA, T. R. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, Botucatu, v. 20, p. 23, 2014.

COTTO-RIOS, X. M. et al. Deubiquitinases as a signaling target of oxidative stress. **Cell Reports**, Cambridge, v. 2, n. 6, p. 1475-1484, 2012.

COVEY, T. R.; HUANG, E. C.; HENION, J. D. Structural characterization of protein tryptic peptides via liquid chromatography/mass spectrometry and collision-induced dissociation of their doubly charged molecular ions. **Analytical chemistry**, Washington, v. 63, n. 13, p. 1193-1200, 1991.

CRUZ, A. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines release in mice injected with *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mediators of Inflammation**, Oxford, Article ID 874962, 2008.

CUMMINGS, M. D.; FARNUM, M. A.; NELEN, M. I. Universal screening methods and applications of ThermoFluor. **Journal of biomolecular screening**, Thousand Oaks, v. 11, n. 7, p. 854-863, 2006.

CURTI, B.; MASSEY, V.; ZMUDKA, M. Inactivation of snake venom L-amino acid oxidase by freezing. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 243, n. 9, p. 2306-2314, 1968.

CUSHMAN, D. W. et al. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. **Biochemistry**, Washington, v. 16, n. 25, p. 5484-5491, 1977.

DE MELO ALVES PAIVA, R. et al. Cell cycle arrest evidence, parasitocidal and bactericidal properties induced by L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochimie**, Paris, v. 93, n. 5, p. 941-947, 2011.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DEOLINDO, P. et al. L-amino acid oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. **Toxicon**, Oxford, v. 56, n. 6, p. 944-955, 2010.

DI GIOVINE, F. S.; DUFF, G. W. Interleukin 1: the first interleukin. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 13-20, 1990.

DOERNER, K. C.; WHITE, B. A. Detection of glycoproteins separated by nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis using the periodic acid-Schiff stain. **Analytical biochemistry**, New York, v. 187, n. 1, p. 147-50, 1990.

DRAPEAU, G. R. Cleavage at glutamic acid with staphylococcal protease. **Methods in enzymology**, New York, v. 47, p. 189-191, 1977.

DRAPEAU, G. R.; BOILY, Y.; HOUMARD, J. Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 247, n. 20, p. 6720-6726, 1972.

DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, Oxford, v. 40, n. 6, p. 659-665, 2002.

DU, Y. et al. Determination of deamidation artifacts introduced by sample preparation using ¹⁸O-labeling and tandem mass spectrometry analysis. **Analytical chemistry**, Washington, v. 84, n. 15, p. 6355-6360, 2012.

DUARTE, M. R.; MENEZES, F. A. Is the population of *Crotalus durissus* (Serpentes, Viperidae) expanding in Brazil? **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, Botucatu, v. 19, n. 1, p. 30, 2013.

EDGAR, W.; PRENTICE, C. R. M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. **Thrombosis research**, Elmsford, v. 2, p. 11, 1973.

EFFICACY, Safety, and Tolerability of Ancrod in Patients With Sudden Hearing Loss. 2013. Disponível em:
<<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01621256?term=ANCROD&rank=1>>. Acesso em: 17 mai. 2016.

FAURE, G. et al. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **European journal of biochemistry**, Berlin, v. 223, n. 1, p. 161-164, 1994.

FENWICK, A. et al. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, London, v. 156, n. 3, p. 617-640, 2009.

FERNANDES, T. A.; AGUIAR, C. N.; DAHER, E. F. Envenenamento crotálico: epidemiologia, insuficiência renal aguda e outras manifestações clínicas. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, Fortaleza, v. 2, n. 2, p. 1-10, 2008.

FERNANDEZ-GOMEZ, R. et al. Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* infantum by different snake venoms: preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which interact with the parasites. **Toxicon**, Oxford, v. 32, n. 8, p. 875-882, 1994.

FERREIRA, S. H.; ROCHA E SILVA, M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. **Experientia**, Basel, v. 21, n. 6, p. 347-349, 1965.

FORNERIS, F. et al. ThermoFAD, a ThermoFluor-adapted flavin ad hoc detection system for protein folding and ligand binding. **FEBS Journal**, Oxford, v. 276, n. 10, p. 2833-2840, 2009.

FOX, J. W. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: L-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. **Toxicon**, Oxford, v. 62, p. 75-82, 2013.

FRANCO, F. L. Origem e Diversidade das Serpentes. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. (Ed.). **ANIMAIS PEÇONHENTOS NO BRASIL: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1 ed. São Paulo: Sarvier, 2003. cap. 3, p. 13-32.

FRESE, C. K. et al. Improved peptide identification by targeted fragmentation using CID, HCD and ETD on an LTQ-Orbitrap Velos. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 10, n. 5, p. 2377-2388, 2011.

_____. Toward full peptide sequence coverage by dual fragmentation combining electron-transfer and higher-energy collision dissociation tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 84, n. 22, p. 9668-9673, 2012.

_____. Unambiguous phosphosite localization using electron-transfer/higher-energy collision dissociation (EThcD). **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 12, n. 3, p. 1520-1525, 2013.

FROELICH, J. M.; REID, G. E. The origin and control of *ex vivo* oxidative peptide modifications prior to mass spectrometry analysis. **Proteomics**, Weinheim, v. 8, n. 7, p. 1334-1345, 2008.

FURMANEK, A.; HOFSTEENGE, J. Protein C-mannosylation: facts and questions. **Acta biochimica Polonica**, Warsaw, v. 47, n. 3, p. 781-789, 2000.

GAJEWIAK, J. et al. A disulfide tether stabilizes the block of sodium channels by the conotoxin $\mu\text{O}\delta\text{-GVIII}$. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 111, n. 7, p. 2758-2763, 2014.

GARCIA, B. A. What does the future hold for Top Down mass spectrometry? **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 21, n. 2, p. 193-202, 2010.

GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**. Totowa:Humana Press, 2005. p. 571-607.

GEIGER, T.; CLARKE, S. Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 262, n. 2, p. 785-94, 1987.

GERWIG, G. J. et al. Glycosylation of conotoxins. **Marine Drugs**, Basel, v. 11, n. 3, p. 623-642, 2013.

GEYER, A. et al. Structure and characterization of the glycan moiety of L-amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **European journal of biochemistry**, Berlin, v. 268, n. 14, p. 4044-4053, 2001.

GILLET, L. C.; LEITNER, A.; AEBERSOLD, R. Mass Spectrometry applied to bottom-up proteomics: entering the high-throughput era for hypothesis testing. **Annual Review of Analytical Chemistry**, Palo Alto, v. 9, p. 449-472, 2016.

GOLDFARB, A. R.; SAIDEL, L. J.; MOSOVICH, E. The ultraviolet absorption spectra of proteins. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 397-404, 1951.

GORDON-WALKER, A.; PENZER, G. R.; RADDI, G. K. Excited states of flavins characterised by absorption, prompt and delayed emission spectra. **European journal of biochemistry**, Berlin, v. 13, n. 2, p. 313-321, 1970.

GREEN, L. C. et al. Nitrate biosynthesis in man. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 78, n. 12, p. 7764-7768, 1981.

GUO, C. et al. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. **Toxicon**, Oxford, v. 60, n. 3, p. 302-311, 2012.

HAMZA, L. et al. Purification and characterization of a fibrinogenolytic and hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Vipera lebetina* venom. **Biochimie**, Paris, v. 92, n. 7, p. 797-805, 2010.

HARRISON, R. A. et al. Snake envenoming: a disease of poverty. **PloS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 3, n. 12, p. e569, 2009.

HAYASHI, M. A.; CAMARGO, A. C. The bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. **Toxicon**, Oxford, v. 45, n. 8, p. 1163-1170, 2005.

HAYES, M. B.; WELLNER, D. Microheterogeneity of L-amino acid oxidase. Separation of multiple components by polyacrylamide gel electrofocusing. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 244, n. 24, p. 6636-6644, 1969.

HOFFMANN, E. D.; STROOBANT, V. Tandem Mass Spectrometry. In: _____ (Ed.). **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. 3 ed. Chichester: Wiley, 2007. cap. 4, p. 189-215.

IMPERIALI, B.; O'CONNOR, S. E. Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. **Current opinion in chemical biology**, London, v. 3, n. 6, p. 643-649, 1999.

IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization - Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, London, v. 43, n. 10, p. 1019-1032, 2008.

IZIDORO, L. F. et al. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 14, n. 20, p. 7034-7043, 2006.

_____. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. **BioMed Research International**, New York, v. 2014, p. 196754, 2014.

IZIQUÉ, C. Nova arma contra a hipertensão arterial. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, abr. 2001, p. 14-17.

JIN, Y. et al. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from king cobra venom. **Toxicon**, Oxford, v. 50, n. 4, p. 479-489, 2007.

JUÁREZ, P.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Snake venomics: characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 2, p. 327-338, 2004.

JUNG, S. Y. et al. Complications in the assignment of 14 and 28 Da mass shift detected by mass spectrometry as *in vivo* methylation from endogenous proteins. **Analytical chemistry**, Washington, v. 80, n. 5, p. 1721-1729, 2008.

KATTAH, L. S. et al. Crotoxin, the major toxin from the rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, inhibits 3H-choline uptake in guinea pig ileum. **Brazilian journal of medical and biological research**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 9, p. 1093-1097, 2000.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

KEARNEY, E. B.; SINGER, T. P. The inactivation of L-amino acid oxidase by inorganic phosphate and arsenate. **Archives of biochemistry**, New York, v. 21, n. 1, p. 242-245, 1949.

KEARNEY, E. B.; SINGER, T. P. The L-amino acid oxidases of snake venom. III. Reversible inactivation of L-amino acid oxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 33, n. 3, p. 377-396, 1951.

KINTER, M.; SHERMAN, N. E. An introduction to protein sequencing using tandem mass spectrometry. In:_____. **Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2000a. cap. 1, p. 3.

_____. Fundamental mass spectrometry. In:_____. **Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2000b. cap. 3, p. 29-31.

KISHIMOTO, M.; TAKAHASHI, T. A spectrophotometric microplate assay for L-amino acid oxidase. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 298, n. 1, p. 136-139, 2001.

KLAUBER, L. M. Classification and identification. In:_____. **Rattlesnakes: their habits, life stories, and influence on mankind**. 2. ed. Berkeley and Los Angeles: University of California Press, 1972. cap. 2, p. 35, v. 1.

KOHLHOFF, M. et al. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 75, n. 7, p. 2181-2195, 2012.

KROBITSCH, S. et al. *Leishmania donovani* heat shock protein 100. Characterization and function in amastigote stage differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 11, p. 6488-6494, 1998.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAGERWERF, F. M. et al. Identification of oxidized methionine in peptides. **Rapid communications in mass spectrometry**, Chichester, v. 10, n. 15, p. 1905-1910, 1996.

LAI, C. C.; HER, G. R. Analysis of N-glycosylation of phospholipase A₂ from venom of individual bees by microbore high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry using an ion trap mass spectrometer. **Journal of chromatography - B - Analytical technologies in the biomedical and life**, Amsterdam, v. 766, n. 2, p. 243-250, 2002.

LI, Z. Y.; YU, T. F.; LIAN, E. C. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. **Toxicon**, Oxford, v. 32, n. 11, p. 1349-1358, 1994.

LIU, F.; VAN BREUKELEN, B.; HECK, A. J. Facilitating protein disulfide mapping by a combination of pepsin digestion, electron transfer higher energy dissociation (ETHcD), and a dedicated search algorithm SlinkS. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 13, n. 10, p. 2776-2786, 2014.

LIU, H. et al. Characterization of lower molecular weight artifact bands of recombinant monoclonal IgG1 antibodies on non-reducing SDS-PAGE. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 29, n. 11, p. 1611-1122, 2007.

LIU, J. W. et al. [Purification and characterization of L-amino acid oxidase from Agkistrodon halys pallas venom]. **Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao**, Shanghai, v. 34, n. 3, p. 305-310, 2002.

LOURENÇO, A. et al. Individual venom profiling of *Crotalus durissus terrificus* specimens from a geographically limited region: crotamine assessment and captivity evaluation on the biological activities. **Toxicon**, Oxford, v. 69, p. 75-81, 2013.

MACHEROUX, P. Flavoprotein protocols. In: CHAPMAN, S. K. e REID, G. A. (Ed.). **Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana Press Inc., 1999. cap 10. p. 245, v. 131.

MANDAL, S.; BHATTACHARYYA, D. Two L-amino acid oxidase isoenzymes from Russell's viper (*Daboia russelli russelli*) venom with different mechanisms of inhibition by substrate analogs. **FEBS Journal**, Oxford, v. 275, n. 9, p. 2078-2095, 2008.

MANN, M.; HENDRICKSON, R. C.; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 70, p. 437-473, 2001.

MASMOUDI, A. et al. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. **Journal of Dermatological Case Reports**, Warsaw, v. 7, n. 2, p. 31-41, 2013.

MASSEY, V.; CURTI, B. On the reaction mechanism of *Crotalus adamanteus* L-amino acid oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 242, n. 6, p. 1259-1264, 1967.

MECHREF, Y. Use of CID/ETD mass spectrometry to analyze glycopeptides. **Current protocols in protein science**, Hoboken, v. Chapter 12, p. Unit 12.11.1-11, 2012.

MECHREF, Y.; NOVOTNY, M. V. Structural investigations of glycoconjugates at high sensitivity. **Chemical Reviews**, Washington, v. 102, n. 2, p. 321-369, 2002.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1 ed. São Paulo: Sarvier, 2003. cap. 4, p. 33-61.

MIKESH, L. M. et al. The utility of ETD mass spectrometry in proteomic analysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1764, n. 12, p. 1811-1822, 2006.

MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 63, n. 2, p. 309-322, 2010.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Therapeutic options for visceral leishmaniasis. **Drugs**, New York, v. 73, n. 17, p. 1863-1888, 2013a.

_____. Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Drugs**, New York, v. 73, n. 17, p. 1889-1920, 2013b.

MONTEIRO, H. S. et al. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. **Brazilian journal of medical and biological research**, Ribeirão Preto, v. 34, n. 10, p. 1347-1352, 2001.

MORADIAN, A. et al. The top-down, middle-down, and bottom-up mass spectrometry approaches for characterization of histone variants and their post-translational modifications. **Proteomics**, Weinheim, v. 14, n. 4-5, p. 489-497, 2014.

MORAND, K.; TALBO, G.; MANN, M. Oxidation of peptides during electrospray ionization. **Rapid communications in mass spectrometry**, Chichester, v. 7, n. 8, p. 738-743, 1993.

MORELLE, W. et al. The use of mass spectrometry for the proteomic analysis of glycosylation. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 14, p. 3993-4015, 2006.

MOREMEN, K. W.; TIEMEYER, M.; NAIRN, A. V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, London, v. 13, n. 7, p. 448-462, 2012.

MOUSTAFA, I. M. et al. Crystal structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L-phenylalanine substrate: insights into structure and mechanism. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 364, n. 5, p. 991-1002, 2006.

MUKHERJEE, A. K. et al. Apoptosis induction in human breast cancer (MCF-7) cells by a novel venom L-amino acid oxidase (Rusvinoxidase) is independent of its enzymatic activity and is accompanied by caspase-7 activation and reactive oxygen species production. **Apoptosis**, London, v. 20, n. 10, p. 1358-1372, 2015.

MURAKAWA, M. et al. Apoptosis-inducing protein, AIP, from parasite-infected fish induces apoptosis in mammalian cells by two different molecular mechanisms. **Cell Death and Differentiation**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 298-307, 2001.

NAUMANN, G. B. et al. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1810, n. 7, p. 683-694, 2011.

NEUROBIOLOGICAL Technologies announces suspension of Viprinex development. EMERYVILLE: FirstWord Pharma, 13 jan. 2009. Disponível em: <<http://www.firstwordpharma.com/node/39670#axzz48v7SKSuQ>>. Acesso em: 17 mai. 2016.

NIESEN, F. H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature Protocols**, London, v. 2, n. 9, p. 2212-2221, 2007.

PADUA, R. A. P. et al. ThermoFMN - a thermofluor assay developed for ligand-screening as an alternative strategy for drug discovery. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 25, n. 10, p. 1864-1871, 2014.

PANTOLIANO, M. W. et al. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. **Journal of Biomolecular Screening**, Thousand Oaks, v. 6, n. 6, p. 429-440, 2001.

PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 14, n. 12, p. e1032-9, 2010.

PAWELEK, P. D. et al. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. **EMBO Journal**, Oxford, v. 19, n. 16, p. 4204-4215, 2000.

PESSATTI, M. et al. Screening of *Bothrops* snake venoms for L-amino acid oxidase activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 51-52, p. 197-210, 1995.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 6, 2001.

POKLAR, N. et al. pH and temperature-induced molten globule-like denatured states of equinatoxin II: a study by UV-melting, DSC, far- and near-UV CD spectroscopy, and ANS fluorescence. **Biochemistry**, Washington, v. 36, n. 47, p. 14345-14352, 1997.

POLLEGIONI, L.; MOTTA, P.; MOLLA, G. L-Amino acid oxidase as biocatalyst: a dream too far? **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 21, p. 9323-9341, 2013.

PONNUDURAI, G.; CHUNG, M. C.; TAN, N. H. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 313, n. 2, p. 373-378, 1994.

PONTES, A. S. et al. Effect of L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodostoma* snake venom on human neutrophils. **Toxicon**, Oxford, v. 80, p. 27-37, 2014.

RÁDIS-BAPTISTA, G. et al. Structure and chromosomal localization of the gene for crotamine, a toxin from the South American rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, Oxford, v. 42, n. 7, p. 747-752, 2003.

RÁDIS-BAPTISTA, G. et al. Identification of crotasin, a crotamine-related gene of *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, Oxford, v. 43, n. 7, p. 751-759, 2004.

REN, D. et al. An improved trypsin digestion method minimizes digestion-induced modifications on proteins. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 392, n. 1, p. 12-21, 2009.

REVEIZ, L. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review update. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 4, p. e61843, 2013.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research**, London, v. 42, n. Web Server issue, p. W320-4, 2014.

RODRIGUES, R. S. et al. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 75, n. 9, p. 2707-2720, 2012.

_____. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie**, Paris, v. 91, n. 4, p. 490-501, 2009.

ROMERO, G. A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America – a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 1, p. e584, 2010.

RYLE, A. P.; SANGER, F. Disulphide interchange reactions. **Biochemical Journal**, London, v. 60, n. 4, p. 535-540, 1955.

SABA, J. et al. Increasing the productivity of glycopeptides analysis by using higher-energy collision dissociation-accurate mass-product-dependent electron transfer dissociation. **International Journal of Proteomics**, Cairo, v. 2012, p. 560391, 2012.

SAEZ, N. J. et al. Spider-venom peptides as therapeutics. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 12, p. 2851-2871, 2010.

SAKURAI, Y. et al. Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. **Toxicon**, Oxford, v. 39, n. 12, p. 1827-1833, 2001.

SAMEL, M. et al. L-Amino acid oxidase from *Naja naja oxiana* venom. **Comparative biochemistry and physiology - Part B - Biochemistry and molecular biology**, Oxford, v. 149, n. 4, p. 572-580, 2008.

_____. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1764, n. 4, p. 707-714, 2006.

SANT'ANNA, S. S.; ABE, A. S. Diet of the rattlesnake *Crotalus durissus* in southeastern Brazil (Serpentes, Viperidae). **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, Amsterdam, v. 42, n. 3, p. 169-174, 2007.

SANZ, L. et al. Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 46-60, 2008.

_____. Venom proteomes of closely related *Sistrurus* rattlesnakes with divergent diets. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 5, n. 9, p. 2098-2112, 2006.

SCHENBERG, S. Geographical pattern of crotonamine distribution in the same rattlesnake subspecies. **Science**, Washington, v. 129, n. 3359, p. 1361-1363, 1959.

SILVA, M. C.; GONÇALVES, L. R.; MARIANO, M. The venom of South American rattlesnakes inhibits macrophage functions and is endowed with anti-inflammatory properties. **Mediators of Inflammation**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 18-23, 1996.

SINGH, C. et al. Higher energy collision dissociation (HCD) product ion-triggered electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry for the analysis of N-linked glycoproteins. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 11, n. 9, p. 4517-4525, 2012.

SOARES, S. G.; OLIVEIRA, L. L. Venom-sweet-venom: N-linked glycosylation in snake venom toxins. **Protein and Peptide Letters**, Hilversum, v. 16, n. 8, p. 913-919, 2009.

SOLTYSIK, S. et al. The effects of reversible freezing inactivation and inhibitor binding on redox properties of L-amino-acid oxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 911, n. 2, p. 201-208, 1987.

SOUZA, D. H. et al. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 368, n. 2, p. 285-290, 1999.

SPIRO, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 43R-56R, 2002.

STÁBELI, R. G. et al. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 41, n. 2, p. 132-140, 2007.

STEEN, H. et al. Phosphorylation analysis by mass spectrometry: myths, facts, and the consequences for qualitative and quantitative measurements. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 5, n. 1, p. 172-181, 2006.

STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, London, v. 5, n. 9, p. 699-711, 2004.

STOWELL, S. R.; JU, T.; CUMMINGS, R. D. Protein glycosylation in cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, Palo Alto, v. 10, p. 473-510, 2015.

SUHR, S. M.; KIM, D. S. Comparison of the apoptotic pathways induced by L-amino acid oxidase and hydrogen peroxide. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 125, n. 2, p. 305-309, 1999.

SUN, M. Z. et al. Biochemical, functional and structural characterization of Akbu-LAAO: a novel snake venom L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Biochimie**, Paris, v. 92, n. 4, p. 343-349, 2010.

SYKA, J. E. et al. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 26, p. 9528-9533, 2004.

TAN, N. H.; SAIFUDDIN, M. N. Isolation and characterization of an unusual form of L-amino acid oxidase from King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. **Biochemistry International**, Sydney, v. 19, n. 4, p. 937-944, 1989.

_____. Substrate specificity of king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase. **International Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 323-327, 1991.

TAOUATAS, N.; HECK, A. J.; MOHAMMED, S. Evaluation of metalloendopeptidase Lys-N protease performance under different sample handling conditions. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 9, n. 8, p. 4282-4288, 2010.

TEMPONE, A. G. et al. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 280, n. 3, p. 620-624, 2001.

TORII, S. et al. Molecular cloning and functional analysis of apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. **Biochemistry**, Washington, v. 39, n. 12, p. 3197-3205, 2000.

TOYAMA, M. H. et al. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 47-57, 2006.

TÕNISMÄGI, K. et al. L-amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: isolation, characterization, effects on platelets and bacteria. **Toxicon**, Oxford, v. 48, n. 2, p. 227-237, 2006.

UEBERHEIDE, B. M. et al. Rapid sensitive analysis of cysteine rich peptide venom components. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 17, p. 6910-6915, 2009.

UEDA, M.; CHANG, C. C.; OHNO, M. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan habu snake). **Toxicon**, Oxford, v. 26, n. 8, p. 695-706, 1988.

UETZ, P. **The Reptile Database (2015)**. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org/>>. Acesso em: 11 fev. 2016.

UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a hub for protein information. **Nucleic acids research**, London, v. 43, n. Database issue, p. D204-12, 2015.

VAN DEN STEEN, P. et al. Concepts and principles of O-linked glycosylation. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 33, n. 3, p. 151-208, 1998.

WANG, R. et al. Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms. **The Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 106, n. 3, p. 419-427, 1996.

WANG, S. et al. Proteomic approaches for site-specific O-GlcNAcylation analysis. **Bioanalysis**, London, v. 6, n. 19, p. 2571-2580, 2014.

WANG, Y. et al. Characterization and comparison of disulfide linkages and scrambling patterns in therapeutic monoclonal antibodies: using LC-MS with electron transfer dissociation. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 83, n. 8, p. 3133-3140, 2011.

WEI, X. L. et al. Purification, characterization and potent lung lesion activity of an L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* snake venom. **Toxicon**, Oxford, v. 50, n. 8, p. 1126-1139, 2007.

WELLNER, D. Evidence for conformational changes in L-amino acid oxidase associated with reversible inactivation. **Biochemistry**, Washington, v. 5, n. 5, p. 1585-1591, 1966.

WELLNER, D.; MEISTER, A. Studies on the mechanism of action of L-amino acid oxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 236, p. 2357-2364, 1961.

WELLS, J. M.; MCLUCKEY, S. A. Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins. **Methods in Enzymology**, New York, v. 402, p. 148-185, 2005.

WERNECK, G. L. et al. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Infection**, Munich, v. 31, n. 3, p. 174-177, 2003.

WIEZEL, G. A. et al. Identification of hyaluronidase and phospholipase B in *Lachesis muta rhombeata* venom. **Toxicon**, Oxford, v. 107, p. 359-368, 2015.

WILLIS, R. A. et al. Induction of nitric oxide synthase in subsets of murine pulmonary fibroblasts: effect on fibroblast interleukin-6 production. **Clinical immunology and immunopathology**, Orlando, v. 71, n. 2, p. 231-239, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Venomous snakes distribution and species risk categories. 2010. Disponível em: <http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/>. Acesso em: 11 fev. 2016.

WU, J.; WATSON, J. T. A novel methodology for assignment of disulfide bond pairings in proteins. **Protein Science**, New York, v. 6, n. 2, p. 391-398, 1997.

WUSTER, W.; BERNILS, R. On the generic classification of the rattlesnakes, with special reference to the Neotropical *Crotalus durissus* complex (Squamata: Viperidae). **Zoologia**, Curitiba, v. 28, n. 4, p. 417-419, 2011.

YEN, T. Y. et al. Characterization of cysteine residues and disulfide bonds in proteins by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 35, n. 8, p. 990-1002, 2000.

YIN, X. et al. Glycoproteomic analysis of the secretome of human endothelial cells. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 12, n. 4, p. 956-978, 2013.

ZELANIS, A.; TASHIMA, A. K. Unraveling snake venom complexity with 'omics' approaches: challenges and perspectives. **Toxicon**, Oxford, v. 87, p. 131-134, 2014.

ZELLER, A. Snake venom action: are enzymes involved in it? **Experientia**, Basel, v. 33, n. 2, p. 143-150, 1977.

ZHANG, L.; CUI, L. A cytotoxin isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom induces apoptosis via Fas pathway in A549 cells. **Toxicology in vitro**, New York, v. 21, n. 6, p. 1095-1103, 2007.

ZHANG, W. et al. Complete disulfide bond assignment of a recombinant immunoglobulin G4 monoclonal antibody. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 311, n. 1, p. 1-9, 2002.

ZHANG, Y. et al. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chemical reviews**, Washington, v. 113, n. 4, p. 2343-2394, 2013.

ZHANG, Y. J. et al. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 309, n. 3, p. 598-604, 2003.

ZHONG, S. R. et al. Purification and characterization of a new L-amino acid oxidase from *Daboia russellii siamensis* venom. **Toxicon**, Oxford, v. 54, n. 6, p. 763-771, 2009.

ZULIANI, J. P. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: some consideration about their functional characterization. **Protein and Peptide Letters**, Hilversum, v. 16, n. 8, p. 908-912, 2009.