UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização funcional e estudo dos mecanismos de resposta ao
dano celular causado por uma L-aminoácido oxidase de
Calloselasma rhodostoma em linhagens celulares humanas**

Tássia Rafaella Costa

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização funcional e estudo dos mecanismos de resposta ao
dano celular causado por uma L-aminoácido oxidase de
Calloselasma rhodostoma em linhagens celulares humanas**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para obtenção do Título de Doutora em
Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Tássia Rafaella Costa

Orientadora: Profa. Dra. Suely Vilela

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Costa, Tássia Rafaella

Caracterização funcional e estudo dos mecanismos de resposta ao dano celular causado por uma L-aminoácido oxidase de *Calloselasma rhodostoma* em linhagens celulares humanas. Ribeirão Preto, 2014.

162p.: il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Suely Vilela.

1. *Calloselasma rhodostoma*; 2. L-aminoácido oxidase; 3. Apoptose; 4. Expressão gênica; 5. Atividade antiparasitária; 6. Bactericida; 7. Inflamação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tássia Rafaella Costa

Caracterização funcional e estudo dos mecanismos de resposta ao dano celular causado por uma L-aminoácido oxidase de *Calloselasma rhodostoma* em linhagens celulares humanas.

Tese de doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Toxicologia para
obtenção do Título de Doutora em Ciências
Área de Concentração: Toxicologia
Orientadora: profa. Dra. Suely Vilela

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico essa Tese aos meus avós: Arthur e Zezé,
Pessoas maravilhosas, que sempre estiveram ao meu lado, e que muitas
vezes abdicaram de seus próprios anseios a favor dos meus. Guardarei
para sempre seus ensinamentos, seus gestos solidários, seus exemplos de
honestidade, e principalmente o amor e o carinho com que sempre me
protegeram e me ensinaram os limites da vida!*

A vocês minha eterna gratidão!!

Simplesmente Amo vocês!!

Agradecimentos

À Deus que me carregou quando faltaram forças...

*Aos meus queridos pais: **Emília** e **Omar**, por terem sempre estado ao meu lado apoiando-me em todas as minhas decisões e dando-me todo o carinho e amor. Por terem investido e acreditado sempre na educação e me incentivado a trilhar meu próprio caminho e não desistir dos meus sonhos. Por acreditarem em mim e por compartilhar das minhas angústias e conquistas. Alcançamos juntos mais essa vitória. Amo os imensamente.*

Ao meu irmão Thiago e a minha “cunha” Livia, por cada momento vivido, pelo apoio e palavras de incentivo. Sem vocês essa vitória não teria o mesmo sentido. Amo vocês!!

À minha família e aos meus amigos, que de alguma forma me ajudaram a chegar até este momento. Pelo apoio e força para seguir em frente. Vocês são minha fonte de momentos de alegria e descanso do trabalho.

À minha orientadora, Dra. Suelly Vilela, por ter me acolhido em seu laboratório, pela orientação, pelos ensinamentos e pela paciência nesses quase quatro anos de convívio acadêmico, e, sobretudo, pela oportunidade da conquista de mais este Título.

À minha co-orientadora, Profa. Lusânia Antunes, pelo carinho e prontidão com que sempre me recebeu em sua sala me auxiliando na interpretação de resultados. E principalmente por ter disponibilizado equipamentos imprescindíveis para a execução dos experimentos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Toxinologia: Danilo, Anna, Carol, Marco, Raffha, Marina, Tiago, Adélia, Franco, Regina, Sante e Luiz, e todos os outros com quem tive o prazer de conviver durante esse tempo. Pela amizade, companheirismo, ensinamentos, diversão e apoio sempre. Com certeza vocês tornaram a minha caminhada menos árdua.

À Raquel, por ter me acolhido e me ajudado em uma etapa tão importante, como a elaboração do projeto.

Ao Cássio “Ksim”, o meu primeiro guia nesse mundo fantástico da biologia celular e molecular. Obrigada pelos ensinamentos, pelas conversas, desabafos, carinho e respeito. Valeu demais seu “Grazy”.

Ao Prof. Dr. Sandro Ghisla da Universidade de Konstanz na Alemanha, por ter fornecido a CR-LAAO, proteína alvo dos estudos desenvolvidos nesse projeto de doutorado.

À todos os professores que colaboraram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho, cedendo espaço em seus laboratórios, fornecendo idéias e sugestões ou dispondo de tempo precioso para auxiliar na interpretação dos resultados ou mesmo nos experimentos.

Ao Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP), em especial ao funcionário Rodrigo Sorrechia, que sempre me recebeu com muito carinho e que por mais de dois anos me auxiliou na execução das atividades bactericida e fungicida.

À Profa Dili, aos alunos e funcionários do Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP. Em especial ao aluno Alexandre Ferro Aissa que me ajudou com muita dedicação e boa vontade nos ensaios e análises de RT-qPCR.

Ao laboratório de Hematologia da FCFRP, em especial a funcionária Luciana Ambrosio e a aluna Sandra Burin, que me auxiliaram na execução e análises de Western-blot.

À Profa. Lúcia Faciolli, alunos e funcionários do laboratório Imunologia e Inflamação das Parasitoses da FCFRP. Em especial a aluna Karina Zocal que me ajudou nos ensaios de inflamação, obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e pelo auxílio na interpretação dos resultados.

A funcionária Fabiana Rosseto de Moraes, pelo auxílio nas análises de citometria de fluxo, pela amizade e pelo carinho com que sempre me recebeu em sua sala.

Ao laboratório de Parasitologia da FCFRP, em especial a funcionária Cristiana Gonçalves, que me auxiliou na execução dos ensaios leishmanicida e tripanomicida.

Ao laboratório Especial de bacteriologia e epidemiologia molecular da FCFRP, por ter fornecido as cepas bacterianas utilizadas nos ensaios bactericidas. Em especial à funcionária Joseane Cristina Ferreira, por ter me auxiliado na preparação das amostras para as análises microscópicas.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), à Universidade de São Paulo (USP) e a todos os seus funcionários, por tudo o que me proporcionaram para a conclusão do meu doutorado.

À FAPESP (Processo 2011/02645-3) pelo auxílio financeiro, favorecendo o bom desempenho do projeto.

As fundações CAPES e CNPq, ao NAP-TOXAN-USP e ao USP/FUSP/FINEP (no. 01.09.0447.00 – CT-INFRA 2008 - Sub-projeto 228524) pelo auxílio financeiro.

*“Quero, um dia dizer às pessoas que nada foi em vão....
Que o amor existe e que vale a pena se doar às amizades e às causas, que
a vida é bela sim e que eu sempre dei o melhor de mim...
e que valeu a pena.”*

Mário Quintana

RESUMO

COSTA, T. R. **Caracterização funcional e estudo dos mecanismos de resposta ao dano celular causado por uma L-aminoácido oxidase de *Calloselasma rhodostoma* em linhagens celulares humanas.** 2014. 162 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

As L-aminoácido oxidases (LAAOs) isoladas de peçonhas de serpentes são alvos de um grande número de pesquisas devido às suas inúmeras ações biológicas e farmacológicas. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar funcionalmente a L-aminoácido oxidase da peçonha de *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO) por meio das atividades: bactericida, fungicida, leishmanicida, tripanomicida, citotóxica, inflamatória e análise da expressão de genes e proteínas apoptóticas. A CR-LAAO mostrou-se altamente citotóxica sobre as células tumorais HepG2 e HL-60, promovendo cerca de 80% de morte celular na maior concentração testada (100 µg/mL) e apresentou baixa toxicidade sobre células PBMC. Foi possível observar que a proteína induziu apoptose (AV+) em PBMC. Em HepG2, as menores concentrações (0,1-2,5 µg/mL) causaram apoptose (AV+), e as maiores (5-100 µg/mL) causaram apoptose/necrose (PI+/AV+). Em HL-60, as concentrações testadas (0,1-100 µg/mL) induziram apoptose/necrose (PI+/AV+). A expressão do gene *FAS* e ativação das caspases 8 e 3 determinou a ativação da via extrínseca da apoptose na linhagem HL-60. A CR-LAAO promoveu algumas alterações na modulação do ciclo celular, sendo que nas linhagens tumorais os atrasos se concentraram nas fases G0/G1 e S do ciclo celular. Ademais, a CR-LAAO mostrou-se bactericida contra as cepas *S. aureus* e *E. coli*, com maior especificidade para a cepa gram-positiva (*S. aureus*). Em análises de microscopia de transmissão, foi possível observar um desmantelamento da parede celular bacteriana. Após 6h de pré-incubação com *C. albicans*, a CR-LAAO foi capaz de inibir 80% do crescimento da levedura. A CR-LAAO mostrou-se também um bom agente leishmanicida contra as espécies *L. infantum chagasi* (IC₅₀=16,66 µg/mL) e *L. braziliensis* (IC₅₀=24,47 µg/mL) e inibiu o crescimento da forma promastigota do *Trypanosoma cruzi* (IC₅₀=196,8 µg/mL). Testes *in vivo* revelaram que a CR-LAAO promoveu inflamação local aguda, recrutando células inflamatórias como neutrófilos e induzindo a formação de citocinas (IL-6 e IL-1β) e mediadores lipídicos (LTB₄ e PGE₂). Os resultados obtidos sugerem que a CR-LAAO apresenta potencial biotecnológico evidente, com efeitos antiparasitários, fungicida, bactericida, bem como atividade antitumoral *in vitro*. Dessa forma, os resultados obtidos para a CR-LAAO fornecem subsídios importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas de ação direcionada, como quimioterápicos e antimicrobianos mais eficazes.

Palavras chaves: *Calloselasma rhodostoma*; L-aminoácido oxidase; apoptose; expressão gênica; atividade antiparasitária; bactericida; inflamação.

ABSTRACT

COSTA, T. R. **Functional characterization and study of the mechanisms of response to the cellular damage caused by an L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodostoma* in human cell lines.** 2014. 162 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

L-amino acid oxidases (LAAOs) isolated from snake venoms are targets of a large number of researches due to their numerous biological and pharmacological actions. The objective of this study was to functionally characterize the L-amino acid oxidase from the venom of *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO) through the activities: bactericidal, fungicidal, leishmanicidal, trypanocidal, cytotoxic, inflammatory and analysis of gene expression and apoptotic proteins. CR-LAAO showed high cytotoxicity in HepG2 and HL-60 tumor cells, inducing about 80% cell death at the highest concentration tested (100 µg/mL) and showing low toxicity in PBMC cells. It was observed that the protein induced apoptosis (AV+) in PBMC. In HepG2, lower concentrations (0.1-2.5 µg/mL) caused apoptosis (AV+), while major concentrations (5-100 µg/mL) caused apoptosis/necrosis (PI+/AV+). In HL-60, the concentrations tested (0.1-100 µg/mL) induced apoptosis/necrosis (PI+/AV+). The FAS gene expression and activation of caspases 8 and 3 determined the activation of the extrinsic pathway of apoptosis in HL-60 cells. CR-LAAO promoted some changes in the modulation of the cell cycle, and delays in tumor cell lines were concentrated in G0/G1 and S cell cycle phases. In addition, CR-LAAO proved to be bactericidal against *S. aureus* and *E. coli* strains, with higher specificity for Gram-positive strains (*S. aureus*). In analyses of transmission electron microscopy, it was possible to observe a dismantling of the bacterial cell wall. After 6 hours of preincubation with *C. albicans*, CR-LAAO was able to inhibit 80% of growth of yeast. CR-LAAO also showed antiparasite potential against species *L. chagasi infantum* (IC₅₀ = 16.66 µg/mL) and *L. braziliensis* (IC₅₀ = 24.47 µg/mL) and inhibited the growth of *Trypanosoma cruzi* promastigote form (IC₅₀ = 196.8 µg/mL). *In vivo* tests revealed that CR-LAAO promotes acute local inflammation by recruiting inflammatory cells as neutrophils and by inducing the production of cytokines (IL-6 and IL-1β) and lipid mediators (PGE₂ and LTB₄). The results suggest that CR-LAAO presents evident biotechnological potential, with antiparasite, fungicidal, bactericidal and antitumor effects *in vitro*. Thus, the results obtained for CR-LAAO provide important information for the development of therapeutic strategies with directed action, such as more effective chemotherapeutic and antimicrobial agents.

Keywords: *Calloselasma rhodostoma*; L-amino acid oxidase; apoptosis; gene expression; antiparasite activity; bactericide; inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da desidrogenação catalisada por L-aminoácido oxidase.....	3
Figura 2. Foto da serpente <i>Calloselasma rhodostoma</i>	8
Figura 3. Representação estrutural da forma monomérica da LAAO de <i>Calloselasma rhodostoma</i> (CR-LAAO) complexada com o substrato L-fenilalanina refinado a 1,8 Å.....	11
Figura 4. Esquema da montagem de microplaca para teste antimicrobiano (CIM).....	44
Figura 5. Viabilidade celular avaliada por MTT após tratamento com cisplatina.....	52
Figura 6. Viabilidade celular avaliada por MTT após tratamento com CR-LAAO.....	53
Figura 7. Viabilidade celular avaliada por MTT após tratamento com CR-LAAO e catalase.....	55
Figura 8. Avaliação do potencial apoptótico/necrótico da CR-LAAO por citometria de fluxo.....	57
Figura 9. Avaliação do potencial apoptótico/necrótico da CR-LAAO na presença de catalase por citometria de fluxo.....	59
Figura 10. Migração eletroforetica de RNA total extraídas de células HepG2 tratadas com CR-LAAO.....	61
Figura 11. Migração eletroforetica de RNA total extraídas de células HL-60 tratadas com CR-LAAO.....	61
Figura 12. Perfil de expressão dos genes <i>FAS</i> , <i>BAX</i> e <i>BCL2</i> por RT-qPCR para a linhagem tumoral HepG2 tratadas com CR-LAAO.....	63
Figura 13. Perfil de expressão dos genes <i>FAS</i> , <i>BAX</i> e <i>BCL2</i> por RT-qPCR para a linhagem tumoral HL-60 tratadas com CR-LAAO.....	64
Figura 14. Avaliação da ativação das caspases 3, 8 e 9 pela CR-LAAO em células HL-60.....	65
Figura 15. Avaliação da expressão das proteínas BCL2 e BAX pela CR-LAAO em células HL-60 e HepG2.....	66
Figura 16. Avaliação da progressão do ciclo celular após o tratamento com CR-LAAO.....	68

Figura 17. Atividade bactericida da CR-LAAO sobre as cepas <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	70
Figura 18. Microscopia de transmissão eletrônica de <i>S. aureus</i> tratada com CR-LAAO.....	74
Figura 19. Microscopia de transmissão eletrônica de <i>E. coli</i> tratada com CR-LAAO.....	75
Figura 20. Quantificação da espessura da parede celular das bactérias <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	76
Figura 21. Atividade fungicida da CR-LAAO sobre <i>C. albicans</i>	77
Figura 22. Atividade fungicida da CR-LAAO sobre <i>C. albicans</i> após 6 h de tratamento.....	78
Figura 23. Efeito trimanomicida da CR-LAAO	79
Figura 24. Efeito leishmanicida da CR-LAAO	80
Figura 25. Recrutamento de células inflamatórias induzidos pela injeção i.p. de CR-LAAO no peritoneo de camundongos.....	82
Figura 26. Recrutamento de células inflamatórias induzidos pela injeção i.p. de 25 µg/mL de CR-LAAO no peritoneo de camundongos.....	84
Figura 27. Avaliação da produção de citocinas induzida pela injeção i.p. de 25 µg/mL de CR-LAAO no peritoneo de camundongos.....	85
Figura 28. Avaliação da liberação de mediadores lipídicos induzida pela injeção i.p. de 25 µg/mL de CR-LAAO no peritoneo de camundongos.....	86
Figura 29. Determinação indireta de NO nos sobrenadantes dos lavados peritoneais de camundongos tratados com CR-LAAO.....	87
Figura 30. Efeitos da CR-LAAO sobre os níveis de proteína total presente nos lavados peritoneais de camundongos.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Eficiências de amplificação da expressão de genes.....	62
Tabela 2. Determinação da CIM e CBM da CR-LAAO e dos antibióticos Ampicilina e Tetraciclina.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB gene constitutivo β -actina

ATCC Coleção Americana de Cultura de Células

CIM Concentração Inibitória Mínima

CBM Concentração Bactericida Mínima

CR-LAAO L-aminoácido oxidase isolada da peçonha da serpente *Calloselasma rhodostoma*

DMEM Meio de cultura celular (modificação do meio basal *Eagle* – BME)

DMSO Dimetilsulfóxido

FAD Flavina Adenina Dinucleotídeo

FMN Flavina mononucleotídeo

HepG2 Células de carcinoma de fígado

HL-60 Células de leucemia promielocítica humana

IC₅₀ Concentração requerida para atingir 50% do efeito inibitório máximo

IL-6 Interleucina 6

IL-1 β Interleucina 1 β

i.p. injeção intraperitoneal

LAAOs L-aminoácido oxidases

LTB₄ Leucotrieno B₄

MTT 3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium

ODP o-fenildianisina

PBMC Células mononucleares de sangue periférico humano

PBS Tampão Salina fosfato

PGE₂ Prostaglandina E₂

PI Iodeto de propídio

RT-qPCR *Reverse Transcription – Quantitative Polymerase Chain Reaction*

RPMI Meio de cultura celular (*Roswell Park Memorial Institute*)

SBV Soro bovino fetal

SV-LAAOs L-aminoácido oxidases isoladas de peçonhas de serpentes

TNF- α Fator de Necrose Tumoral α

UFCs Unidade Formadora de Colônias

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos gerais das peçonhas ofídica	1
1.2. L-aminoácido oxidases (LAAOs)	2
1.2.1. L-aminoácido oxidase de <i>Calloselasma rhodostoma</i> (CR-LAAO)	7
1.2.2. Efeitos biológicos das L-aminoácido oxidases	12
1.2.2.1. Efeitos citotóxicos e indução de apoptose celular	13
1.2.2.2. Efeito microbicida	18
1.4.2. Efeito microbicida	18
1.2.2.3. Efeito antiparasitário	22
1.2.2.4. Processo inflamatório	23
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo geral	29
2.2. Objetivos específicos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. MATERIAL	31
3.1.1. Proteína	31
3.1.2. Linhagens celulares	31
3.1.3. Outras linhagens	31
3.1.4. Animais	32
3.2. MÉTODOS	32
3.2.1. Ensaio de atividade específica de L-aminoácido oxidase	32
3.2.2. Manutenção da linhagem celular em suspensão (HL-60)	32
3.2.2.1. Subcultivo da HL-60	33
3.2.3. Manutenção da linhagem celular aderente (HepG2)	33
3.2.3.1. Subcultivo da HepG2	33
3.2.4. Viabilidade celular	34
3.2.5. Extração de células mononucleares de sangue total (PBMC)	35
3.2.6. Caracterização funcional	35
3.2.6.1. Ensaio de citotoxicidade (MTT)	35
3.2.6.2. Análise de apoptose/necrose por citometria de fluxo	36
3.2.6.3. Análise da expressão gênica	37
3.2.6.3.1. Extração de RNA	37
3.2.6.3.2. Quantificação de RNA	37
3.2.6.3.3. Avaliação da integridade do RNA	38

3.2.6.3.4. Síntese de cDNA e PCR em tempo real	38
3.2.6.4. Detecção da expressão proteica por <i>Western-blot</i>	40
3.2.6.5. Análise do ciclo celular	41
3.2.6.6. Atividade bactericida	42
3.2.6.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio do método de diluição em microplaca e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	42
3.2.6.8. Microscopia eletrônica de transmissão	44
3.2.6.9. Atividade fungicida	45
3.2.6.10. Detecção da atividade leishmanicida	46
3.2.6.11. Detecção da atividade tripanomicida	46
3.2.6.12. Avaliação do influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal	47
3.2.6.13. Dosagem indireta de óxido nítrico (NO) pela reação de Griess	48
3.2.6.14. Quantificação de proteínas	48
3.2.6.15. Quantificação de citocinas por ELISA	49
3.2.6.16. Determinação da concentração de mediadores lipídicos	49
3.2.7. Análise estatística	49
4. RESULTADOS	51
4.1. Avaliação da citotoxicidade	51
4.1.1. Determinação da IC ₅₀ da cisplatina	51
4.1.2. Avaliação do potencial citotóxico da CR-LAAO	51
4.2. Análise do potencial apoptótico/necrótico da CR-LAAO	56
4.3. Análise da expressão diferencial dos genes <i>BAX</i> , <i>FAS</i> e <i>BCL2</i>	60
4.3.1. Expressão diferencial dos genes <i>BAX</i> , <i>FAS</i> e <i>BCL2</i> em HepG2	63
4.3.2. Expressão diferencial dos genes <i>BAX</i> , <i>FAS</i> e <i>BCL2</i> em HL-60	64
4.4. Análise da expressão proteica das caspases 3, 8 e 9 nas células HL-60 e HepG2	65
4.5. Análise da expressão proteica de BAX e BCL2 nas células HL-60 e HepG2	66
4.6. Análise da cinética do ciclo celular	67
4.7. Atividade bactericida	69
4.8. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio do método de diluição em microplaca e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	71
4.9. Microscopia eletrônica de transmissão	73
4.10. Atividade fungicida	76
4.11. Atividade tripanomicida	78
4.12. Atividade leishmanicida	79
4.13. Avaliação do recrutamento de células na cavidade peritoneal induzidos por diferentes concentrações de CR-LAAO	81
4.14. Avaliação do recrutamento de células na cavidade peritoneal induzidos por 25 µg/mL de CR-LAAO em diferentes tempos de tratamento	83
4.15. Determinação de citocinas presentes no fluido peritoneal após a injeção i.p. de 25 µg/mL de CR-LAAO	85

4.16. Determinação de LTB ₄ e PGE ₂ presentes no fluido peritoneal após a injeção i.p. de 25 µg/mL de CR-LAAO	86
4.17. Determinação da concentração de nitrito (NO ₂ ⁻) e aumento de proteína total presentes no fluido peritoneal após a injeção i.p. de 25 µg/mL de CR-LAAO	87
5. DISCUSSÃO	90
5.1. Potencial antitumoral da CR-LAAO.....	90
5.2. Potencial microbicida da CR-LAAO	104
5.3. Potencial antiparasitário da CR-LAAO.....	111
5.4. Potencial inflamatório da CR-LAAO.....	112
6. CONCLUSÕES	119
REFERÊNCIAS	122
ANEXO A	143
ANEXO B	144

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais das peçonhas ofídicas

As serpentes são animais peçonhentos capazes de produzir e inocular substâncias tóxicas. Elas estão distribuídas por quase todos os ambientes terrestres e ao longo da história da civilização, sempre exerceram algum tipo de influência sobre os homens, seja na arte, na religião ou ainda na ciência (MEBS, 2002; CARDOSO et al., 2003; WHO, 2010).

Apesar de serem vistas de maneira totalmente destrutiva por muitas pessoas, estes répteis são de fundamental importância no controle biológico de diversos animais que afetam a vida da humanidade, como os ratos (COSTA, 2011).

Existem aproximadamente 3000 espécies de serpentes no mundo, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias, sendo que apenas 410 (~ 13,7%) são consideradas peçonhentas e classificadas de acordo com suas características morfológicas em quatro famílias: Viperidae, Elapidae, Hydrophiidae e Colubridae (BARRAVIEIRA, 1999; CARDOSO et al., 2003; WHO, 2010).

Os acidentes ofídicos são considerados um problema de saúde pública, sobretudo em países tropicais e subtropicais, tanto pela incidência dos acidentes, quanto pela intensidade com que as peçonhas atuam nos organismos (WHO, 2010). O quadro clínico desenvolvido pela vítima pode ser muito variado, dependendo da quantidade de peçonha inoculada, da localização da picada, da idade da vítima e condições gerais de saúde antes do acidente e principalmente do tempo decorrido entre o acidente e o atendimento médico (PINHO; PEREIRA, 2001).

As peçonhas de serpentes são constituídas por uma complexa mistura de substâncias orgânicas e inorgânicas. Entretanto, cerca de 90% do peso seco da peçonha é formado por proteínas, muitas das quais apresentam atividade enzimática, e são responsáveis por patologias graves, como necrose, apoptose, neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, hemorragia, e perturbações da hemostasia do sangue (BJARNASON; FOX, 1994; GUTIÉRREZ, 2002; MEBS et al., 2002; CALVETE et al., 2007).

Nas últimas décadas inúmeras pesquisas têm sido realizadas a fim de investigar a bioquímica e a farmacologia das peçonhas de serpentes. Descobriu-se que as mesmas proteínas responsáveis por esses distúrbios, apresentam um grande potencial como drogas para tratamento de doenças humanas, como por exemplo, as L-aminoácido oxidases que se apresentam como citotoxinas com capacidade de

destruir certos tipos de células tumorais, incluindo as células leucêmicas (COSTA et al., 2014; GASANOV et al., 2014; IZIDORO et al., 2014).

1.2. As L-aminoácido oxidases (LAAOs)

As L-aminoácido oxidases (LAAOs, EC 1.4.3.2) são flavoenzimas encontradas em diferentes organismos, tais como bactérias, fungos, algas, peixes, caracóis e em peçonhas de serpentes das famílias Viperidae, Crotalidae e Elapidae (VALLON et al., 1993; DU; CLEMETSON, 2002; KAMIO et al., 2009; CHEN et al., 2011; WANG et al., 2011; NUUTINEN et al., 2012, IZIDORO et al., 2014).

Até o momento quase todas as LAAOs descritas são flavoproteínas que apresentam estrutura dimérica, em que cada subunidade faz uma ligação não covalente com o FMN (Flavina mononucleotídeo) ou com o FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo), sendo este último o cofator comumente encontrado em LAAOs de peçonhas de serpentes. As flavinas presentes nas LAAOs são responsáveis pela cor amarela característica de muitas peçonhas de serpentes e contribuem para a toxicidade do envenenamento por causa do estresse oxidativo resultante da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GUO et al., 2012).

Essa característica faz com que as LAAOs sejam classificadas como oxidoredutases FAD-dependentes, sendo capazes de catalisar a deaminação oxidativa dos substratos L-aminoácidos em α -cetoácidos de forma estereoespecífica. O ciclo catalítico inicia-se com a meia-reação redutora envolvendo a conversão do FAD em $FADH_2$ e concomitante oxidação do aminoácido em iminoácido. O iminoácido sofre hidrólise não enzimática liberando o α -cetoácido e amônia. Uma meia-reação oxidativa completa o ciclo reoxidando $FADH_2$ com o oxigênio molecular produzindo peróxido de hidrogênio (Figura 1) (CURTI et al., 1992; KOMMOJU et al., 2007; LI et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009; SUN et al., 2010; ALVES-PAIVA et al., 2011; COSTA et al., 2014).

FIGURA 1. Representação da reação de desidrogenação catalisada por L-aminoácido oxidases (Adaptado de COSTA et al., 2014).

Em 1944, Stumpf e Green descreveram a primeira L-aminoácido oxidase descoberta na bactéria *Proteus vulgaris*. Desde então, LAAOs de várias origens têm sido isoladas e caracterizadas bioquimicamente, enzimaticamente e biologicamente. Esses estudos demonstram que LAAOs de fontes diferentes são distintas em relação a sua massa molecular, especificidade por substratos, modificações pós-traducionais (glicosilação) e suas regulações. Essa diversidade sugere que as L-aminoácido oxidases sofreram grandes mudanças evolutivas a partir de uma proteína ancestral comum (KOMMOJU et al., 2007). Embora as LAAOs estejam distribuídas em diferentes organismos, as L-aminoácido oxidases de peçonhas de serpentes (SV-LAAOs) são as enzimas mais estudadas dessa família de proteínas (DU; CLEMETSON, 2002).

No quadro de envenenamento ofídico, as SV-LAAOs estão relacionadas a efeitos no local da mordida, como hemorragia e edema, e a alterações sistêmicas, como alterações plaquetárias e distúrbios de coagulação sanguínea (SOUZA et al., 1999; STÁBELI et al., 2007; ALVES et al., 2008; IZIDORO et al., 2014). De acordo com Ande e colaboradores (2006) a existência das LAAOs nas peçonhas ofídicas, também, pode ser um meio de proteção contra agentes naturais, parasitas e bactérias, pois elas são capazes de induzir apoptose em diversas linhagens de células e demonstram atividade antimicrobiana e antiparasitária.

As SV-LAAOs de diferentes espécies variam amplamente entre si em termos da massa molecular, especificidade por substrato, estabilidade, atividades

enzimáticas e biológicas (DU; CLEMETSON, 2002; CISCOTTO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009; GUO et al., 2012, IZIDORO et al., 2014).

Geralmente, as SV-LAAOs compõem de 1 a 9% do conteúdo proteico das peçonhas das famílias de serpentes *Viperidae*, *Crotalidae* e *Elapidae*, e quase sempre apresentam alta atividade enzimática. As LAAOs presentes nas peçonhas de serpentes marinhas são descritas, em sua maioria, como sendo enzimas de baixa atividade enzimática (TAN; SAIFUDDIN, 1991; TAN et al., 1993; ALI et al., 2000; SAKURAI et al., 2003; SAMEL et al., 2008;).

A maioria das SV-LAAOs são enzimas termolábeis, podendo ser inativadas também com variações no pH do tampão de armazenamento (DU; CLEMETSON, 2002; SAMEL et al., 2006; ALVES et al., 2008; HUANG ; XU, 2009; GUO et al., 2012).

A atividade enzimática das SV-LAAOs é determinada por um ensaio com peroxidase de rabanete onde o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado pela LAAO é consumido pela peroxidase para oxidar a o-fenildianisidina (ODP), gerando um radical cátion que é monitorado em espectrofotômetro a 436 nm. A L-leucina é o substrato comumente utilizado nesse método, isso porque as LAAOs exibem uma preferência por aminoácidos hidrofóbicos, incluindo fenilalanina, triptofano e tirosina. Aminoácidos carregados positivamente, tais como L-lisina e L-arginina apresentam interações eletrostáticas desfavoráveis com o sítio catalítico da enzima. A preferência catalítica por esses aminoácidos pode ser explicada pela presença de sítios ligantes de substrato nas cadeias laterais da enzima, que são responsáveis pela especificidade de substrato das SV-LAAOs (PONNUDURAI et al., 1994; MOUSTAFA et al., 2006, IZIDORO et al., 2014).

As SV-LAAOs exibem espectros de absorção entre 380 e 465 nm devido à presença da flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Elas devem ser estocadas a 4°C em solução tampão com pH neutro, afim de evitar inativação proteica. Nesse caso o diagnóstico pode ser feito tanto pelo ensaio com peroxidase, quanto pela mudança no espectro de absorção, sendo que ambos indicam alterações no microambiente do cofator FAD (DU; CLEMETSON, 2002).

A inativação dessa enzima pode ser confirmada pelas alterações nos espectros de dicroísmo circular, que sugerem estruturas distintas entre as formas nativa e inativa, e também entre as formas inativas por congelamento e por mudanças no pH (COLES et al., 1977). Embora, esse fenômeno de interconversão

das formas nativa e inativa de SV-LAAOs e seu mecanismo fisiológico ainda não estejam bem esclarecidos, sabe-se que algumas formas inativas são passíveis de reversão, e as condições mais favoráveis de reativação envolvem o tratamento das LAAOs a 37°C e pH variando em 5,5 e 7,5 (CURTI et al., 1968; COLES et al., 1977; DU; CLEMETSON, 2002, IZIDORO et al., 2014).

A atividade catalítica das SV-LAAOs também pode ser inibida na presença de inibidores metálicos como o EDTA, PMSF e glutathione, que promovem uma redução do cofator FAD (MANNERVICK et al., 1980; MACKESSY, 1985). Diferentes íons bivalentes podem ativar ou inibir a atividade específica de algumas SV-LAAOs. A LAAO de *Crotalus adamanteus* requer Mg^{2+} , ao passo que as enzimas de *Lachesis muta* e *Bothrops brazili* são inibidas na presença de Zn^{2+} (CISNEROS, 1996; SOLIS et al., 1999). Outros íons como manganês e cálcio não afetam a atividade destas LAAOs. A ação inibidora desses íons pode estar relacionada com a capacidade que eles têm de se ligarem de forma reversível a grupos tióis de cisteínas presentes no centro ativo da enzima, reduzindo sua atividade e comprometendo seus efeitos farmacológicos (BENDER; BRUBACHER, 1977; IZIDORO et al., 2014).

Em geral, as SV-LAAOs são homodiméricas com massa molecular variando entre 120 a 150 kDa na forma nativa e de 50 a 70 kDa em suas formas monoméricas, e ponto isoelétrico (pI) entre 4,4 e 8,12 (SOUZA et al., 1999; DU; CLEMETSON, 2002). Curiosamente, formas ácidas, neutras e básicas de SV-LAAOs podem coexistir na mesma peçonha de serpente, podendo apresentar diferentes propriedades farmacológicas entre si (STILES et al., 1991).

Esta variação na massa molecular entre diferentes SV-LAAOs pode estar relacionada com os sítios de glicosilação, uma vez que estas enzimas são consideradas glicoproteínas (DU; CLEMETSON, 2002; GUO et al., 2012). Esta classe de enzimas é caracterizada por uma porcentagem variável de açúcares de acordo com a espécie da serpente (PONNUDURAI et al., 1994; STÁBELI et al., 2004; 2007; ALVES et al., 2008; IZIDORO et al., 2014) e carboidratos como a fucose, manose, galactose, N-acetilglucosamina e ácido siálico já foram identificados na estrutura dessas enzimas (KOK et al., 1969; ALI et al., 1999). Estes açúcares são ligados à enzima por ligações N-glicosídicas e provavelmente modulam suas propriedades físico-químicas, aumentando a solubilidade e viscosidade da proteína, e mantêm a estabilidade das cargas elétricas (BUTZKE et al., 2005; STÁBELI et al., 2007; IZIDORO et al., 2014).

Uma das características mais interessantes que as SV-LAAOs apresentam é o número de sítios de glicosilação, compartilhando uma sequência consenso de N-glicosilação na porção C-terminal (Asn361) (PAWELEK et al., 2000; MACHEROUX et al., 2001; GEYER et al., 2001). A presença da porção glicano nas regiões C-terminal está relacionada com as atividades biológicas atribuídas às SV-LAAOs. Estudos com a Apoxin-I (fator de apoptose com atividade LAAO isolada de *C. atrox*) sugerem que a inibição da N-glicosilação implica na extinção da atividade catalítica dessa toxina, e consequentemente altera suas atividades biológicas como indução de apoptose celular (SUHR; KIM, 1996; TORRI et al., 1997; ANDE et al., 2006). No entanto, a deglicosilação não teve efeito sobre a atividade enzimática das LAAOs de *B. pauloensis*, *B. jararaca*, *B. alternatus* e *B. moojeni* (STABELI et al., 2004, 2007; RODRIGUES et al., 2009; CISCOTTO et al., 2009), o que estimula uma maior investigação sobre o papel da glicosilação em SV-LAAOs e os mecanismos correspondentes. Recentemente, Izidoro e colaboradores (2014) sugeriram que o carboidrato presente na estrutura das SV-LAAOs desempenha apenas um papel estrutural e protege a enzima contra a proteólise, uma vez que as peçonhas são ricas em enzimas proteolíticas.

Além disso, estudos sugerem que a porção glicano é responsável pela ancoragem da enzima na célula hospedeira, o que pode explicar a facilidade das LAAOs em direcionar o peróxido de hidrogênio para a célula alvo e, assim, induzir a apoptose da célula hospedeira (MOUSTAFA et al., 2006).

Nos últimos anos, muitos estudos foram realizados a fim de desvendar as sequências de aminoácidos das SV-LAAOs (MACHEROUX et al., 2001; KOMMOJU et al., 2007; JIN et al., 2007; RODRIGUES et al., 2009; CHEN et al., 2012). As análises comparadas dos clones dos cDNAs de algumas SV-LAAOs mostram que existem muitas similaridades entre elas (*Crotalus adamanteus*, *Crotalus atrox*, *Calloselasma rhodostoma*, *Agkistrodon Halys blomhoffii*, *Trimeresurus stejnegeri* e *Bothrops moojeni* apresentam identidade sequencial de 80%), e também com partes da monoamina oxidase humana, bacteriana e fúngica (referente aos aminoácidos que codificam para o sítio de ligação de FAD) (MACHEROUX et al., 2001; RODRIGUES et al., 2009; IZIDORO et al., 2014).

O sequenciamento da região N-terminal indicou que alguns resíduos de aminoácidos são conservados em diferentes SV-LAAOs, insinuando que a presença de uma glutamina altamente conservada nessa região possa ser responsável pela

ligação do substrato em locais específicos da molécula, relacionados com a potência das atividades biológicas de SV-LAAOs (STÁBELI et al., 2004, 2007; TOYAMA et al., 2006; MOUSTAFA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2009; GUO et al., 2012).

Um exemplo de SV-LAAO que já foi amplamente estudada e caracterizada bioquimicamente é a CR-LAAO isolada da peçonha da serpente *Calloselasma rhodostoma*, a qual foi foco do presente estudo.

1.2.1. L-aminoácido oxidase de *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO)

A espécie *Calloselasma rhodostoma* (anteriormente chamada de *Agkistrodon rhodostoma*), popularmente conhecida como Malayan pit viper (jararaca asiática), é encontrada principalmente no sudeste da Ásia (MC DIARMID et al., 1999). Esta serpente é responsável pela maioria dos acidentes ocorridos na Tailândia, Camboja, Laos, norte da Malásia, Ilha de Java, sul de Mianmar, norte de Sumatra e norte de Bornéu (REID et al., 1963a; PORNMUTTAKUN; RATANABANANGKOON, 2014). Um exemplar adulto dessa espécie pode chegar a 1 metro de comprimento e apresenta escamas lisas e coloração de fundo variando entre o castanho a cinza e faixas triangulares ao longo de toda a extensão corporal (Figura 2). Geralmente são encontradas em florestas costeiras, bambuzais, pomares e plantações de grãos (MEHRTENS, 1987; TAN; PONNUDURAI, 1996; BRUSERUD, 2013).

A Malayan pit viper, assim como as serpentes botrópicas brasileiras, pertence à família Viperidae e sua peçonha é conhecida por causar dor intensa, inchaço e necrose local, bem como danos sistêmicos, como alterações na coagulação sanguínea provocadas por um desequilíbrio temporário entre a síntese e o consumo do fibrinogênio. Entretanto, assim como nos acidentes botrópicos, o índice de mortalidade é de apenas 2%, sendo a principal sequela grave necrose no local da mordida, seguida de amputação (REID et al., 1963a; BRUSERUD, 2013).

FIGURA 2. Foto da espécie *Calloselasma rhodostoma* (fonte: www.snakebiteinitiative.org).

Em 1986, Tan e colaboradores analisaram o conteúdo enzimático de 4 amostras de peçonhas obtidas de serpentes *C. rhodostoma* capturadas em locais diferentes. Essas amostras foram analisadas em coluna cromatográfica de troca iônica (DEAE-Sephacel), onde todos os picos obtidos foram submetidos a ensaios enzimáticos para a detecção de diferentes enzimas. Em todas as amostras, foi possível constatar a presença de fosfodiesterase, fosfomonoesterase, 5'-nucleosidase, proteases, fosfolipases A₂ (PLA₂s), LAAO, hialuronidase, arginina éster-hidrolase, arginina amidase, fibrinogenase e outras enzimas com atividade coagulante. Desde então, essa peçonha tem sido exaustivamente estudada, tanto pela sua significância clínica devido ao grande número de acidentes com a jararaca asiática, quanto pelo seu potencial terapêutico devido a sua ação coagulante (HO et al., 1986; WARREL et al., 1986; CHINONAVANIG et al., 1988; PUKRITTAYAKAMEE et al., 1990; THEAKSTON et al., 1990; BANDO et al., 1991; AU et al., 1991; 1993a; 1993b; SWEETMAN et al., 1992; PONNUDURAI et al., 1993; 1994; CHANG; HUANG et al., 1995; CHUNG et al., 1996; WANG et al., 1999; 2001; PORNMANEE et al., 2008; FUNG et al., 2010; TAN et al., 2011; PORNMUTTAKUN; RATANABANANGKON, 2014).

Em um estudo mais recente de análise comparativa do proteoma das peçonhas das quatro mais importantes espécies de serpentes da Malásia, 26

proteínas foram identificadas na peçonha da *C. rhodostoma*. A peçonha apresentou-se como uma fonte rica em fosfolipases A₂, desintegrinas, lectina do tipo C, metaloproteinase, L-aminoácido oxidase e serinoprotease (VEJAYAN et al., 2014).

A maioria dos estudos com a peçonha de *C. rhodostoma*, está relacionado com a purificação e caracterização de proteínas que interferem na hemostasia sanguínea, como por exemplo, a rhodostoxin que é uma hemorragina com alto potencial proteolítico, hemorrágico e indutor de edema e a kistomin, que é uma metaloprotease da classe P-I, com efeito antitrombolítico *in vivo* (PONNUDURAI et al., 1993; HSU et al., 2007).

A rhodocytin é uma lectina do tipo C que se liga facilmente a CLEC-2 (receptor de lectina do tipo C). O CLEC-2 é altamente expresso em plaquetas e megacariócitos, e em concentrações mais baixas em várias outras células mielóides. Sua ativação desencadeia uma via de sinalização intracelular resultando na ativação plaquetária, induzindo a agregação, bem como iniciação de respostas imunológicas (SHIN, MORITA, 1998; BRUSERUD, 2013).

Um dos estudos mais promissores desenvolvido até o momento com a peçonha de *C. rhodostoma*, é com o ancrod. O ancrod é uma serinoprotease trombina-símile que cliva a cadeia A α do fibrinogênio formando fibrina, mas diferentemente da trombina, não é suscetível à inibição por inibidores plasmáticos como a antitrombina. Esta enzima também ativa o sistema fibrinolítico, formando plasmina e levando à eventual depleção de plasminogênio. Seu efeito defibrinogenante reduz a viscosidade do sangue, melhorando assim as características de fluxo sanguíneo (GARDINER; ANDREWS, 2008).

A enzima ancrod tem sido utilizada em vários ensaios clínicos, principalmente em tratamentos de acidentes vasculares cerebrais (AVC), para examinar os efeitos de agentes defibrinogenantes em diversas condições clínicas (HOSSMANN et al., 1983; SHERMAN et al., 2000; DEMPFLÉ et al., 2000; 2001a; 2001b; HENNERICI et al., 2006; LEVY et al., 2006; 2009; LIU et al., 2011).

Com o nome comercial Viprinex®, o ancrod, mostrou-se efetivo em testes contra acidentes vasculares cerebrais isquêmicos agudos (SAMSA et al., 2002) e como depletor de fibrinogênio (KOH et al., 2006). Embora resultados iniciais para o seu uso no tratamento de AVCs tenham sido muito promissores, o ancrod falhou na fase 3 de testes clínicos em 2008, e atualmente não está sendo desenvolvido como

um medicamento para esta finalidade (MACKESSY, 2010). Contudo, ele tem sido considerado para uso em combinação com agentes trombolíticos em indivíduos com doenças arteriais (GARDINER; ANDREWS, 2008).

Outras proteínas isoladas da peçonha de *C. rhodostoma*, como as miotoxinas Cr-IV 1 e Cr 5 (induzem mionecrose e edema *in vivo*), as desintegrinas kistrin (apresentou potencial antitumoral em células de melanoma B16F10) e a rhodostomin (apresentou propriedades anti-inflamatórias), não estão envolvidas em alterações vasculares (TSENG et al., 2004; OLIVA et al., 2007; BONFIM et al., 2006; 2008).

A L-aminoácido oxidase de *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO) foi isolada por Ponnudurai e colaboradores (1994) em apenas dois passos cromatográficos, coluna de exclusão molecular Sephadex G-200 seguida por uma coluna de troca iônica Mono-Q, obtendo-se a enzima com massa molecular relativa de 132.000 (66.000 na presença de agentes redutores) e pI 4,4.

A CR-LAAO apresenta um pH ótimo alcalino, entretanto manteve-se estável em solução tampão com pH neutro e temperaturas variando entre 4 e 25 °C por até 5 dias e a -20 °C por até 60 horas. Ainda nesse estudo, foi possível observar que aproximadamente 30% do peso seco da peçonha bruta de *Calloselasma rhodostoma* corresponde à CR-LAAO, e 4% da massa molecular da proteína corresponde a carboidratos, sendo identificada a presença de manose e N-acetyl-D-glucosamina na porção glicano (PONNUDURAI et al., 1994).

Em 2001, Macheroux e colaboradores sequenciaram algumas regiões da molécula e reportaram que a CR-LAAO apresenta 83% de identidade com as LAAOs de *Crotalus adamanteus* e *Crotalus atrox*.

A CR-LAAO, assim como as demais SV-LAAOs, é funcionalmente um dímero, onde cada subunidade é formada por 3 domínios estruturais: domínio ligante de FAD, domínio ligante de substrato e domínio helicoidal. Um estudo cristalográfico da estrutura da CR-LAAO com o substrato L-fenilalanina indica a formação de um funil em forma de Y entre os domínios ligantes de substrato e o helicoidal, onde uma porção serviria de porta de entrada para O₂ durante a semi-reação oxidativa e a segunda região desempenharia um papel na liberação de H₂O₂ para a superfície exterior da proteína, perto da porção glicano (Figura 3) (PAWELEK et al., 2000; MOUSTAFA et al., 2006).

FIGURA 3. Representação estrutural da forma monomérica da LAAO de *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO) complexada com o substrato L-fenilalanina refinado a 1,8 Å. A estrutura revela possíveis canais específicos para a entrada de O₂ (A) e liberação de H₂O₂ (B) a partir do sítio ativo, durante a meia reação oxidativa. Os elementos estruturais que compõem o domínio ligante de FAD estão representados em azul ciano, o domínio de ligação do substrato está em azul escuro e o domínio helicoidal está em magenta. Os canais são apresentados como uma superfície molecular calculado pelo programa Caver preenchido com moléculas de água (esferas vermelhas). A porção glicano se liga ao resíduo Asn172. O N- terminal e o C- terminal da CR-LAAO são indicados por esferas azuis e vermelhas, respectivamente (MOUSTAFA et al., 2006).

Uma glicosilação adicional foi encontrada na porção N-terminal da CR-LAAO, ligada ao aminoácido Asn172 (MACHEROUX et al., 2001). A elucidação da estrutura tridimensional da CR-LAAO e a informação sobre a presença de dois sítios de glicosilação (PAWELEK et al., 2000) proporcionaram a identificação da porção glicano ligada a essa enzima, como sendo um dodecassacarídeo (GEYER et al., 2001).

Em 1994, Ponnudurai e colaboradores reportaram a presença de FMN, ao invés de FAD, como sendo o cofator da CR-LAAO. Entretanto, mais tarde outro estudo detectou 2 mols de FAD por mol de enzima na estrutura do cristal da CR-LAAO (MOUSTAFA et al., 2006). O mesmo ocorreu com a LAAO de *Trimeresurus mucrosquamatus*, que se liga tanto a FMN, quanto a FAD (UEDA et al., 1988). Na verdade, essa análise requer maiores investigações, mais fica claro que, embora a

maioria das LAAOs se ligue a FAD, pode ocorrer a ligação com outros membros da família das flavoenzimas.

A fim de caracterizar as formas nativa e inativa da CR-LAAO, Macheroux e colaboradores (2001) inativaram a enzima estocando-a a -20°C em tampão fosfato com pH 7,8. Após o descongelamento, observou-se menos de 1% de atividade L-aminoácido oxidase original (forma ativa). Entretanto, quando colocada em tampão acetato de sódio pH 5, seguido de tratamento térmico (37°C), ocorreu a reativação enzimática. Foi monitorado ainda o espectro de absorbância das duas formas, observando-se uma diferença muito pequena entre elas, o que sugere que as duas formas proporcionam microambientes similares para o cofator FAD. Entretanto, esse processo de reativação não foi obtido com sucesso para as LAAOs de *C. atrox* e *C. adamanteus* (MACHEROUX et al., 2001).

Com o auxílio de técnicas de biologia molecular, foi feita a clonagem e a expressão heteróloga da CR-LAAO em levedura *Pichia pastoris*. O clone e a expressão foram bem sucedidos, e a LAAO expressa exibiu um perfil eletroforético muito semelhante à CR-LAAO nativa (62 kDa), bem como a especificidade por substratos. Entretanto, a CR-LAAO recombinante não foi expressa com atividade enzimática, característica comum à maioria das SV-LAAOs já expressas (KOMMOJU et al., 2006).

Apesar da CR-LAAO já ter tido suas características estruturais, moleculares e bioquímicas desvendadas, pouco se sabe sobre os efeitos farmacológicos dessa enzima. Avaliar o seu potencial biotecnológico e esclarecer seus mecanismos de ação é muito importante para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

1.2.2. Efeitos biológicos das L-aminoácido oxidases

Estudos indicam que LAAOs de peçonhas de serpentes apresentam inúmeros efeitos biológicos e farmacológicos, como indução de apoptose celular, citotoxicidade, indução e inibição de agregação plaquetária, hemorragia, hemólise, edema, atividades bactericida e antiparasitária (DU; CLEMETSON, 2002; SAMEL et al., 2008; ZHONG et al., 2009; SUN et al., 2010; LEE et al., 2011; NAUMANN et al., 2011; BURIN et al., 2013; MUÑOZ et 2014).

Embora várias SV-LAAOs tenham sido caracterizadas com diversas funções biológicas, os mecanismos pelos quais essas enzimas exercem suas atividades não estão totalmente esclarecidos. Acredita-se que os efeitos biológicos destas enzimas

devem-se, ao menos parcialmente, ao peróxido de hidrogênio gerado durante a reação enzimática, pois na presença de catalase, um agente que degrada H_2O_2 , a ação das LAAOs é geralmente inibida (DU; CLEMETSON, 2002).

1.2.2.1. Efeitos citotóxicos e indução de apoptose celular

O termo apoptose foi proposto por Kerr e colaboradores, em 1992, para descrever a via de morte programada das células durante o desenvolvimento celular que desempenha um papel importante no desenvolvimento e manutenção de organismos superiores. Esse processo é disparado por lesões no DNA, causadas por agentes físicos, químicos e/ou biológicos, e pode ser definido por várias características morfológicas e bioquímicas, tais como a exposição de fosfatidilserina ao folheto exterior da membrana plasmática, condensação nuclear e a clivagem da cromatina em fragmentos oligonucleossomais (DYPBUKT et al., 1994; BONFOCO et al., 1995; ANDE et al., 2006).

O fenômeno da apoptose celular quando iniciado promove a ativação de eventos moleculares que culminam na ativação de certas proteases, denominadas caspases, as quais são responsáveis pelo desmantelamento e morte celular (AMARANTE-MENDES; GREEN, 1999). O processo de apoptose pode ocorrer por 2 vias principais: via intrínseca (mitocondrial) e extrínseca (receptores de morte). A via intrínseca pode ser desencadeada pela ação de diferentes sinais de estresse intracelular, tais como irradiação, agentes quimioterápicos, vírus, bactérias e ausência de fatores de crescimento celular, os quais convergem para a mitocôndria, induzindo a translocação de citocromo c e SMAC (*second mitochondria-derived activator of caspases*) destas organelas para o citosol, resultando na presença de APAF-1 e ativação de caspase-9. A via extrínseca é iniciada pela ligação dos receptores de morte ("DR, *Death Receptors*" - FAS/CD95, TNFR1, DR3, DR4, DR5 e DR6) aos seus respectivos ligantes. Os DR são moléculas existentes na superfície celular que apresentam um domínio extracelular rico em cisteína e um domínio intracelular denominado DD (*death domain*). O ligante de FAS associado ao DD (FADD) permite o recrutamento da pro-caspase 8, formando o complexo DISC (*Death-inducing signaling complex*). A pró-caspase 8 é autoclivada e transformada em caspase 8 ativa, sendo então liberada para o citoplasma, onde poderá agir diretamente na ativação da caspase 3 (fase executora do processo de apoptose), ou então agir na clivagem da molécula BID, a qual se dirige à mitocôndria, induzindo a

liberação de citocromo c e SMAC. A clivagem de BID representa um ponto de interconexão entre as vias extrínseca e intrínseca da apoptose (AMARANTE-MENDES; GREEN, 1999; ZIVNY et al., 2010)

A regulação da via mitocondrial é realizada pelos membros da família BCL-2, proteínas citoplasmáticas capazes de integrar sinais de sobrevivência ou morte celular gerados nos meios intra e extracelulares (BORNBERG, 2003). Essa família subdivide-se em duas classes: proteínas anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-x_L, BCL-w, MCL-1 e A1), cuja função é proteger a célula da morte, e pró-apoptóticas (BAX, BAK, BAD, BID, BMF *etc*), que sensibilizam ou conduzem a célula à apoptose (BORNBERG, 2003). A via executora do processo de apoptose é comum a ambas as vias iniciadoras, que caracteriza-se pela ativação das caspases executoras, a saber, caspases-3, -6 e -7, e pelo desmantelamento celular característico da apoptose (DU et al., 2000 ; SHARMA et al., 2000; SUSIN, et al., 1999). O equilíbrio das interações entre as proteínas pró- e anti-apoptóticas definem a ocorrência da morte celular.

Inúmeros estudos já relataram que os processos apoptóticos induzidos por LAAOs são parcialmente explicados pela geração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que se acumula na superfície da membrana celular. O peróxido de hidrogênio pertence às espécies reativas de oxigênio (ROS), e é amplamente aceito que o aumento da concentração de ROS promove um desarranjo mitocondrial da célula, causando a morte celular (SUHR; KIM, 1996; TORII et al., 1997; DU; CLEMETSON, 2002; ZHANG et al., 2004; ANDE et al., 2006; ALVES et al., 2008; ZHANG; WU, 2008; RODRIGUES et al., 2009; SOUZA et al., 2009; WEI et al., 2009; ALVES-PAIVA et al., 2011; GUO et al., 2012). A fim de certificar-se dessa atribuição, vários estudos com L-aminoácido oxidases isoladas de serpentes, avaliam seus efeitos citotóxicos na presença da catalase (conhecida por sua capacidade em degradar H₂O₂ em H₂O e O₂), sendo possível observar que a ação tóxica das SV-LAAOs é praticamente anulada (DU; CLEMETSON, 2002; ROJKIND et al., 2002; GUO et al., 2012).

Durante o estresse oxidativo, o H₂O₂ em baixas concentrações tem uma função de ativação e transcrição de alguns genes que poderiam prevenir a morte celular. Entretanto, um aumento na concentração de H₂O₂ induz um atraso no crescimento e morte celular por apoptose (SOUZA et al., 1999, DU; CLEMETSON, 2002). O mecanismo das LAAOs na atividade apoptótica é ainda pouco conhecido, mas estudos sugerem que o H₂O₂ produzido durante a reação enzimática, a

ativação das caspases ou ainda a interação destas enzimas com algum receptor de membrana são os principais responsáveis por essa atividade (DiPIETRANTONIO et al., 1999; SUHR; KIM, 1996; DU; CLEMETSON, 2002; ANDE et al., 2006).

A exposição a agentes tóxicos pode desencadear apoptose ou necrose, sendo que ambos os processos ocorrem em função da dose e da duração da exposição. A necrose representa uma forma acidental de morte celular, ocorrendo uma falha na homeostasia celular depois que a célula sofre danos (SCHULTZ; HARRINGTON, 2003). Uma célula em necrose tem aumento de tamanho, o que causando fragilidade da membrana e aumento da permeabilidade, levando ao seu rompimento, liberando o conteúdo celular e gerando a inflamação local (SCHULTZ; HARRINGTON, 2003; ANDE et al., 2006).

A influência de agentes tóxicos pode ser estudada na análise do ciclo celular. O ciclo celular é um conjunto de processos pelos quais uma célula passa durante sua divisão celular. Em condições normais, esses processos ocorrem de maneira contínua e repetitiva (VERMEULEN et al., 2003).

O ciclo de divisão celular é didaticamente dividido em duas fases: intérfase e mitose. Na intérfase ocorre a duplicação do DNA e a preparação para a fase seguinte: a mitose, na qual ocorre a divisão celular propriamente dita. A intérfase é subdividida em G₀, G₁, S e G₂ (SCHAFER, 1998; VERMEULEN et al., 2003).

Durante o ciclo celular ocorrem paradas (pontos de checagem ou “*checkpoints*”) a fim de verificar as condições do material genético no momento da divisão celular. Essas checagens envolvem várias proteínas de reparo celular (CDK's; CKI's; CHK), que controlam por meio de diferentes vias a inibição ou a progressão do ciclo. As proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDK's) estimulam a progressão do ciclo celular e são reguladas por suas subunidades A, B, D, E e H. Essas proteínas se ligam às ciclinas, promovendo assim a passagem de fases (VERMEULEN et al., 2003).

Algumas células estão permanentemente em G₀ e, somente após algum estímulo, é iniciado o ciclo, como acontece com os linfócitos, que são células mononucleares sanguíneas, que só entram em G₁ após sofrerem estímulos por antígenos. Na fase G₀, as células estão em repouso, ou seja, sem atividade no ciclo (SCHAFER, 1998). Na fase G₁, o ciclo é iniciado, as células recebem estímulos positivos ou negativos, sendo levadas ao crescimento, diferenciação, multiplicação ou apoptose, bem como à produção de enzimas e outras moléculas necessárias

para a próxima fase do ciclo. Algumas células levam dias ou anos para sair de G1, enquanto outras passam pela fase em poucas horas (10 a 12h, em média). Há aumento do volume celular e aumento no número de organelas e ocorre a produção de RNA para síntese do DNA. As células em G1 são responsáveis pelo reparo de danos acidentais, como os causados por espécies reativas de oxigênio (ROS) ou por agentes químicos, raios ultravioletas ou radiação ionizante.

Em G1 atuam não somente as CDK's, mas também as CKI's (inibidores de quinases dependentes de ciclina) e CHK (proteínas "*checkpoint*"). As proteínas CHK são responsáveis por avaliar a integridade do DNA antes da sua replicação, gerando sinais "*delay*" por meio de um gene chamado *ataxia-telangiectasia mutated* (ATM). Este gene ativa CKI's fazendo com que o ciclo celular seja atrasado, assim o DNA pode ser reparado e o ciclo celular pode prosseguir, tendo-se assim, atraso na fase G1 antes da síntese de um novo DNA. Na fase S e G2, o atraso do ciclo celular é regulado por ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) e ATR (*ataxia-telangiectasia-related protein*) que ativam as CKI's, nessas fases (DOUGLAS; HADDAD, 2003).

As CKI's impedem a saída das células de uma fase, por isso são consideradas supressoras tumorais. A qualquer sinal de dano ao DNA, ocorre atuação das CKI's, o ciclo é suspenso e as células são encaminhadas ao sistema de reparo até que o DNA lesado seja reparado ou encaminhado à apoptose.

Depois de realizados os reparos, as células passam para a fase S pela ação da CDK2/E. Na fase S ocorre a síntese do DNA (por isso o reparo é efetuado anteriormente). A CDK/A tem função importante para a replicação do DNA, fosforilando proteínas específicas envolvidas nas origens de replicação do DNA. Na fase S são observadas várias origens de replicação. Estas são igualmente importantes nesta fase, em vista dos pontos de metilação, pois enviam sinais de que determinada sequência da molécula já foi replicada, impedindo excesso de material duplicado. Outro componente é o complexo mitótico ciclina B-cdc2 ou fator promotor da mitose (MPF), que permanece inativo durante toda a fase S e protege a célula de uma divisão antes que ela esteja totalmente pronta para isto (DOUGLAS; HADDAD, 2003).

A fase G2 consiste basicamente na síntese de RNA e proteínas que serão usadas para a mitose. O processo de entrada e saída da mitose é regulado pelo acúmulo e ativação de CDK's. O atraso em G2 não requer o uso do gene *p53* (CKI's), diferentemente de G1, em vez disso, o atraso se dá pelo acúmulo de

proteínas mitóticas. O *checkpoint* parece atuar prevenindo a ativação das CDK's, impedindo a progressão da célula para mitose (SCHAFFER, 1998; DOUGLAS; HADDAD, 2003).

A lesão gerada ao DNA em G1, S ou G2 deve ser reparada, pois é a última linha de defesa frente ao DNA lesado e, caso o mesmo não seja reparado, a célula prossegue para mitose e dará início a produção de células defeituosas (células tumorais) ou sofrem processo de morte celular por apoptose ou necrose (DOUGLAS; HADDAD, 2003).

Avaliando os inúmeros estudos realizados com as peçonhas de serpentes, observa-se que há vários componentes isolados capazes de promover citotoxicidade em diferentes linhagens celulares (GUO et al., 2012; COSTA et al., 2014). Esse efeito pode ser revertido ou não pelo sistema de reparo celular. Quando não revertido, as células danificadas podem entrar em apoptose ou mesmo morrerem imediatamente, sem que a célula possa se rearranjar para ser fagocitada (Necrose) (DU; CLEMETSON, 2002).

Os efeitos citotóxicos de SV-LAOs têm sido avaliados em diversas linhagens celulares tumorais, como S180 (tumor Ascístico Murino Sarcoma 180), SKBR-3 (adenocarcinoma de mama), Jurkat (leucemia T aguda humana), EAT (tumor ascístico de Erlich), B16F10 (melanoma murino), PC12 (feocromocitoma de glândula adrenal de rato), bem como em células não tumorais (macrófagos e linfócitos), sendo que o dano em células normais geralmente é insignificante quando comparado com as células tumorais (AHN et al., 1997; IZIDORO et al., 2006; ALVES et al., 2008).

Embora o mecanismo de citotoxicidade das SV-LAOs não tenha sido totalmente esclarecido, sabe-se que os lipídios presentes nas membranas celulares podem ser danificados por espécies reativas de oxigênio (ROS) (IMLAY, 2003; OKUBO et al., 2012). Considerando que as membranas das células tumorais apresentam maior concentração de lipídio em relação às células normais, especula-se que a presença do peróxido de hidrogênio produzido pelas LAOs tenha ação direta (maior citotoxicidade) sobre a membrana das células tumorais e baixa toxicidade sobre células normais (YANG et al., 2011; BURIN et al., 2013).

Em 1993, Araki e colaboradores reportaram pela primeira vez apoptose em células endoteliais vasculares, causada por peçonhas hemorrágicas. Pouco depois,

outros dois grupos de pesquisadores, apontaram que as LAAOs presentes nas peçonhas hemorrágicas eram as grandes responsáveis pelo efeito apoptótico nessas células endoteliais (SUHR; KIM, 1996; TORII et al., 1997). Desde então, muitos estudos vêm descrevendo o efeito apoptótico das LAAOs em diferentes linhagens celulares (TORII et al., 1997; SOUZA et al., 1999; ANDE et al., 2006; ALVES et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009; ALVES-PAIVA et al., 2011; LI LEE et al., 2014), sugerindo que as L-aminoácido oxidases estão diretamente ligadas a ação citotóxica das peçonhas.

Atualmente existe um grande interesse no uso de compostos de origem animal e vegetal que tenham ação em diferentes mecanismos, como alteração do metabolismo carcinogênico, indução de sistemas de reparo ao DNA e ativação ou supressão da progressão do ciclo celular e apoptose. Processos apoptóticos e danos celulares são alguns dos mecanismos de ação propostos para muitas toxinas de peçonhas de serpentes (DU; CLEMETSON, 2002; ZHANG; WU, 2008; ALVES-PAIVA et al., 2011; MARCUSSI et al., 2011), deixando claro que essas substâncias podem ser utilizadas como modelo para o desenvolvimento de quimioterápicos e outros agentes antitumorais mais eficazes.

1.2.2.2. Efeito microbicida

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011), as infecções bacterianas estão entre as 10 principais causas de morte no mundo. A presença e emergência de cepas multirresistentes aos agentes terapêuticos disponíveis, aumentam os riscos dessas infecções, tornando o tratamento dessas doenças cada vez mais difícil. Por isso, estudos que visam o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos eficazes e seguros têm revolucionado as pesquisas médicas atuais. A maioria dessas pesquisas busca em compostos naturais, sejam eles, de origem animal ou vegetal, substâncias ativas contra esses microorganismos (VARGAS et al., 2013).

Algumas proteínas e peptídeos isolados de peçonha de serpentes têm mostrado efeitos antimicrobianos contra várias espécies de bactérias e fungos, até mesmo contra algumas cepas resistentes a medicamentos, o que pode torná-las potenciais fármacos antimicrobianos auxiliares ou mesmo substituindo fármacos já comercializados (PÁRAMO et al., 1998; DU; CLEMETSON, 2002; NUNES EDOS et

al., 2011; KAO et al., 2012; GUO et al., 2012; HAO et al., 2013; MUÑOZ et al., 2014).

Skarnes (1970) foi o primeiro pesquisador a relatar a atividade bactericida de uma LAAO isolada de peçonha da serpente *Crotalus adamanteus*. Da mesma forma, muitas outras SV-LAAOs demonstraram ter este potencial farmacológico, como as LAAOs de *C. durissus cascavela*, *B. pirajai*, *B. moojeni*, *Agkistrodon halys*, *Vipera lebetina*, *B. pauloensis* e *Naja naja oxiana* (ZHANG et al., 2004; TONISMAGI et al., 2006; TOYAMA et al., 2006; IZIDORO et al., 2006; SAMUEL et al., 2008 RODRIGUES et al., 2009).

Os efeitos tóxicos das SV-LAAOs têm sido notificados tanto frente a procariotos gram-positivos, quanto a gram-negativos (DU; CLEMETSON, 2002; KASAI et al., 2010; GUO et al., 2012). Embora, o mecanismo de ação das SV-LAAOs sobre as bactérias ainda não esteja totalmente elucidado, existem evidências de que proteínas presentes nas peçonhas de serpente promovam uma permeabilização ou mesmo a formação de poros na parede celular desses microorganismos, permitindo a interação da enzima com o meio intracelular bacteriano (PÁRAMO et al., 1998; GUO et al., 2012; HAO et al., 2013).

Algumas bactérias estão frequentemente ligadas à rotina do ser humano, seja por fazer parte da microbiota natural, como *Staphylococcus aureus*, ou por estarem presentes como contaminantes de alimentos, como *Escherichia coli* (MARTINS, 1999; CAMPOS et al., 1999).

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva amplamente distribuída na natureza que faz parte da microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos e aves. É o agente mais comum de infecções piogênicas e em indivíduos debilitados pode causar doenças de caráter mais grave. É conhecida pela sua elevada capacidade de desenvolver resistência a diversos antibióticos (MARTINS, 1999).

Provavelmente, nenhuma outra espécie bacteriana é tão versátil em sua patogenicidade quanto a *Escherichia coli*, bactéria gram-negativa que pode causar infecções intestinais, urinárias, septicemias, meningites, além de outros tipos (CAMPOS et al., 1999). A *E.coli* pode ser resistente a um número crescente de antibióticos (β -lactâmicos e não β -lactâmicos), sendo que a maioria das infecções causadas por essa bactéria tem sido tratada com o uso de ciprofloxacina. No entanto, tendo-se um fármaco de escolha para uma infecção, obviamente, seu consumo crescerá, aumentando, mais uma vez, a proporção de cepas resistentes,

assim como em um círculo vicioso (BEOVIC, 2006). A resistência de bactérias gram-negativas, junto à resistência de *S. aureus* à metacilina, é um grande problema, especialmente nas unidades de tratamento intensivo (BEOVIC, 2006).

Os antibióticos β -lactâmicos fazem parte de uma classe ampla de antibióticos, que possuem como agente antibiótico o núcleo β -lactâmico presente em sua estrutura molecular. É a classe de antibióticos mais utilizada, atuando na inibição da síntese de peptidoglicanos. Existem 4 sub-classes de antibióticos β -lactâmicos: os penicilínicos (derivados da penicilina, ex: ampicilina); cefalosporínicos; carbapenêmicos e clavulanatos (NICKLAS, 1998).

A ampicilina e a oxaciclina são antibióticos β -lactâmicos semissintéticos derivados da penicilina. A ampicilina foi o primeiro penicilínico a apresentar ação contra bactérias gram-negativas. Em consequência do seu uso indiscriminado em todo o mundo, a resistência bacteriana a ampicilina desenvolveu-se de maneira constante e ascendente, sendo atualmente incerta a eficácia deste fármaco frente a determinadas infecções, principalmente as causadas por bacilos gram-negativos e estafilococos hospitalares (NICKLAS, 1998; ROSÁRIO; GRUMACH, 2006).

Os microorganismos tornam-se resistentes às penicilinas principalmente devido à ação de um ou mais dos seguintes mecanismos: inativação do antibiótico por β -lactamases bacterianas, através do rompimento do anel β -lactâmico do núcleo das penicilinas; redução na permeabilidade da membrana externa e, conseqüentemente, uma menor capacidade do antibiótico atingir as proteínas ligantes apropriadas; alterações estruturais nas proteínas ligantes à penicilina (NICKLAS, 1998).

A tetraciclina faz parte do grupo de antibióticos não β -lactâmicos, que receberam essa denominação devido à sua estrutura química, formada por quatro anéis. Apresenta amplo espectro de ação, incluindo bactérias gram-positivas, gram-negativas aeróbias e anaeróbias, espiroquetas, riquetsias, micoplasma, clamídias e alguns protozoários. É inibidor específico do ribossomo procariótico (bacteriano), bloqueando o receptor na subunidade 30S que se liga ao t-RNA durante a tradução gênica, inibindo a síntese de proteínas, o que impede a replicação e leva à morte celular. O principal mecanismo de resistência microbiana à tetraciclina é por diminuição da acumulação desse antibiótico no interior da célula. A resistência pode ser cromossômica ou, mais frequentemente, mediada por plasmídeos ou transposons (AMATO et al., 2007).

Os estudos dos efeitos antibacterianos das SV-LAOs têm se restringido em determinar o potencial dessas enzimas em bactérias gram-positivas e gram negativas (CISCOTO et al., 2009; LEE et al., 2011; VARGAS et al., 2013; IZIDORO et al., 2014; MUÑOZ et al., 2014). Apenas um estudo até o momento foi realizado com SV-LAOs e bactérias resistentes, no qual a LAO isolada de *Platichthys stellatus* mostrou-se altamente letal contra *S. aureus* resistentes à metaciclina (KASAI et al., 2010). Os efeitos das SV-LAOs sobre cepas bacterianas resistentes e o estudo de seus mecanismos de ação são muito importantes na busca de alternativas terapêuticas eficazes contra esses microorganismos.

A *Candida albicans* é uma espécie de levedura frequentemente isolada a partir de amostras biológicas. Trata-se de agente colonizador habitual de pele e mucosas humanas, sendo que 25 a 30% dos indivíduos são seus portadores na cavidade oral, com maior incidência em lactentes, crianças e pessoas com AIDS. Falta de higiene bucal e próteses dentárias aumentam a taxa de porte bucal, sendo o porte vaginal particularmente prevalente durante a gravidez (KWON-CHUNG et al., 1992; KONEMAN et al., 2001).

A candidíase das mucosas pode afetar a cavidade oral, canal vaginal, traqueia, brônquios e canal alimentar. As infecções da pele envolvem áreas úmidas, como os espaços interdigitais das mãos, pés e axilas. São frequentes as infecções de unhas e dermatite em recém-nascidos na área das fraldas. A candidíase sistêmica é relativamente rara, sendo um evento terminal em pacientes com doenças debilitantes, neoplásicas e imunossupressoras. São citadas cinco condições que predispõem à infecção por *C. albicans* (RIPPON, 1998): a) período anterior ao estabelecimento da microbiota normal (lactentes); b) gravidez, disfunção endócrina, diabetes melitus; c) administração prolongada de antimicrobiano que altera a microbiota normal e uso de anticoncepcionais; d) fatores que causam debilidade, como AIDS e alterações da função leucocitária; e) solução de continuidade em barreiras corpóreas causada por procedimentos cirúrgicos e inserção de cateter permanente (KONEMAN et al., 2001).

O tratamento das candidíases vem se tornando cada vez mais difícil devido à emergência de cepas resistentes aos antifúngicos tradicionalmente utilizados. Novos agentes têm-se demonstrado tóxicos e de alto custo. A reincidência das infecções também tornou-se um fator preocupante do controle das candidíases. Todos esses fatores tornaram nítida a necessidade de novos agentes antifúngicos (RUNYORO et

al., 2006).

Nos últimos 10 anos tem crescido, significativamente, a investigação de produtos naturais ativos contra *Candida* sp (DUARTE; FIGUEIRA, 2006). Entretanto, poucas LAAOs isoladas de peçonhas têm sido investigadas na inibição do crescimento da levedura *C. albicans*, como a LAAO isolada de *B. marajoensis* (COSTA et al., 2010) e a LAAO de *B. atrox* (ALVES-PAIVA et al., 2011).

1.2.2.3. Efeito antiparasitário

Alguns estudos evidenciam o potencial biotecnológico das SV-LAAOs como agentes antiparasitários, principalmente com ação leishmanicida e tripanomicida (TOYAMA et al., 2006; IZIDORO et al., 2006; STABELI et al., 2007; RODRIGUES et al., 2009; CISCOTTO et al., 2009; COSTA et al., 2010; BREGGE-SILVA et al., 2012).

A leishmaniose é uma doença endêmica tropical, popularmente conhecida como úlcera de Bauru ou Calazar, podendo afetar o homem e o cão. Causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, é transmitida ao homem pela picada de mosquitos flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (chamados de "mosquito palha" ou birigui). Sua manifestação pode ser através de ulcerações cutâneas ou infecções viscerais e poucos fármacos estão disponíveis para o tratamento da leishmaniose, devido à alta toxicidade (CONTIJO; MELO, 2004; TEMPONE et al., 2001).

No Brasil existem atualmente 6 espécies de *Leishmanias* responsáveis pela doença humana, e mais de 200 espécies de flebotomíneos implicados em sua transmissão (CONTIJO; MELO, 2004). O desenvolvimento de novos medicamentos para leishmaniose é extremamente necessário. Segundo Izidoro et al. (2006), a LAAO de *B. pirajai* foi muito eficaz contra as cepas *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani* e *L. major*. Formas promastigotas da espécie *Leishmania amazonensis* mostram-se sensíveis à ação da LAAO isolada da peçonha de *B. jararaca* (CISCOTO et al., 2009). Alves-Paiva e colaboradores (2011) também observaram os efeitos de uma LAAO isolada de *B. atrox* sobre algumas espécies de *Leishmania*, revelando a morte dos parasitas de forma dose-dependente. O mesmo efeito foi visto na espécie *L. braziliensis*, promovido pela LAAO de *Lachesis muta* (BREGGE-SILVA et al., 2012).

Outra doença endêmica tropical altamente negligenciada é a doença de Chagas. Estima-se que cerca de 18 milhões de pessoas estejam infectadas com o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, e mais do que 100 milhões de pessoas

estão expostos ao risco de infecção (WHO, 2007; MOLFETA et al., 2005). A doença é transmitida através das fezes de insetos, conhecidos no Brasil como barbeiros ou chupança. A forma tripomastigota do protozoário entra nas células do hospedeiro, transforma-se em amastigota, multiplica-se e transforma-se em tripomastigota novamente, depois rompe as células e cai na corrente sanguínea. No barbeiro, a forma tripomastigota se transforma em epimastigota no intestino do inseto, multiplica-se e transforma-se em tripomastigota novamente (TEXEIRA et al., 2001).

Os sintomas da doença de Chagas podem variar durante o curso da infecção. Nos primeiros anos, na fase aguda, os sintomas são inchaço nos locais de infecção. À medida que a doença progride, os sintomas tornam-se crônicos e graves, tais como insuficiência cardíaca e desordens do sistema digestivo. Se não tratada, a doença pode ser fatal (TEXEIRA et al., 2001; CAVALI et al., 2009).

Na fase inicial aguda, a administração de fármacos como nifurtimox, alopurinol e benzonidazol cura completamente ou diminuem a probabilidade de cronicidade em mais de 80% dos casos. Já a fase crônica é incurável, pois os danos em órgãos como o coração são irreversíveis (TEXEIRA et al., 2001; MOLFETA et al., 2005). Entretanto, efeitos secundários tóxicos são evidenciados na maioria dos compostos sintéticos utilizados para tratar doenças parasitárias. Existem relatos de que o nifurtimox causa efeitos colaterais gastrointestinais e neurológicos, genotoxicidade e atividade carcinogênica na bexiga, no rim e no fígado de ratos (MOLFETA et al., 2005; CAVALI et al., 2009).

A pesquisa de fármacos mais eficazes e menos tóxicos do que os atualmente disponíveis para a doença de Chagas é necessária. Atualmente poucos trabalhos avaliaram toxinas de peçonhas de serpentes contra cepas de *Trypanosoma cruzi*, sendo que as LAAOS de *B. atrox* e *B. jararaca* mostraram-se potencialmente ativas contra esse parasita (DEOLINDO et al., 2010; ALVES-PAIVA et al., 2011).

1.2.2.4. Processo inflamatório

A inflamação é classicamente descrita como sendo uma resposta a um agente agressor em que o organismo busca reestabelecer a homeostase, possibilitando a cura e a reconstituição dos tecidos danificados (TEIXEIRA et al., 2009; OKIN; MEDZHITOV, 2012).

Uma resposta inflamatória pode ser desencadeada por uma variedade de estímulos nocivos, incluindo infecções e lesões. Esta resposta engloba uma

sequência de eventos que podem ser divididos em vasculares e celulares, culminando em sinais característicos: dor, calor, rubor e edema, que podem vir acompanhados ou não de perda de função do tecido ou órgão afetado (ROCHA E SILVA, 1978; MENALDO et al., 2013).

A inflamação pode se manifestar em diversas modalidades, podendo ser classificada como aguda ou crônica, sendo que ambas podem se apresentar de forma local ou sistêmica. Isso faz com que as respostas inflamatórias sejam altamente heterogêneas em termos de tipos de células e mediadores moleculares envolvidos (OKIN; MEDZHITOV, 2012).

A resposta inflamatória aguda ocasiona alterações funcionais da microvasculatura, levando à migração de componentes plasmáticos e celulares (leucócitos) para o local da lesão, seguido de fagocitose por células competentes (macrófagos), edema e dor local (TEIXEIRA et al., 2009). Vários mediadores inflamatórios, que incluem quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas e eicosanoides, são produzidos por células endoteliais e residentes, principalmente mastócitos, macrófagos e células dendríticas. Em paralelo, leucócitos circulantes (inicialmente neutrófilos) migram para o local da lesão sob a influência de agentes quimiotáticos e, em seguida, ocorre a fagocitose de agentes infecciosos e liberação de produtos microbicidas, como espécies reativas de oxigênio (RABINOVITCH; DE STEFANO, 1973; TEIXEIRA et al., 2009). A resolução da inflamação e a fase de reparo envolvem a diminuição dos componentes pró-inflamatórios e a liberação de mediadores químicos anti-inflamatórios principalmente por macrófagos residentes e recrutados, com subsequente remoção de fluido e detritos celulares pelo sistema linfático (SERHAN; SAVILL, 2005). Caso a resposta aguda não seja capaz de neutralizar o estímulo nocivo, o processo inflamatório persiste e adquire novas características típicas de uma inflamação crônica, como a formação de granulomas e presença de fagócitos mononucleares, células linfoides e fibroblastos na área inflamada (MEDZHITOV, 2008; TEIXEIRA et al., 2009).

A inflamação é frequentemente associada com dor e hiperalgesia. A função fisiológica da dor é alertar o cérebro do desregulamento da homeostase, permitindo que o corpo se proteja de um dano maior (McMAHON et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2009).

O fenômeno da dor é originado em fibras nervosas sensoriais periféricas pela ativação de nociceptores que transmitem informações sobre estímulos nocivos da

periferia para o sistema nervoso central. As vias periféricas da dor são ativadas por uma série de estímulos, que incluem mediadores inflamatórios envolvidos na geração, persistência e intensidade da dor. O reconhecimento inicial da lesão leva à produção e/ou liberação de mediadores como a bradicinina, histamina, serotonina, óxido nítrico (NO), prostanoídes, citocinas e outros mediadores que podem induzir dor de duas maneiras diferentes: pela ativação direta de nociceptores (como promovido pelas citocinas), e/ou pela ação sobre canais iônicos, induzindo hiperalgesia, ou seja, sensibilizando fibras sensoriais para outros mediadores e estímulos, reduzindo os seus limiares de modo que estas fibras agora respondem a estímulos de intensidades inferiores (como promovido pelas prostaglandinas, em especial pela PGE₂) (HADDAD, 2007; RITTNER et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2009).

Além da sensibilização periférica, muitas alterações centrais podem ser observadas. Essas alterações incluem modificações na expressão de receptores, hiperexcitabilidade da medula central e alterações no controle do mesencéfalo descendente. Todas essas alterações desencadeiam vários processos que culminam na liberação de mediadores lipídicos, como as enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) (TEIXEIRA et al., 2009). As enzimas COX-1 e COX-2 são importantíssimas na cascata do ácido araquidônico (substância formada a partir de lipídios presentes na membrana celular pela ação de fosfolipases A₂), pois o transformam em dois tipos de compostos: prostaglandinas e tromboxanos, que são mediadores importantíssimos no processo de inflamação e dor (KHANAPURE et al., 2007).

As citocinas são importantes mediadores inflamatórios, pois regulam e determinam a resposta imune inata e adaptativa. Elas podem ser sintetizadas por diversas células, sendo predominantemente liberadas pelos monócitos e linfócitos (ROITT, 1997).

Esses mediadores podem ser classificados em pró-inflamatórios (ex: IL-1; TNF- α ; IL-6; IL-18) e anti-inflamatórios (ex: IL-10; TGF- β ; IL-4). O fator de necrose tumoral α (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória diretamente ligada à via extrínseca da apoptose celular, bem como tem a capacidade de interagir com receptores endoteliais, promovendo um aumento da permeabilidade vascular e permitindo que os leucócitos acessem o local de infecção. Este é um tipo de resposta inflamatória localizado, contudo, a libertação sistêmica pode levar a choque séptico e morte (TERLIKOWSKI, 2001).

As interleucinas são proteínas do sistema imunológico produzidas principalmente por células T, embora algumas sejam sintetizadas também por macrófagos e células teciduais. Elas possuem várias funções, mas a maioria está envolvida na ativação dos linfócitos e na indução da divisão de outras células. Cada interleucina atua sobre um grupo limitado e específico de células que expressam receptores adequados para cada uma delas (POBER et al., 1986). A interleucina 6 (IL-6) é uma proteína pró-inflamatória, secretada por macrófagos, que tem a capacidade de aumentar a produção da proteína C reativa. Já a IL-10 é uma proteína anti-inflamatória que tem o papel de inibir macrófagos ativados (TAGA et al., 1989).

O envenenamento por serpentes é normalmente caracterizado pelo acentuado dano tecidual local, com hemorragia, mionecrose, formação de bolhas e inflamação proeminente. Esta resposta inflamatória está intimamente relacionada ao progresso da lesão tecidual, gerando edema e induzindo a dor, a infiltração de leucócitos e a liberação de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; MOURA-DA-SILVA et al., 2007; LOPES et al., 2009). Diversos mediadores já foram relacionados à inflamação promovida por peçonhas de serpentes, incluindo serotonina, histamina, fatores derivados do sistema complemento, citocinas e metabólitos de ciclooxygenases e lipooxygenases (TREBIEN; CALIXTO, 1989; CHAVES et al., 1995; FARSKY et al., 1997; ZAMUNER et al., 2001; ZAMUNER; TEIXEIRA, 2002; OLIVO et al., 2007).

O edema local é uma das principais características do envenenamento botrópico, sendo resultado da síntese e/ou liberação de potentes mediadores pró-inflamatórios, como eicosanoides que causam extravasamento plasmático e vasodilatação. Estes efeitos podem ser desencadeados por diferentes componentes da peçonha, bem como por danos na microvasculatura (GUTIÉRREZ et al., 1984; TREBIEN; CALIXTO, 1989; CHAVES et al., 1995; GALVÃO NASCIMENTO et al., 2010). De fato, a reação inflamatória local induzida por peçonhas botrópicas parece não estar relacionada a uma classe específica de toxinas, e sim à ação sinérgica de várias toxinas, como fosfolipases A₂ e metaloproteases (TEIXEIRA et al., 2003; 2005; MOURA-DA-SILVA et al., 2007).

Poucos estudos avaliaram os efeitos de SV-LAAOs sobre o processo inflamatório. Em 2009, Wei e colaboradores isolaram uma LAAO de *Bungarus fasciatus* (BF-LAAO), que se mostrou pró-inflamatória devido ao aumento do número

de células como neutrófilos, macrófagos e linfócitos em lavados peritoneais de camundongos. Os efeitos *in vitro* da L-aminoácido oxidase de *C. rhodostoma* sobre neutrófilos humanos isolados, foram investigados. Em concentrações não citotóxicas, a CR-LAAO foi capaz de estimular os neutrófilos a liberarem mediadores pró-inflamatórios, tais como a IL-8 e TNF- α (PONTES et al., 2014). Dessa forma, a avaliação dos efeitos pró-inflamatórios *in vivo* da CR-LAAO são de grande importância para a caracterização farmacológica dessa classe de proteínas.

O presente trabalho representa uma perspectiva promissora no avanço do conhecimento de mecanismos moleculares de ação da L-aminoácido oxidase da peçonha de *Calloselasma rhodostoma*. Existem vários estudos com esta proteína em relação ao aspecto estrutural e parte de sua funcionalidade. No entanto, o estudo como potencial aplicação biotecnológica a partir das atividades fungicida, leishmanicida, tripanomicida, bactericida, propriedades pró-inflamatórias, atividade apoptótica em células HL-60 e HepG2 e expressão gênica, a fim de identificar as vias de atuação desta proteína no processo apoptótico, ainda não foram demonstrados.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar funcionalmente a L-aminoácido oxidase da peçonha de *Calloselasma rhodostoma* por meio das atividades: bactericida, fungicida, leishmanicida, tripanomicida, citotóxica, inflamatória e análise da expressão de genes apoptóticos.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar as interações da CR-LAAO, *in vitro*, nos processos de citotoxicidade (avaliado pela metodologia do MTT), indução de apoptose e análise do ciclo celular nas linhagens HL-60, HepG2 e em células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis (PBMC) por citometria de fluxo.

2.2.2. Avaliar as interações da CR-LAAO, *in vitro*, verificando-se a expressão dos genes *FAS*, *BAX*, e *BCL2* por meio da metodologia de PCR em tempo real, bem como a identificação das proteínas a partir do transcrito dos genes mencionados por meio de *Western-blot*.

2.2.3. Avaliar a ação funcional da CR-LAAO por meio das atividades: bactericida sobre as cepas gram-negativa (*E. coli*) e gram-positiva (*S. aureus*); fungicida sobre a cepa *C. albicans*; antiparasitária sobre as cepas *Leishmania sp* e *Trypanosoma cruzi*, visando detectar a aplicação biotecnológica da proteína.

2.2.4. Avaliar as interações da CR-LAAO, *in vivo*, em camundongos Balb/c inoculados com a proteína a fim de verificar o caráter inflamatório da mesma, através do recrutamento de células para cavidade intraperitoneal e dosagens de citocinas anti e pró-inflamatórias e de mediadores lipídicos (Leucotrieno B₄ e protaglandina E₂).

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Proteína

A proteína CR-LAAO (L-aminoácido oxidase de *Calloselasma rhodostoma*) foi purificada de acordo como o método de Ponnudurai et al. (1994), e gentilmente cedida pelo professor Dr. Sandro Ghisla, Universidade de Konstanz, Alemanha. A proteína liofilizada foi armazenada a 4 °C e solubilizada em PBS para realização dos ensaios.

3.1.2. Linhagens celulares

As linhagens celulares tumorais utilizadas foram obtidas da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC – American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA).

- HL-60 (ATCC CCL-240) - leucemia promielocítica humana
- HepG2 (ATCC HB-8065) - carcinoma de fígado humano

As células humanas não tumorais (PBMC - células mononucleares humanas de sangue periférico) foram extraídas de sangue periférico de indivíduos saudáveis, como descrito no item 3.2.5, de acordo com as normas do Comitê de Ética em pesquisa humana da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP (protocolo CEP/FCFRP n° 218) (**Anexo A**).

3.1.3. Outras linhagens

As diferentes cepas dos microorganismos utilizados foram adquiridas da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC).

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)
- *Escherichia coli* (ATCC 25922)
- *Candida albicans* (ATCC 90028)
- *Leishmania braziliensis* (ATCC MHOM/BR/75/M2903)
- *Leishmania infantum chagasi* (ATCC HU-UFS- 17 – Isolada de paciente do Hospital da Universidade Federal de Sergipe)
- *Trypanosoma cruzi* (Clone B5 da cepa CLBrener)

As cepas de bactérias *S. aureus* resistentes a oxaciclina (*S. aureus* 56); induzida com clindamicina (*S. aureus* DT); e as cepas de bactérias *E. coli* resistente a β -lactâmicos (IAL45) e aos não- β -lactâmicos (JF239) foram isoladas de pacientes

(ANDRADE et al., 2010; MINARINI et al., 2009) e cedidas gentilmente pela Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

3.1.4. Animais

Camundongos Balb/c machos (20-25g) foram utilizados nos ensaios para análise de exsudatos inflamatórios peritoneais induzidos pela enzima. Foram mantidos no Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto e no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Os protocolos dos experimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto-SP (processo nº 11.1.497.53.6) (**Anexo B**).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Ensaios de atividade específica de L-aminoácido oxidase

A atividade enzimática da CR-LAAO foi determinada por um ensaio com peroxidase de rabanete, onde o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado pela LAAO, na presença da L-leucina ou de outro aminoácido hidrofóbico, é consumido pela peroxidase para oxidar a o-fenildianisidina (ODP), gerando um radical cátion que é monitorado a 490 nm em espectrofotômetro (PONNUDURAI et al., 1994; MOUSTAFA et al., 2006).

A atividade foi determinada em 5 mL da solução ensaio (L-Leucina 0,1% em Tris-HCl 0,1M, pH 7,2), onde foram adicionados 8 µL de peróxido de rabanete (1 mg/mL), 50 µL de uma solução de ODP (10 mg/mL em metanol) e 20 µL de CR-LAAO. Após 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de ácido cítrico 10% (m/v) e a absorbância determinada em 490 nm (PESSATTI et al., 1995). Antes da realização de todos os ensaios biológicos foi feito o teste de atividade específica, a fim de verificar se a proteína estava realmente ativa.

3.2.2. Manutenção da linhagem celular em suspensão (HL-60)

A linhagem HL-60 foi mantida congelada em nitrogênio líquido (-195°C) em alíquotas de 1×10^6 células/mL em solução de congelamento (10% de DMSO – Dimetilsulfoxido e 90% de SBF - soro bovino fetal). Para a realização dos experimentos as células foram descongeladas e cultivadas em monocamada, em

frascos de 25 cm² com 5 mL de meio de cultura RPMI (Gibco 31800-022, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco 12657, USA) (SBF). Os frascos contendo as células descongeladas foram incubados em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C, até atingirem o estado de confluência (~ 5x10⁶ células), quando necessitam de subcultivo.

3.2.2.1. Subcultivo da HL-60

Transferiu-se todo o líquido da garrafa de cultura obtido no item 3.2.2, para um tubo cônico de 15 mL. Após essa etapa, o material foi centrifugado 900g por 5 min, e em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o pellet de células foi ressuspensionado em RPMI a 10% de SBF. Em seguida foi feita a contagem do número de células em câmara de *Neubauer* na presença do corante azul de Tripan, depois a suspensão celular foi distribuída em garrafas de 75 cm² de meio de cultura com 10 mL de meio RPMI a 10% de SBF, de modo que cada garrafa recebesse 1x10⁶ células. Novamente as garrafas foram incubadas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C, até atingirem o estado de confluência, quando necessitam de novo subcultivo. Os ensaios com a CR-LAAO foram executados com células entre o 3° e 6° subcultivo.

3.2.3. Manutenção da linhagem celular aderente (HepG2)

A linhagem HepG2 foi mantida congelada em nitrogênio líquido (-195°C) em alíquotas de 1x10⁶ células/mL em solução de congelamento (10% de DMSO e 90% de soro bovino fetal). Para a realização dos experimentos as células foram descongeladas e cultivadas em monocamada, em frascos de 25 cm² com 5 mL de meio de cultura DMEM (Gibco 31600-034, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF). Os frascos contendo as células descongeladas foram incubados em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C, até atingirem o estado de confluência (~ 5x10⁶ células), quando necessitam de subcultivo.

3.2.3.1. Subcultivo da HepG2

As linhagens aderentes necessitaram de um procedimento diferente da linhagem em suspensão e semi-aderente. Todo o conteúdo do frasco obtido no item 3.2.3. foi desprezado, permanecendo assim, somente as células aderidas ao fundo do frasco. O frasco foi lavado com aproximadamente 2 mL de tampão PBS

(*Phosphate Buffer Saline* – Na_2HPO_4 3,2 mM; KH_2PO_4 0,5 mM; KCl 1,3 mM; NaCl 135 mM) estéril pH 7,4 que posteriormente foi descartado. Em seguida, adicionou-se 2 mL de tripsina 0,25% (SAFC Bioscience 59429C, USA) à garrafa de cultura. O período de ação da tripsina é de aproximadamente 5 minutos e após este período, a mesma foi neutralizada com meio DMEM com SBF 10%, de modo que o volume de meio fosse o dobro do volume usado de tripsina. Realizada essa etapa, transferiu-se todo o conteúdo para um tubo falcon de 15 mL e centrifugou-se por 5 min a 900g. Desprezou-se todo o sobrenadante, sendo o *pellet* ressuspensionado em DMEM com SBF 10%. Em seguida, foi feita a contagem do número de células em câmara de *Neubauer* na presença do corante azul de Tripán, depois a suspensão celular foi distribuída em garrafas 75 cm² com 10 mL de meio de cultura DMEM com SBF 10%, de modo que cada garrafa recebesse 1×10^6 células. Novamente as garrafas foram incubadas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C, até atingirem o estado de confluência, quando necessitam de novo subcultivo. Os ensaios com a CR-LAAO foram executados com células entre o 3° e 6° subcultivo.

3.2.4. Viabilidade celular

Antes da realização de qualquer experimento foi realizado o teste de viabilidade das células a serem usadas, visando garantir a veracidade dos resultados. O teste foi realizado com o corante o azul de Tripán, que é incorporado por células com membranas fragilizadas, indicando que as células já possuem um estágio de morte avançado. O corante azul de Tripán foi utilizado na proporção de 1:1, pipetando-se 10 µL de corante para 10 µL de suspensão de células, mantidos em repouso por 15 minutos e posterior leitura no microscópio. As células viáveis não são coradas pelo azul de Tripán e aparecem incolores, ao passo que as células mortas apresentam coloração azul. O resultado foi expresso pela equação:

$$\% \text{ de células viáveis} = [(\text{células viáveis} / \text{total de células}) \times 100]$$

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas as culturas com viabilidade por azul de Tripán igual ou superior a 98%.

3.2.5. Extração de células mononucleares de sangue total (PBMC)

Foram coletados 10 mL de sangue periférico, em tubos heparinizados, de indivíduo saudável, sem uso de terapia farmacológica, que aceitou participar da pesquisa e assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O sangue foi transferido para um tubo de 50 mL onde foi acrescentado o mesmo volume (~10 mL) de PBS em temperatura ambiente. Após homogeneização cuidadosa, o sangue foi distribuído em 4 tubos, sendo colocados 5 mL dessa solução em cada tudo. A essa mistura, foram acrescentados 5 mL de Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, 10771), que é uma solução contendo polissacarose e diatrizoato de sódio, ajustado a uma densidade de 1,077 g/mL, facilitando a recuperação de um grande número de células mononucleares viáveis (linfócitos), que formam uma camada distinta entre as hemácias e o plasma. Após homogeneização, todo o material foi centrifugado a 756g por 20 min. Após a centrifugação, a fase contendo os linfócitos foi retirada com a ajuda de uma pipeta *Pasteur*. Estes foram reunidos em um tubo e centrifugados a 900g por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuscitado em 5 mL de PBS. Em seguida, o material foi centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente. Novamente, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuscitado com ~ 5 mL de meio RPMI (Gibco, 31800-022) suplementado com 10% de SBF (Gibco, 12657). A contagem do número de células em câmara de *Neubauer* foi feita na presença do corante *Turk*, seguido pelo plaqueamento das células e tratamento com PBS ou CR-LAAO. As placas foram levadas à estufa a 37°C com 5% de CO₂, até a análise.

3.2.6. Caracterização funcional

3.2.6.1. Ensaios de citotoxicidade (MTT)

Para o teste de citotoxicidade foram utilizadas placas de 96 poços, de modo que os 3 primeiros poços foram utilizados para a leitura do branco e portanto, não receberam células ou tratamento. O restante dos poços receberam 5x10⁴ células/poço, com um volume final de 100 µL. As células foram plaqueadas (PBMC, HL-60 ou HepG2) e incubadas por 24 horas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C. Depois desse período as células foram tratadas com 50 µL de PBS (controle negativo) ou diferentes concentrações de CR-LAAO (0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 ou 100 µg/mL) e novamente incubadas por 24 horas à 37°C com 5% de CO₂, até a análise. O controle positivo recebeu 50 µL de cisplatina (Incel -

Darrow®) nas concentrações, previamente determinadas pelo ensaio de MTT, como sendo a IC₅₀ para cada linhagem (IC₅₀ para PBMC - 14,6 µg/mL; para HepG2 - 4,0 µg/mL; para HL-60 - 2,9 µg/mL). Após 24 horas de tratamento, os poços receberam 20 µL de 3-(4,5-dimetil tiazol 2-il) 2,5- difenil brometo de tetrazolium (MTT) (Sigma M2128, USA) (com exceção dos poços utilizados como branco) e foram incubados por 3 horas à 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, as placas foram centrifugadas por 5 min a 900g e posteriormente invertida para o descarte do sobrenadante, seguida da adição de 100 µL de DMSO (Sigma D2650, USA) em cada poço, e mantidas sob agitação até a total dissolução dos cristais (aproximadamente 20 minutos). Em seguida, as placas foram levadas ao espectrofotômetro para a leitura da absorbância em 570 nm (MOSMANN,1983). Foram realizados 3 experimentos independentes, em triplicatas, para cada concentração.

Para avaliar o efeito da catalase sobre o H₂O₂ produzido pela CR-LAAO, as células tumorais e as células sanguíneas mononucleares foram tratadas com CR-LAAO juntamente com 150 U/mL de catalase (Catalase, from bovine liver C1345, USA).

Os dados obtidos foram transferidos para o software *GraphPad Prism 5*, onde os gráficos foram gerados, calculou-se a concentração requerida para atingir 50% do efeito inibitório máximo (IC₅₀) e realizou-se a análise estatística para interpretação dos dados.

3.2.6.2. Análise de apoptose/necrose por citometria de fluxo

Em placas de 24 poços, foram adicionadas 5x10⁵ células/poço com volume final de 950 µL. As linhagens celulares foram plaqueadas e tratadas com diferentes concentrações de CR-LAAO (0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 ou 100 µg/mL). O controle positivo recebeu 50 µL de cisplatina (Incel - Darrow®) e o controle negativo 50 µL de PBS. Após 24 horas de tratamento, as células foram recolhidas dos poços, transferidas para tubos de citometria, e centrifugadas por 5 min a 900g, sendo o sobrenadante desprezado, o *pellet* ressuspensionado e adicionado 1 mL de PBS. Em seguida, as células foram centrifugadas novamente nas mesmas condições, o sobrenadante foi desprezado, o *pellet* ressuspensionado e adicionados 300 µL de tampão 1X de *Anexina V*. Foram adicionados 5 µL de *Anexina V FITC* em cada tubo. As amostras foram incubadas por 15 minutos em banho de gelo e logo após a incubação, foi adicionado 1 µL de iodeto de propídeo (PI) e imediatamente realizou-

se a leitura. Foram analisados 10.000 eventos no equipamento FACSCanto (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Foram realizados 3 experimentos independentes com triplicatas para cada concentração (KOMMOJU et al., 2007).

Nesse experimento, também, foi avaliado o efeito da catalase sobre o H_2O_2 produzido pela CR-LAAO. Assim sendo, as células tumorais e as células sanguíneas foram tratadas com CR-LAAO juntamente com 150 U/mL de catalase.

Os dados obtidos foram transferidos para o software *GraphPad Prism 5*, onde os gráficos foram gerados e realizou-se a análise estatística para interpretação dos dados.

3.2.6.3. Análise da expressão gênica

A expressão gênica foi avaliada por meio da quantificação do mRNA dos genes com a técnica de *Reverse Transcription – Quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR). Estes ensaios foram realizados em colaboração com as Profas. Dra. Maria de Lourdes P. Bianchi e Dra. Lusânia M. Gregg Antunes, no laboratório de Nutrigenômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo, USP.

3.2.6.3.1. Extração de RNA

Inicialmente as linhagens celulares HL-60 (5×10^6 células) e HepG2 (3×10^6 células) foram subcultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² por 24 horas. Depois elas foram tratadas com CR-LAAO em diferentes concentrações (0,1; 1,0; 1,7 ou 10,78 µg/mL). Aos controles foram adicionados PBS. Após 24 horas de tratamento foi feita a colheita das células, que foram processadas de acordo com as orientações do kit de extração de RNA (*SV Total RNA Isolation System* – Promega Z3100). Foram feitas 2 extrações (experimentos) independentes em triplicatas (n=6).

3.2.6.3.2. Quantificação de RNA

Para a verificação do rendimento, realizou-se a quantificação do RNA total obtido em espectrofotômetro (NanoDrop *spectrophotometer* ND-1000). As amostras de RNA puras exibem razões A_{260}/A_{280} de 2,0. A variação aceitável para este parâmetro é de 1,7 a 2,1. Quanto à razão A_{260}/A_{230} , seu valor deve ser maior que 2,0. O intervalo de variação aceitável é entre 1,8 a 2,5. O ideal é que as concentrações do RNA a serem trabalhadas sejam superiores a 100 ng/uL.

3.2.6.3.3. Avaliação da integridade do RNA

A integridade do RNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. A agarose foi fundida em 50 mL de tampão TAE (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM pH 8,0) e à mistura foram adicionados 5 µL de corante GelRed (Uniscience, São Paulo, SP, Brasil). Cada amostra aplicada no gel foi preparada com 1 µg de RNA e 20% (v/v) de tampão de aplicação 6X (30% de glicerol, 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xileno cianol). Os géis contendo as amostras foram submetidos à eletroforese no mesmo tampão TAE por 90 minutos a 80V e em seguida foram visualizados e fotografados em foto-documentador UV (Molecular Imager® Gel Doc™ XR, Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos).

3.2.6.3.4. Síntese de cDNA e PCR em tempo real

Após a avaliação da integridade do RNA, as amostras foram tratadas com DNase-I (*Deoxyribonuclease I, Amplification Grade* – Invitrogen Life Technologies C18068-15) de acordo com as orientações do fabricante, a fim de remover qualquer resíduo de DNA genômico que possa ter ficado durante o processo de extração. Em seguida, uma nova quantificação foi feita e iniciou-se o processo de síntese de cDNA, onde 1 µg de RNA foi processado de acordo com as instruções contidas na bula do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems C 4368814), contendo *random primers*, transcriptase reversa e deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP).

Os cDNAs obtidos das amostras foram utilizados nos ensaios de PCR em tempo real para a quantificação do RNAm dos genes de interesse no equipamento StepOnePlus™ (*Applied Biosystems*). Para tanto, sondas específicas para PCR em tempo real TaqMan® foram adquiridas para a amplificação dos genes *Fas*, *Bax* e *Bcl2*. O gene β -actina (ACTB) foi utilizado como gene de referência.

A expressão gênica relativa foi calculada de acordo com o método proposto por Pfaffl (2001) que utiliza a eficiência de amplificação de cada gene. De acordo com esta metodologia, a eficiência do PCR deve ser verificada em cada tecido estudado, ou, neste caso, em cada linhagem celular de interesse, pois inibidores da reação podem comprometer a eficiência de amplificação e, assim, não descrever de forma exata a expressão relativa do gene. Com isso, foram verificadas as eficiências de amplificação por meio de uma curva de diluições com diferentes concentrações

de cDNA, provenientes de um *pool* de todas as amostras estudadas, para cada linhagem celular. As curvas de diluições foram construídas com cinco pontos (concentrações) com diluição seriada 2:1 a partir de 40 ng/μL de cDNA. A tabela 1 apresenta os resultados das eficiências de cada gene para cada linhagem celular. Os valores de eficiência foram, então, utilizados para a quantificação da expressão relativa, conforme proposto por Pfaffl (2001), de acordo com a equação abaixo:

$$Razão = \frac{(E_{gene\ alvo})^{\Delta Ct_{gene\ alvo} (Ct_{amostra\ controle} - Ct_{amostra\ tratada})}}{(E_{gene\ referência})^{\Delta Ct_{gene\ referência} (Ct_{amostra\ controle} - Ct_{amostra\ tratada})}}$$

Onde:

E: Eficiência da reação

Ct: (*Threshold Cycle*) – ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção do equipamento, servindo como base para a comparação entre amostras.

As expressões relativas foram avaliadas comparando os níveis de expressão entre os grupos tratados com os seus respectivos controles negativos. As reações foram realizadas utilizando o termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, Estados Unidos), kit *TaqMan® Universal Master Mix II* (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e placas de 96 poços (Life Technologies), e seguiram as seguintes condições: volume final de 20 μL/poço, sendo 10 μL de *TaqMan® Universal Master Mix II*, 9,5 μL de amostra diluída de cDNA (2,5 ng/μL) e 0,5 μL do ensaio *TaqMan®* do gene de interesse. As etapas de amplificação incluíram um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos, seguido por um ciclo a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos constituídos de: desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Todas as reações foram realizadas com 3 replicatas técnicas.

A expressão do gene alvo foi comparada entre amostras controle (controle negativo) e culturas tratadas com CR-LAAO, usando o gene de referência *β-actina* como controle de normalização.

3.2.6.4. Detecção da expressão proteica por *Western-blot*

A detecção da ativação das caspases 3, 8 e 9; e expressão proteica de BAX e BCL2 por *western-blot* foi realizada com o intuito de confirmar a indução de apoptose das células HL-60 e HepG2 pela CR-LAAO e determinar se a ativação da morte foi desencadeada pela via extrínseca ou intrínseca da apoptose.

Assim sendo, 1×10^6 células HL-60 ou HepG2 foram cultivadas em placas de 24 poços, com as diferentes concentrações de LAAO (0,1; 1,0; 1,6 ou 10,78 $\mu\text{g/mL}$) ou PBS (controle negativo) por 24h. Após esse período as células foram coletadas e ressuspensas em 200 μL de tampão de lise para *western-blot* (mercaptoetanol 5%, SDS 4%, glicerol 20% e Tris-HCl 100 mM, pH 6), contendo inibidores de fosfatase e protease. Para a verificação do rendimento, realizou-se a quantificação proteica total obtida em espectrofotômetro (NanoDrop *spectrophotometer* ND-1000).

Quantidades iguais de proteínas (25 μg) foram submetidas à corrida eletroforética, em gel de SDS-PAGE 15%, por 2h e 30min, sendo 30 min a 80 V e 2h a 100V. Após a corrida, o lisado proteico separado por SDS-PAGE foi transferido para uma membrana de PVDF em sistema de eletroforese (eletrotransferência), por 1h e 30min, a 0,25A, com voltagem entre 80 a 120V para detecção das caspases e das proteínas BAX e BCL2. Após a corrida de transferência, a membrana de PVDF foi lavada 3X com TBS-T (Tris 20 mM, pH 6, NaCl 137 mM e Tween a 0,1%) e foi bloqueada em tampão de lavagem (TBS-T) com leite desnatado a 5% por 2 horas, mantidas em agitação à temperatura ambiente e subsequentemente incubadas *overnight* com os anticorpos primários específicos desejados. Os anticorpos primários utilizados foram: anticorpo monoclonal de coelho antiBCL2 na diluição 1:1000 (código 2870, Cell Signaling, USA); anticorpo policlonal de coelho antiBAX na diluição 1:1000 (código 2772, Cell Signaling, USA); anticorpo monoclonal de camundongo anti-caspase 8 humano na diluição de 1:1000 (código 551243; BD Pharmingen®, USA); anticorpo policlonal de coelho anti-caspase 3 humano na diluição 1:500 (código 235412, Calbiochem®, Germany); anticorpo monoclonal de camundongo anti-caspase 9 humano na diluição 1:250 (código 63103; SIGMA, EUA); anticorpo policlonal de coelho antitubulina 1:5000, (código T3320; SIGMA, EUA) empregados para marcar a proteína endógena das amostras investigadas. Esses anticorpos foram diluídos, nas concentrações indicadas em solução de bloqueio contendo azida a 0,01% por período que variou de 16h à 72h, em temperatura ambiente. Após três lavagens de 10 minutos da membrana com tampão

TBS-T, essa foi incubada com os anticorpos secundários por uma hora a temperatura ambiente. Após três lavagens de 10 minutos da membrana com tampão TBS-T, essa foi incubada com os anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho conjugados à peroxidase na diluição de 1:2000 (Amersham Biosciences®, GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, Pensilvânia, EUA) por uma hora a temperatura ambiente. Após três lavagens de 10 minutos da membrana com tampão TBS-T, a membrana foi lavada com 1mL de ECL por 1 min. A detecção da marcação foi realizada pelo método de quimioluminescência (Amersham ECL Plus®, GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, Pensilvânia, EUA) (BURIN, et al., 2013).

3.2.6.5. Análise do ciclo celular

Para os ensaios de ciclo celular foram utilizadas 1×10^6 células em placas de 24 poços, com volume final de 950 μ L. As linhagens celulares foram plaqueadas e tratadas com 50 μ L de diferentes concentrações de CR-LAAO (0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 ou 100 μ g/mL). O controle positivo recebeu 50 μ L de cisplatina (Incel - Darrow®) e o controle negativo 50 μ L de PBS. Após 24 horas do tratamento, as células foram recolhidas dos poços, transferidas para tubos de citometria e centrifugadas a 900g por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de PBS gelado. Em seguida, as células foram centrifugadas novamente, o sobrenadante foi desprezado, o *pellet* ressuspensionado em 100 μ L de PBS gelado e adicionados 2 mL de etanol 70% gelado e as amostras foram armazenadas a -20°C por 24 horas. Ao término desse período, as células foram retiradas da temperatura de -20°C, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante desprezado e o *pellet* foi ressuspensionado com 300 μ L de PBS gelado + 10 μ L de RNase (10 mg/mL) e incubado por 30 minutos a 37°C. Logo após a incubação, as amostras foram colocadas em banho de gelo com 164 μ L de HFS (*Hypotonic Fluorescence Solution*: reagente que mensura a quantidade de DNA da célula e define em que posição do ciclo celular a célula se encontra) e incubadas em gelo por 1 hora. Foram analisados 10.000 eventos no equipamento FACSCanto (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Foram realizados 3 experimentos independentes, com triplicatas para cada concentração (ALVES-PAIVA et al., 2011).

Os arquivos gerados pelo FACSCanto foram lidos no software *FlowJo 7.6.1* para a análise das fases da divisão celular: G0/G1, S e G2/M. As porcentagens das

fases do ciclo foram transferidas para o GraphPad Prism 5, transformadas em gráficos e a análise estatística foi realizada para interpretação dos resultados.

3.2.6.6. Atividade bactericida

As bactérias utilizadas no presente estudo *S. aureus* e *E. coli*, foram separadamente diluídas em tubos a partir de 1 mL de uma suspensão de bactérias na escala de 0,5 McFarland, correspondendo a 4×10^6 Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)/mL, como previamente descrito (PÁRAMO et al., 1998). Cerca de 100 μ L, contendo 4×10^4 UFC, foram incubados em intervalos de tempos diferentes (0,5; 1 e 24 horas) a 37°C em diferentes concentrações de CR-LAAO dissolvidas em PBS pH 7,4 contendo peptona 1%. A enzima CR-LAAO foi avaliada nas concentrações de 24 μ g/mL e 48 μ g/mL, sendo os testes realizados em triplicatas. Após o período de incubação, 10 μ L da solução contendo o inóculo de bactéria juntamente com a enzima foram retirados e diluídos em PBS (1:100), e dessa diluição foram retirados 100 μ L e estriados em placas contendo o meio ágar *Müller-Hinton*. As placas foram incubadas por 24h à 37°C, e após esse período foi feita a contagem das colônias. Foram utilizados controles do crescimento bacteriano, do meio e das amostras para garantir a não interferência de possíveis microorganismos contaminantes.

Os dados obtidos foram transferidos para o software *GraphPad Prism 5*, onde os gráficos foram gerados e realizou-se a análise estatística para interpretação dos dados. Estes experimentos foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Rosemeire C. L. R. Pietro, no laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP.

3.2.6.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio do método de diluição em microplaca e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando diluição em microplaca (96 poços), segundo a Norma M7-A6 do *National Committee For Clinical Laboratory Standards*, atualmente denominado *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), porém com as modificações descritas abaixo (NCCLS, 2003b).

Em todos os poços foram colocados 50 μ L de meio *Müller Hinton* (MH). A CR-LAAO foi solubilizada em PBS, obtendo-se soluções teste de 50 μ g/mL (utilizada

em testes com *S. aureus*) e 500 µg/mL (utilizada em testes com *E. coli*). No 1° poço da 1ª linha foram colocados 50 µL da solução de CR-LAAO. Nos primeiros poços das 2ª e 3ª linhas foram colocados 50 µL de uma solução contendo 500 µg/mL de Ampicilina e 50 µL de uma solução de 200 µg/mL de Tetraciclina, respectivamente (Figura 4). Foram realizadas diluições seriadas, transferindo-se 50 µL do poço anterior para o poço subsequente.

Os poços da 4ª linha foram utilizados para a realização dos controles em triplicata: negativo de esterilidade do meio (MH); negativo de esterilidade do PBS; negativo de esterilidade da CR-LAAO e positivo do crescimento bacteriano. A todos os poços, exceto os de controle de esterilidade negativo, foram adicionados 50 µL da suspensão bacteriana diluída 1:100 em MH, sendo que a concentração final foi de 5×10^4 UFC/mL. As microplacas foram incubadas por 6 e 24 h a 37 °C. A inibição do crescimento bacteriano foi evidenciada pela adição de 20 µL de uma solução aquosa de resazurina a 0,01% após incubação a 37 °C por 1 h, e foi determinada como CIM a menor concentração que inibiu o crescimento bacteriano. Os testes foram realizados em triplicata.

Antes da adição da resazurina, pequenas alíquotas de cada poço foram retiradas para a realização de subcultura de cada microplaca. Essas alíquotas foram colocadas com ajuda de ponteiras em placas de ágar *Müller Hinton*, para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM). As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. A CBM foi então observada pela ausência ou presença de crescimento bacteriano. Estes experimentos foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Rosemeire C. L. R. Pietro, no laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP.

FIGURA 4. Esquema da montagem de microplaca para teste antimicrobiano (CIM).

3.2.6.8. Microscopia eletrônica de transmissão

Para a avaliação da microscopia eletrônica de alterações morfológicas, cepas bacterianas de *S. aureus* e *E. coli* padrão foram ajustadas para 1×10^8 UFC/mL e incubadas com 48 µg/mL de CR-LAAO a 37 °C por 24 horas em placas de 6 poços. As amostras foram fixadas com glutaraldeído a 4% em tampão A (Cacodilato 0,1 M) durante 1h a 4 °C e depois foram incorporadas em agarose gelificante a 3% (Sea Plaque, FMC Corp) e armazenadas durante 12 h em fixador a 4 °C. Blocos de agarose foram cortados em pedaços de 3 mm³, imersos em fixador durante 2 horas a 25 °C, lavados três vezes durante 10 min com o tampão A, e fixados com 1% de tetróxido de ósmio (Agar Scientific Ltd) em tampão A, durante 2 h a 25 °C. Os cortes foram lavados três vezes, desidratados em concentrações crescentes de etanol e óxido de propileno e mergulhado em resina Spurr (Agar Scientific). A polimerização foi realizada a 60 °C durante 48 h, e cortes ultrafinos foram preparados com um *Ultramicrotomo Sorvall MT2*. As secções foram colocadas em redes de malha 5%, revestida de colódio, e coradas com solução de acetato de uranilo 4% (Agar Scientific) durante 15 minutos, seguido por uma solução de citrato de chumbo 2,6% (Agar Scientific) durante 15 min. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão Hitachi 1100 (Hitachi Scientific Instruments) funcionando a

100 kV (PALAZZO et al., 2005). Estes experimentos foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP no Laboratório especial de bacteriologia e epidemiologia molecular, e as análises microscópicas foram realizadas no Laboratório de microscopia eletrônica do Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Após a obtenção das imagens em 80.000X de magnificação, foi feita a medição da espessura das paredes das células intactas no programa *ImageJ*. Os valores obtidos em nanômetros (nm) foram utilizados para o cálculo da média $\pm$ SD no software *Graph Pad Prism 5*.

3.2.6.9. Atividade fungicida

Para a determinação da atividade antifúngica da CR-LAAO, os testes foram realizados baseando-se na Norma M27-A2 do *National Committee For Clinical Laboratory Standards*, atualmente denominado *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), porém com as modificações descritas abaixo (NCCLS, 2002).

A levedura (*C. albicans*) foi semeada em placa de petri contendo ágar Sabouraud e incubada a 35°C por 24 h. Cinco colônias isoladas e bem definidas foram coletadas e diluídas em tubo contendo PBS. Em um tubo com 5 mL de PBS foi feito o ajuste da concentração da levedura na escala de 0,5 *McFarland*, correspondendo de 1×10^6 a 5×10^6 Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)/mL. Preparou-se então uma solução de trabalho contendo 5×10^4 UFC/mL. Diferentes concentrações de CR-LAAO dissolvidas em PBS, foram incubadas com 100 μ L contendo $2,5 \times 10^3$ UFC/mL da levedura nos tempos de 6 e 24 horas a 35°C. A enzima CR-LAAO foi avaliada na concentração de 25, 50 ou 100 μ g/mL, sendo os testes realizados em triplicatas. Das amostras previamente incubadas, foram recolhidos 20 μ L e feita uma diluição 1:10 em PBS, 100 μ L dessa diluição foram estriados em placa contendo o ágar *Sabouraud*. Para a contagem do número de colônias de *C. albicans*, as placas foram incubadas à 35°C por 48 h. Foram utilizados controles do crescimento da levedura, do meio e das amostras para garantir a não interferência de possíveis microorganismos contaminantes. Estes experimentos foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Rosemeire C. L.

R. Pietro, no laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP.

3.2.6.10. Detecção da atividade leishmanicida

Formas promastigotas das espécies *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi* foram cultivadas em meio M199 (Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina e mantida a 22 °C. Parasitas (1×10^7 parasita/mL) na fase estacionária foram depositados em microplacas de 96 poços e incubados (25°C, 24 h, sem CO₂) com diferentes concentrações de CR-LAAO (0,5; 2; 8 ou 32 µg/mL). Os controles foram realizados com PBS, meio M199 e um controle positivo de crescimento do parasita. Após 24 h, foi feita a detecção da viabilidade do parasita, determinada pela técnica de MTT (oxidação colorimétrica) como descrito por Muelas-Serrano et al. (2000). Os testes foram realizados em triplicata para cada concentração de LAAO e controles. Os resultados foram expressos como porcentagem de lise celular (% CL) e o IC₅₀, a média e desvio padrão foram calculados pelo software *GraphPad Prism 5.0*.

$$\% \text{ CL} = [(A_c - A_a) / A_c] \times 100$$

A_c= média dos valores de absorbância para o controle negativo (PBS)

A_a= valores individuais de absorbância (0,5; 2; 8 e 32 µg/mL de CR-LAAO).

Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

3.2.6.11. Detecção da atividade tripanomicida

Formas tripomastigotas da cepa *Trypanosoma cruzi* foram obtidas do sobrenadante de cultivo celular do parasito. O sobrenadante obtido destes cultivos, contendo as formas tripomastigotas juntamente com algumas células, foi submetido à centrifugação (115g por 8min, a 10°C) onde o sedimento, contendo principalmente células, foi desprezado e o sobrenadante novamente centrifugado (1.620g por 30min a 10°C). A seguir, o sedimento foi ressuspendido em meio RPMI 1640 (Gibco 31800-022, USA) suplementado e as formas tripomastigotas purificadas foram submetidas

à contagem em hemocitômetro de *Neubauer*, para ajustar as quantidades de parasitas a serem utilizadas nos procedimentos experimentais.

Os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Vega et al. (2005), onde as formas do parasita foram deixadas em contato com diferentes concentrações de CR-LAAO (0,5; 2; 8 ou 32 μ M), em microplaca de 96 poços, a 37°C, durante 24 horas. Após este período 50 μ L da solução de CPRG (chlorophenol red β -D-galactopyranoside, 400 μ M em Triton X-100 a 0,3% pH 7,4) foram adicionados e a microplaca incubada a 37° C por 6h. A absorbância foi obtida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem de atividade (%AE) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%AE = [(AE-AEB)/(AC-ACB)] \times 100$$

AE = absorbância dos poços tratados;

AEB= absorbância dos poços contendo meio e toxina;

AC=absorbância dos poços contendo controle negativo (PBS);

ACB= absorbância dos poços contendo meio de cultura.

Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

3.2.6.12. Avaliação do influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal

Grupos de 4 camundongos Balb/c machos foram injetados via intraperitoneal com 300 μ L de solução de CR-LAAO em diferentes concentrações (1,0; 5,0; 10; 25 e 50 ou 100 μ g/mL) diluídas em PBS estéril. O grupo controle recebeu 300 μ L de PBS estéril. Após 4; 24; 48 e 96 horas, os animais foram submetidos à eutanásia pela instilação de CO₂. Para a análise das células inflamatórias, a cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de PBS gelado. O líquido peritoneal foi coletado com auxílio de seringa e agulha estéril e transferido para tubos plásticos de 15 mL, que foram centrifugados a 200 g por 10 min e em seguida mantidos em banho de gelo. O sobrenadante foi estocado a – 20°C para a dosagem de citocinas, NO, proteínas e mediadores lipídicos e o *pellet* ressuspendido em 500 μ L de PBS estéril gelado para

a contagem de células totais e diferenciais. As células peritoneais totais (leucócitos) diluídas em solução de *Turk* (1/20) foram contadas em Câmara de *Neubauer*. A contagem diferencial dos leucócitos em neutrófilos e células mononucleares foi feita com amostras de células do lavado peritoneal (100 μ L), que foram concentradas em lâminas de microscópio utilizando citocentrífuga (*Cytospin 3*, Shandon Souther Products Ltd., UK), coradas com corante de *Romanowsky* e analisadas em microscópio óptico (Bioval), magnificação 400X. Foram contadas 100 células por lâmina e os resultados foram expressos pelo número de células de cada tipo observado (MENALDO et al., 2013; ZOCCAL et al., 2013). Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Profa. Dra Lúcia Helena Faccioli, no laboratório de Imunologia e Inflamação das Parasitoses, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

3.2.6.13. Dosagem indireta de óxido nítrico (NO) pela reação de Griess

O óxido nítrico (NO) produzido pelas células se decompõe em nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-) que ficam presentes no sobrenadante do lavado peritoneal. A dosagem de NO_2^- é feita pelo método de ensaio colorimétrico baseado na reação de Griess (GREEN et al., 1981). Cem microlitros dos sobrenadantes do lavado peritoneal de camundongos tratados com CR-LAAO (obtidos conforme descrito no item 3.2.6.13), foram incubados com o mesmo volume do reagente de Griess (mistura de 1:1 de uma solução de NEED 0,1% em água destilada com uma solução de sulfanilamida 1% em H_3PO_4 5%) em placas de 96 poços, a temperatura ambiente até a realização da leitura da densidade óptica, feita em 540 nm. A concentração de NO_2^- é determinada usando um curva de 1 a 200 μM de NaNO_2 . Os dados foram apresentados como $\mu\text{M/mL}$ de NO_2^- .

3.2.6.14. Quantificação de proteínas

O extravasamento de proteínas foi avaliado nos sobrenadantes dos lavados peritoneais livre de células (obtidos conforme descrito no item 3.2.6.13), de camundongos tratados com CR-LAAO, pelo método de Bradford, empregando “kit” comercial (Pierce, Rockford, USA), conforme especificações do fabricante. A dosagem foi realizada em placas de 96 poços, onde 5 μL de cada amostra foram incubados com 250 μL do reagente de Comassie por 10 min em temperatura ambiente até a realização da leitura da densidade óptica, feita em 595 nm. A

concentração de proteínas foi calculada a partir da curva padrão de 1 a 1500 µg/mL de albumina bovina. Os resultados foram expressos em ng/mL de proteína (ZOCCAL et al., 2013).

3.2.6.15. Quantificação de citocinas por ELISA

As citocinas (IL-6, IL-4, IL-1β, TNF-α e IL-10) foram quantificadas nos sobrenadantes dos lavados peritoneais livre de células através do ensaio imunoenzimático ELISA. Foram utilizados anticorpos específicos (purificados e biotinilados) e proteínas recombinantes, de acordo com instruções do fabricante (R&D Systems, MN, e PharMingen, San Diego, CA). A leitura da densidade óptica foi feita em 490 nm e a concentração de citocinas calculada a partir da curva padrão. Os resultados foram expressos em pg/mL de proteína (ZOCCAL et al., 2013).

3.2.6.16. Determinação da concentração de mediadores lipídicos

Os mediadores lipídicos Leucotrieno B₄ (LTB₄) e Prostaglandina E₂ (PGE₂) foram quantificados nos fluidos peritoneais livre de células (sobrenadante) dos camundongos Balb/c injetados com CR-LAAO, pelo ensaio Imunoenzimático Competitivo de acordo com as instruções do fabricante (EIA, Cayman, USA). Cinquenta microlitros de cada amostra foram colocados em placas previamente sensibilizadas com os anticorpos específicos para LTB₄ e PGE₂ e incubadas a 4°C *overnight*. Após período de incubação as absorbâncias foram determinadas em leitor de placa em 405/420 nm (µQuant, biotek Instruments Inc.). As concentrações dos mediadores foram calculadas a partir da curva padrão. O limite de detecção foi > 13 pg/mL.

3.2.7. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo método ANOVA “one-way” e pós-teste de *Tukey* com $p < 0,05$; onde todos os tratamentos foram comparados ao controle negativo, controle positivo e entre os tratamentos, por meio do *software Graph Pad Prism 5*.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da citotoxicidade

4.1.1. Determinação da IC₅₀ da cisplatina

A fim de utilizar a cisplatina (Darrow®) como controle positivo nos testes de citotoxicidade, inicialmente foi determinado sua IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento celular) para as linhagens tumorais HepG2 e HL-60, e também para PBMC, através do ensaio de citotoxicidade com MTT (Figura 5).

As células foram tratadas com diferentes concentrações de cisplatina (2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 160 e 320 µg/mL) e com o auxílio do *software Graph Pad Prism 5* foram calculadas as IC₅₀ relativas. A IC₅₀ da cisplatina determinada para PBMC foi de 14,6 µg/mL (intervalo de confiança de 95%: 8,6 µg/mL a 24,6 µg/mL), para HepG2 foi de 4,0 µg/mL (intervalo de confiança de 95%: 2,8 µg/mL a 5,8 µg/mL) e para HL-60 foi de 2,9 µg/mL (intervalo de confiança de 95%: 2,3 µg/mL a 3,8 µg/mL).

4.1.2. Avaliação do potencial citotóxico da CR-LAAO

A atividade antitumoral foi avaliada por meio do tratamento das diferentes linhagens celulares com a CR-LAAO em diferentes concentrações (0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 e 100 µg/mL). As culturas de HepG2, HL-60 e PBMC tratadas com PBS foram utilizadas como controle negativo e, como controle positivo, foram utilizadas culturas tratadas com as respectivas IC₅₀ de cisplatina (Darrow®).

Para PBMC, observou-se que nas menores concentrações testadas (0,1 – 2,5 µg/mL) a viabilidade celular variou entre 80 a 90%, enquanto que nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL a viabilidade celular foi de aproximadamente 50% (Figura 6 A). A IC₅₀ relativa de CR-LAAO determinada para PBMC com o auxílio do *software Graph Pad Prism 5* foi de 2,43 µg/mL (intervalo de confiança de 95%: 0,20 µg/mL a 30,17 µg/mL). Para a linhagem HepG2, nas menores concentrações (0,1 – 5,0 µg/mL) a viabilidade foi de aproximadamente 70%; nas concentrações 10 e 25 µg/mL, a viabilidade celular foi de 40% e 26% respectivamente, enquanto que nas maiores concentrações (50 e 100 µg/mL), a viabilidade celular foi de aproximadamente 17% (Figura 6 B). A IC₅₀ relativa determinada para as células de hepatocarcinoma foi de 10,78 µg/mL (intervalo de confiança de 95%: 6,90 µg/mL a 16,81 µg/mL). Para a linhagem HL-60 a viabilidade ficou em torno de 90% nas menores concentrações (0,1 - 1 µg/mL), 50% na concentração de 2,5 µg/mL; e cerca de 25% nas concentrações de 5 a 100 µg/mL (Figura 6 C), sendo a IC₅₀ relativa

determinada em 1,7 $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confiança de 95%: 0,62 $\mu\text{g/mL}$ a 4,70 $\mu\text{g/mL}$).

FIGURA 5. Viabilidade celular avaliada por MTT, de PBMC (A), HL-60 (B) e HepG2 (C) após tratamento com cisplatina. Avaliação da citotoxicidade da cisplatina em diferentes concentrações (2,5 – 320 $\mu\text{g/mL}$) após 24 horas de tratamento. Resultados expressos pela média $\pm$ SD para três experimentos independentes ($n = 3$). As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram marcadas com * (valores estatisticamente diferentes do controle negativo - PBS), utilizando o teste one-way ANOVA.

FIGURA 6. Viabilidade celular avaliada por MTT, de PBMC (A), HL-60 (B) e HepG2 (C) após tratamento com CR-LAAO. Avaliação da citotoxicidade da CR-LAAO em diferentes concentrações (0,1–100 µg/mL) após 24 horas de tratamento. Resultados expressos pela média $\pm$ SD para três experimentos independentes ($n = 3$). As diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) foram marcadas com * (valores estatisticamente diferentes do PBS), utilizando o teste one-way ANOVA. PBS (controle negativo); Cisp (cisplatina, controle positivo). A cisplatina foi utilizada na concentração que inibe 50% do crescimento celular (IC_{50}) determinada para cada linhagem celular. IC_{50} para PBMC - 14,6 µg/mL; para HepG2 - 4,0 µg/mL; para HL-60 - 2,9 µg/mL.

Para avaliar o envolvimento do peróxido de hidrogênio produzido pela CR-LAAO na citotoxicidade promovida pela enzima, as células foram tratadas com 25 µg/mL de proteína juntamente com a catalase (150 U/mL). Foi observada uma mudança no perfil de citotoxicidade da enzima. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e as células HepG2 tiveram o efeito citotóxico da CR-LAAO quase totalmente revertido, com viabilidade celular variando entre 90 a 100% (Figura 7 A e B). Já as células leucêmicas HL-60 não responderam de forma semelhante às demais células testadas. Nessa linhagem a viabilidade celular foi de ~ 60% após o tratamento com CR-LAAO + catalase (Figura 7 C). Para todas as linhagens foi feito um controle de citotoxicidade com 150 U/mL de catalase e em todos os testes observou-se que a catalase é pouco tóxica para as células, apresentando viabilidade de ~ 90% para PBMC e HL-60, e 83% para HepG2.

FIGURA 7. Viabilidade celular avaliada por MTT de PBMC (A), HepG2 (B) e HL-60 (C) após tratamento com CR-LAAO e catalase. Avaliação da citotoxicidade da CR-LAAO (25 µg/mL) na ausência ou presença de catalase (150 U/mL) após 24 horas de tratamento. Resultados expressos pela média $\pm$ SD para três experimentos independentes ($n = 3$). As diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) foram marcadas com * (valores estatisticamente diferentes do PBS), utilizando o teste one-way ANOVA. PBS (controle negativo); Controle catalase - 150 U/mL.

4.2. Análise do potencial apoptótico/necrótico da CR-LAAO

A avaliação dos efeitos apoptótico e necrótico foi realizada em citometria de fluxo, usando um kit contendo anexina V FITC e PI (iodeto de propídeo). A população de células em necrose é marcada com PI (PI+), em apoptose marcada com anexina FITC V (AV+) e população com células necróticas e apoptóticas é marcada como PI+/AV+.

Nas células mononucleares sanguíneas humanas (PBMC), o efeito tóxico da CR-LAAO induziu apoptose em todas as concentrações testadas (0,1 – 100 µg/mL), sendo que 59,55% na concentração 0,1 µg/mL; ~ 70% nas concentrações de 0,25 a 2,5 µg/mL e cerca de 65% de 5 a 100 µg/mL. Nas células tratadas com cisplatina, 36,45% das células estavam em processo de apoptose. Nas concentrações de 0,1; 0,25; 25 e 100 µg/mL houve um percentual mínimo de células que se encontravam apenas em necrose (1,35; 1,15; 2,8 e 0,8%, respectivamente). Na concentração 0,1 µg/mL, 16% das células se encontravam em PI+/AV+, de 0,25 a 1 µg/mL cerca de 20%, e nas concentrações de 2,5 a 100 µg/mL, cerca de 30% das células. A cisplatina também induziu uma pequena toxicidade (13,7%) por necrose/apoptose (PI+/AV+) (Figura 8 A).

O tratamento de HepG2 com as menores concentrações (0,1 – 5 µg/mL) de CR-LAAO demonstrou toxicidade induzida por apoptose. Na concentração de 10 µg/mL, não houve diferença significativa entre a toxicidade induzida por apoptose (36%) e por apoptose/necrose (PI+/AV+) (36,85%). Já nas maiores concentrações (25, 50 e 100 µg/mL) observou-se que a toxicidade foi induzida por PI+/AV+, nas respectivas porcentagens: 48%; 41,75% e 40,45%. No controle negativo e nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, houve um percentual mínimo de células que se encontravam apenas em necrose (1,2; 0,55; 0,9%) (Figura 8 B).

As concentrações de 0,1 e 0,25 µg/mL de CR-LAAO induziram baixa toxicidade nas células HL-60 (viabilidade celular de 70%), quando comparadas ao controle de cisplatina (viabilidade celular de 20%). Também não houve diferença significativa entre a toxicidade induzida por apoptose (13,2 e 16,6%) e por apoptose/necrose (14,5 e 16,6%) nessas concentrações. Nas concentrações de 0,5 a 100 µg/mL, a toxicidade se deu por apoptose/necrose (PI+/AV+) nas seguintes porcentagens: 77,4%; 77,8%; 72,6%; 74,9%; 78,5%; 83,1%; 82,5% e 86,3%, respectivamente. No controle de cisplatina e nas concentrações de 5 a 100 µg/mL

houve um percentual mínimo de células que se encontravam apenas em necrose (0,6; 0,95; 1,2; 0,55; 0,65 e 0,2%, respectivamente) (Figura 8 C).

FIGURA 8. Avaliação do potencial apoptótico/necrótico de CR-LAAO em PBMC (A), HepG2 (B) e HL-60 (C) por citometria de fluxo. Tratamento com CR-LAAO em diferentes concentrações (0,1 – 100 µg/mL). A cisplatina (IC₅₀) foi utilizada como referência para indução de apoptose (Cisp) e as células sem nenhum tratamento como controle negativo (PBS). A população de células em necrose foi marcada com PI (PI+), em apoptose foi marcada com anexina FITC V (AV+) e população com células necróticas e apoptóticas foi marcada como PI+/AV+. Resultados expressos pela média ± SD para três experimentos independentes (n = 3). As diferenças estatisticamente significantes (p<0,05) foram marcadas com * (valores de PI+/AV+ em relação ao PBS); # (valores de apoptose em relação ao PBS), utilizando o teste one-way ANOVA.

Os efeitos apoptótico e necrótico de 25 µg/mL da CR-LAAO também foram analisados na presença de catalase. Observamos que as células sanguíneas mononucleares (PBMC), quando tratadas com CR-LAAO e catalase, mantiveram o mesmo perfil das células tratadas sem catalase, ou seja, com a maioria das células em apoptose. Entretanto, ficou claro que houve um aumento significativo na viabilidade celular, com apenas 38% (30% em apoptose e 8 % em apoptose/necrose (PI+/AV+)) das células em processo de morte celular, bem diferente das células tratadas apenas com CR-LAAO, onde praticamente 100% das células encontravam-se em algum processo de morte celular. O perfil apoptótico/necrótico apresentado pelas células tratadas apenas com catalase, é muito semelhante ao apresentado pelas células tratadas com CR-LAAO + catalase (~ 40% de células em apoptose e/ou necrose) (Figura 9 A).

No tratamento das células HepG2 com 25 µg/mL de CR-LAAO na presença da catalase, observou-se que 22% das células estavam em apoptose e 19% em apoptose/necrose, mostrando que houve um aumento significativo da viabilidade celular em relação as células tratadas apenas com a CR-LAAO (55% em apoptose e 35% em apoptose/necrose). A catalase sozinha induziu alta toxicidade nas células de hepatocarcinoma, sendo que 52,5 % das células analisadas encontravam-se em apoptose e 15,6% em apoptose/necrose (PI+/AV+) (Figura 9 B).

A CR-LAAO na presença de catalase (150 U/mL) induziu baixa toxicidade nas células HL-60 (viabilidade celular de ~ 70%), quando comparado ao tratamento sem catalase. No tratamento controle com a catalase observou-se que 33,7% das células encontravam-se em processo de apoptose/necrose (PI+/AV+), enquanto que 12,4% estavam em estágio de apoptose (Figura 9 C).

FIGURA 9. Avaliação do potencial apoptótico/necrótico da CR-LAAO em PBMC (A), HepG2 (B) e HL-60 (C) por citometria de fluxo. Tratamento com CR-LAAO (25 µg/mL) na ausência ou presença de catalase (150 U/mL) após 24 horas de tratamento. As células tratadas com **PBS** foram utilizadas como controle negativo. Controle catalase (**CC**) – 150U/mL. A população de células em necrose foi marcada com PI (PI+), em apoptose foi marcada com anexina FITC V (AV+) e população com células necróticas e apoptóticas foi marcada como PI+/AV+. Resultados expressos pela média $\pm$ SD para três experimentos independentes ($n = 3$). As diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) foram marcadas com * (valores de PI+/AV+ em relação ao PBS); # (valores de apoptose em relação ao PBS), utilizando o teste one-way ANOVA.

4.3. Análise da expressão diferencial dos genes *BAX*, *FAS* e *BCL2*

A modulação da expressão dos genes *BAX*, *FAS* e *BCL2* foi investigada pela metodologia de RT-qPCR. As linhagens tumorais HepG2 e HL-60 foram tratadas com diferentes concentrações de CR-LAAO, sendo que as células de hepatocarcinoma foram tratadas com as concentrações 0,1; 1,0 e 1,7 µg/mL e as células leucêmicas tratadas com 0,1; 1,0 e 10,78 µg/mL. Essas concentrações foram determinadas de acordo com o perfil citotóxico da enzima sobre essas células conforme mostrado no item 4.1.2 sendo que 1,7 µg/mL corresponde à IC₅₀ determinada para HL-60 e 10,8 µg/mL à IC₅₀ determinada para HepG2. Outras concentrações também foram testadas (25 e 50 µg/mL), mas, constatou-se que nas culturas tratadas com concentrações superiores às IC₅₀ não foi possível extrair a quantidade suficiente de RNA para as sínteses de cDNA.

Após a extração, os RNAs das amostras passaram por processos de quantificação (NanoDrop) onde foi possível observar que as quantidades de RNAs extraídos das amostras estavam, em sua maioria, em concentrações satisfatórias (>100 ng/µL). A fim de avaliar a integridade do RNA, as amostras de RNA total também foram submetidas à avaliação em gel de agarose 1% (Figuras 10 e 11).

As amostras que apresentaram RNA íntegro e concentrações ideais foram utilizadas para a síntese de cDNA e RT-qPCR. Inicialmente foram realizados os ensaios de RT-qPCR para determinar a eficiência da amplificação dos genes de interesse e do gene de referência. A curva de eficiência foi traçada e analisada pelo *StepOne software* v.2.2.2. É possível observar na Tabela 1, que as sondas Taqman® dos genes de interesse apresentaram eficiências de amplificação satisfatórias para a quantificação da análise de expressão relativa.

FIGURA 10. Migração eletroforética de RNA total extraído de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de CR-LAAO em gel de agarose 1%. Avaliação da integridade do RNA total pela observação das bandas correspondentes ao RNAr 28S (banda superior) e RNAr 18S (banda inferior). Tratamentos: (1; 2; 3) PBS; (4; 5; 6) 0,1 µg/mL de CR-LAAO; (7; 8; 9) 1 µg/mL de CR-LAAO; (10; 11; 12) 10,78 µg/mL de CR-LAAO.

FIGURA 11. Migração eletroforética de RNA total extraído de células HL-60 tratadas com diferentes concentrações de CR-LAAO em gel de agarose 1%. Avaliação da integridade do RNA total pela observação das bandas correspondentes ao RNAr 28S (banda superior) e RNAr 18S (banda inferior). Tratamentos: (1; 2; 3) PBS; (4; 5; 6) 0,1 µg/mL de CR-LAAO; (7; 8; 9) 1 µg/mL de CR-LAAO; (10; 11; 12) 10,78 µg/mL de CR-LAAO.

Tabela 1. Ensaios Taqman® adquiridos para as reações de RT-qPCR para avaliação da expressão dos genes e respectivas eficiências de amplificação para a linhagem HepG2 e HL-60

Gene (Símbolo)	Gene (Nome)	Gene ID	Ensaio Taqman®	Eficiência (%)	
				HepG2	HL-60
<i>ACTB</i>	<i>Beta Actin</i>	60	4352935E	97	91
<i>BAX</i>	<i>BCL2-associated X protein</i>	581	Hs00180269_m1	91	92
<i>BCL2</i>	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	596	Hs00608023_m1	91	81
<i>FAS</i>	<i>Fas cell surface death receptor</i>	355	Hs00236330_m1	94	92

4.3.1. Expressão diferencial dos genes *BAX*, *FAS* e *BCL2* em HepG2

Podemos observar que não houve alterações significativas na expressão dos genes *FAS*, *BAX* e *BCL2* (Figura 12 A, B e C) em qualquer das concentrações testadas, quando comparadas ao controle PBS.

FIGURA 12. Perfil de expressão dos genes *FAS* (A), *BAX* (B) e *BCL2* (C) por PCR em tempo real para a linhagem tumoral HepG2 tratadas com CR-LAAO em diferentes concentrações. Culturas de células HepG2 foram tratadas com 0,1; 1,0 e 10,78 µg/mL de CR-LAAO. As amostras controle (células tratadas com PBS) foram utilizadas como calibradores do experimento. O gene *ACTB* (β -actina) foi utilizado como gene de referência. Resultados expressos pela média $\pm$ SD para dois experimentos independentes ($n = 3$). As diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) foram marcadas com * (valores estatisticamente diferentes do PBS), utilizando o teste one-way ANOVA.

4.3.2. Expressão diferencial dos genes *BAX*, *FAS* e *BCL2* em HL-60

As concentrações testadas de CR-LAAO foram capazes de induzir a expressão do gene *FAS* (Figura 13 A) em células leucêmicas. Entretanto, não houve alterações na expressão dos genes *BAX* e *BCL2* (Figura 13 B e C) em qualquer das concentrações testadas, quando comparado ao controle PBS.

FIGURA 13. Perfil de expressão dos genes *FAS* (A), *BAX* (B) e *BCL2* (C) por PCR em tempo real para a linhagem tumoral HL-60 tratadas com CR-LAAO em diferentes concentrações. Culturas de células HL-60 foram tratadas com 0,1; 1,0 e 1,7 µg/mL de CR-LAAO. As amostras controle (células tratadas com PBS) foram utilizadas como calibradores do experimento. O gene *ACTB* (β -actina) foi utilizado como gene de referência. Resultados expressos pela média $\pm$ SD para dois experimentos independentes ($n = 3$). As diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) foram marcadas com * (valores estatisticamente diferentes do PBS), utilizando o teste one-way ANOVA.

4.4. Análise da expressão proteica das caspases 3, 8 e 9 nas células HL-60 e HepG2

O tratamento das células HL-60 com diferentes concentrações de CR-LAAO (0,1; 1,0 e 1,7 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas estimulou a ativação da caspase 3 e 8 (Figura 14), sendo possível detectar esta ativação pelo aumento sequencial das bandas específicas da caspase ativa. A ativação ocorreu de modo dependente da concentração da enzima, ou seja, quanto maior a concentração de LAAO maior ativação. Não foi possível detectar qualquer alteração das bandas específicas da caspase 9 inativa (Figura 14).

Não foi possível visualizar qualquer marcação de bandas específicas das caspases 3, 8 e 9 nas células HepG2 tratadas com diferentes concentrações CR-LAAO (0,1; 1,0 e 10,78 $\mu\text{g/mL}$), por 24 horas.

Conforme descrito, no item 3.2.8.4 de Material e Métodos, a expressão proteica da proteína endógena tubulina foi utilizada para a normalização dos valores da densidade das bandas das proteínas-alvo.

FIGURA 14. Avaliação da ativação das caspases 3, 8 e 9 pela CR-LAAO em células HL-60. Análise da expressão proteica das caspases 3, 8 e 9 por meio de *Western-blot*. Pró caspase 9 (PM=48 kDa); Tubulina (PM=48kDa); Caspase 3 clivada (PM=19kDa); Caspase 8 clivada (PM=23kDa); (1) PBS; (2) 0,1 $\mu\text{g/mL}$; (3) 1,0 $\mu\text{g/mL}$; (4) 1,6 $\mu\text{g/mL}$. A revelação da imunoreatividade foi realizada por quimiluminescência com tempo de exposição de 3 segundos a 8 minutos.

4.5. Análise da expressão proteica de BAX e BCL2 nas células HL-60 e HepG2

Não foi possível detectar qualquer alteração na expressão das proteínas BAX e BCL2 nas células HL-60 tratadas com diferentes concentrações de CR-LAAO (0,1; 1,0 e 1,7 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas (Figura 15). Já no tratamento das células HepG2 com a CR-LAAO (0,1; 1,0 e 10,78 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas, observou-se a ativação de BCL2 (Figura 15), sendo possível detectar esta ativação pela diminuição sequencial das bandas específicas da proteína ativa. A ativação também ocorreu de modo dependente da concentração da enzima. Não foi possível observar qualquer alteração na expressão da proteína BAX, para as células HepG2 em qualquer das concentrações testadas (Figura 15).

Conforme descrito, no item 3.2.8.4 de Material e Métodos, a expressão proteica da proteína endógena tubulina foi utilizada para a normalização dos valores da densidade das bandas das proteínas-alvo.

FIGURA 15. Avaliação da expressão das proteínas BCL2 e BAX pela CR-LAAO em células HL-60 e HepG2. Identificação das proteínas a partir do transcrito dos genes BAX e BCL2, por meio de *Western-blot*. Tubulina (PM=48kDa); anti-BCL2 (PM=26kDa); anti-BAX (PM=20kDa); (1) PBS; (2) 0,1 $\mu\text{g/mL}$; (3) 1,0 $\mu\text{g/mL}$; (4) 1,6 $\mu\text{g/mL}$; (5) 10,78 $\mu\text{g/mL}$. A revelação da imunoreatividade foi realizada por quimiluminescência com tempo de exposição de 3 segundos a 8 minutos.

4.6. Análise da cinética do ciclo celular

A análise da cinética do ciclo celular foi realizada a fim de localizar a atuação dessa enzima no processo de divisão celular. As concentrações de CR-LAAO utilizadas foram: 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 e 100 µg/mL. Como controle negativo (CN) foram utilizadas células tratadas com PBS.

Ao observar a distribuição do ciclo celular em suas três fases (G0/G1; S; G2/M) em PBMC, constata-se que não há diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre o controle negativo (CN) e as concentrações de 0,1 a 2,5 µg/mL de CR-LAAO, onde cerca de 92% das células estão em fase G0/G1; 2% em S e 6% em G2/M. Nas concentrações de 5 a 50 µg/mL ocorreu um discreto aumento no percentual de células na fase G2/M (~8%). Na concentração de 100 µg/mL, observa-se um atraso das células na fase S, aumentando de 2 para 6% em relação ao controle negativo, havendo também um aumento em G2/M (11%) (Figura 16 A).

Na linhagem HepG2, não foram observadas diferenças significativas nos percentuais de distribuição entre as fases, entre o controle negativo e as concentrações 0,1; 0,5; 5; 10 e 100 µg/mL de CR-LAAO (~G0/G1 = 50%; S = 25%; G2/M = 25%). Nas concentrações de 0,25; 1 e 2,5 µg/mL é possível observar um atraso das células na fase G0/G1, sendo que aproximadamente 70% das células permaneceram nessa fase. Já nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, a porcentagem de células em atraso na fase S aumentou de 25 para cerca de 40% em relação ao controle negativo (Figura 16 B). O tratamento de células HL-60 com CR-LAAO demonstrou um pequeno atraso em S para as concentrações de 1; 50 e 100 µg/mL, com o percentual de 33, 30 e 35% respectivamente, quando comparado ao controle negativo (24% de células em S). Nas demais concentrações, assim como no controle negativo, aproximadamente 60% das células estavam em G0/G1, 25% em S e 15% em G2/M (Figura 16 C).

FIGURA 16. Avaliação da progressão do ciclo celular em PBMC (A), HepG2 (B) e HL-60 (C) após o tratamento com CR-LAAO, por citometria de fluxo. Tratamento com CR-LAAO em diferentes concentrações (0,1 – 100 µg/mL). Células sem nenhum tratamento foram utilizadas como controle negativo (CN). As células foram fixadas com etanol e coradas com iodeto de propídeo presente na solução de HFS (*Hypotonic Fluorescence Solution*). **G0/G1**: repouso/preparação para síntese; **S**: síntese de DNA; **G2/M**: preparação para mitose. Resultados expressos pela média ± SD para três experimentos independentes (n=3). Os valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$) foram marcados com * (valores estatisticamente diferentes do CN em G0/G1) e # (valores estatisticamente diferentes do CN em G2/M), utilizando o teste one-way ANOVA.

4.7. Atividade bactericida

Para a atividade bactericida, foram utilizadas cepas de *S. aureus* e *E. coli* (4×10^5 UFC/mL). Em *S. aureus*, 24 µg/mL da toxina inibiu o crescimento bacteriano em T0 (12%), em T30 (13%) e em T60 (20%). Entretanto a concentração de 48 µg/mL mostrou-se mais efetiva na inibição do crescimento da bactéria, inibindo 20% em T0, 46% em T30 e 52% em T60 (Figura 17 A).

Na cepa de *E. coli*, o tratamento com 24 µg/mL de CR-LAAO não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano em T0 (inóculo de bactéria + enzima sem pré-incubação) quando comparado ao controle de crescimento bacteriano; em T30 (inóculo de bactéria + enzima pré-incubada por 30 min) a inibição foi de 35%; e em T60 (inóculo de bactéria + enzima pré-incubada por 60 minutos) a inibição foi de 48%. O tratamento com 48 µg/mL de CR-LAAO inibiu discretamente (13%) o crescimento bacteriano em T0, e em T30 e T60 a inibição foi de 41 e 43%, respectivamente (Figura 17 B). Após 24 horas de incubação, não houve inibição do crescimento bacteriano de ambas as cepas.

□ controle ■ CR-LAAO 24 µg/mL ▨ CR-LAAO 48 µg/mL

FIGURA 17. Atividade bactericida de CR-LAAO sobre as cepas de *S. aureus* (A) e *E. coli* (B). Soluções (10 µL) contendo 4×10^5 UFC/mL, incubadas com CR-LAAO (24 µg/mL e 48 µg/mL) por 30 (T30) e 60 minutos (T60), foram estriadas em placas com ágar. No grupo controle as estrias foram feitas com solução contendo apenas bactérias. Em T0, a solução bacteriana tratada com CR-LAAO foi estriada sem pré-incubação. Após 24 horas incubadas a 37°C, foi feita a contagem das colônias nas placas. Resultados expressos pela média $\pm$ SD (n = 3) de três experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle foram marcadas com *, utilizando o teste one-way ANOVA.

4.8. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio do método de diluição em microplaca e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para as cepas de *S. aureus* (padrão e resistentes) testadas observou-se que os valores obtidos de CIM e CBM foram bem menores para CR-LAAO do que para os antibióticos testados (Ampicilina e Tetraciclina). Depois de 6 h de incubação com a toxina, as CIMs para as cepas *S. aureus* padrão, *S. aureus* DT e *S. aureus* 56 foram respectivamente: 0,2; 0,78; e 0,39 µg/mL, enquanto que depois de incubadas por 24 h, as CIMs aumentaram respectivamente para 0,78; 1,6 e 1,6 µg/mL. As CBMs para a ampicilina não puderam ser determinados em qualquer das cepas resistentes, em nenhum dos tempos testados (>500 µg/mL) (Tabela 2).

Para a cepa de *E. coli* padrão, foi possível observar CIMs menores para CR-LAAO do que as determinadas para os antibióticos comerciais em ambos os tempos de tratamento (6 e 24h). Entretanto, o mesmo não foi observado para as CBMs, que depois de 6h (125 µg/mL) foram maiores do que as CBMs para ampicilina (62,5 µg/mL) e para tetraciclina (25 µg/mL). Depois de 24h de tratamento não foi possível determinar a CBM para a CR-LAAO (>500 µg/mL) (Tabela 2).

Foi possível determinar as CIMs e as CBMs obtidas para a CR-LAAO após 6h de incubação para ambas as cepas de *E. coli* resistentes (IAL 45 – 31,25; 62,5 µg/mL; JF239 – 125; 250 µg/mL), entretanto não foi possível detectar os valores dessas concentrações para o antibiótico Ampicilina (CIMs e CBMs >500 µg/mL). Após 24h de pré-incubação foi possível determinar a CIM (125 µg/mL) e a CBM (125 µg/mL) para a cepa IAL 45, mas não foi possível determinar essas concentrações para a cepa JF239 (>500 µg/mL). Ambas as cepas mostraram-se mais sensíveis à ação da tetraciclina do que da enzima, apresentando CIMs e CBMs sempre menores nos diferentes tempos de incubação avaliados (Tabela 2).

TABELA 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da CR-LAAO e dos antibióticos Ampicilina (AMP) e Tetraciclina (Tetra).

Amostras		S. aureus		S. aureus DT		S. aureus 56		E. coli		E. coli IAL45		E. coli JF239	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
6h	CR-LAAO	0,2	1,6	0,78	3,12	0,39	0,78	7,8	125	31,25	62,5	125	250
	AMP	3,9	7,8	0,98	>500	7,8	>500	15,6	62,5	>500	>500	>500	>500
	TETRA	6,25	50	6,25	50	3,2	25	12,5	25	25	50	25	50
24h	CR-LAAO	0,78	1,6	1,6	6,25	1,6	1,6	31,25	>500	125	125	>500	>500
	AMP	3,9	7,8	>500	>500	125	>500	62,5	250	>500	>500	>500	>500
	TETRA	25	50	12,5	50	12,5	25	50	100	50	50	50	50

Resultados em µg/mL expressos pela média de triplicatas.

4.9. Microscopia eletrônica de transmissão

Em estudos microscópicos de alta resolução (microscopia eletrônica de transmissão), foi avaliado o dano promovido pela CR-LAAO nas paredes celulares de duas cepas bacterianas, *E. coli* e *S. aureus* (padrões).

Após 24h de tratamento das cepas bacterianas com 48 µg/mL de CR-LAAO, foram observadas alterações morfológicas em ambas as cepas, com predominância do desarranjo da membrana externa da parede celular. Em *S. aureus* essa destruição da parede celular ficou evidente (Figura 18 B (a), C (a) e D (a)), principalmente se compararmos a parede do controle (Figura 18 A), em que as bactérias foram tratadas com PBS e mantiveram suas estruturas celulares intactas. Ainda para essa cepa visualizamos algumas peculiaridades, como a formação de estruturas *mesosome-like* (Figura 18 B (b)), em consequência do rolamento da membrana para o interior celular, o estrangulamento citoplasmático irregular (Figura 18 D (c)), a formação de vacúolos (Figura 18 E (d)) e a liberação de conteúdo celular (Figura 18 E (e) e F (e)) em consequência da total destruição da parede celular.

As análises microscópicas de *E. coli* também revelaram modificações na parede celular (Figura 19). Entretanto, diferentemente das observadas para *S. aureus*, a membrana mais externa da parede não foi totalmente destruída. Elas apresentaram uma ondulação na membrana (Figura 19 E (g) e F (g)). Pode-se observar ainda a formação de poros na parede (Figura 19 D (d) e E (d)), liberação do conteúdo celular (Figura 19 B (b)), estrangulamento citoplasmático irregular (Figura 19 D (f)), formação de vacúolos (Figura 19 C (c)) e menor depósito de grânulos eletrodensos (Figura 19 D (e)).

As imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de transmissão foram aproveitadas também para avaliar as paredes intactas das bactérias tratadas com CR-LAAO, a fim de verificar se assim como os antibióticos, a enzima seria capaz de induzir as bactérias testadas a desenvolverem algum mecanismo de resistência, como o espessamento da parede. Foi possível observar que as bactérias de ambas as cepas testadas, quando não destruídas pelo tratamento, desenvolveram um espessamento da parede bacteriana (Figura 20). Essa característica foi mais evidente e estatisticamente significativa na cepa das bactérias gram-negativas *E. coli*.

FIGURA 18. Microscopia de transmissão eletrônica de *S. aureus* tratada com CR-LAAO. Microscopia eletrônica de transmissão para a avaliação morfológica da parede bacteriana, onde 1×10^8 UFC/mL foram tratadas com PBS (**A**) ou 48 $\mu\text{g/mL}$ de CR-LAAO (**B; C; D; E e F**), incubadas a 37 °C por 24 horas em placas de 6 poços. As amostras foram processadas e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Hitachi 1100 funcionando a 100 kV. As imagens foram obtidas com ampliação de 80.000x (**A; B; C e D**) e de 40.000x (**E e F**). (**a**) Destruição da parede celular; (**b**) Formação de *mesosome-like*; (**c**) Estrangulamento citoplasmático irregular; (**d**) Formação de vacúolos; (**e**) Liberação do conteúdo intracelular. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata para cada tratamento ($n=9$). Em cada grade analisada foram capturadas de 5 a 10 imagens.

FIGURA 19. Microscopia de transmissão eletrônica de *E.coli* tratada com CR-LAAO. Microscopia eletrônica de transmissão para a avaliação morfológica da parede bacteriana, onde 1×10^8 UFC/mL foram tratadas com PBS (**A**) ou 48 $\mu\text{g/mL}$ de CR-LAAO (**B**; **C**; **D**; **E** e **F**), incubadas a 37 °C por 24 horas em placas de 6 poços. As amostras foram processadas e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Hitachi 1100 funcionando a 100 kV. As imagens foram obtidas com ampliação de 80.000x (**a** e **F**), de 40.000x (**C**; **D** e **E**) e de 20.000x (**A** e **B**). (**a**) Ampliação (80.000x) da imagem obtida (20.000x) das bactérias tratadas com PBS; (**b**) Liberação do conteúdo intracelular; (**c**) Formação de vacúolos; (**d**) Formação de poros; (**e**) Menor deposição de grânulos eletro-densos; (**f**) Estrangulamento citoplasmático irregular; (**g**) Ondulação da parede celular. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata para cada tratamento ($n=9$). Em cada grade analisada foram capturadas de 5 a 10 imagens.

FIGURA 20. Espessura da parede celular de bactérias tratadas com CR-LAAO. Quantificação da espessura da parede celular das bactérias *E. coli* e *S. aureus* tratadas com PBS ou 48 µg/mL de CR-LAAO, com auxílio do programa *ImageJ*, utilizando as imagens captadas pela microscopia eletrônica de transmissão obtidas com ampliação de 80.000x. Resultados expressos pela média ± SD (nanômetros) de três experimentos independentes (n=9). As diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo de PBS foram marcados com *, utilizando o teste one-way ANOVA.

4.10. Atividade fungicida

Para a avaliação da atividade fungicida, foi utilizada a cepa de *C. albicans* ($2,5 \times 10^2$ UFC). A enzima CR-LAAO foi avaliada nas concentrações de 25; 50 ou 100 µg/mL. Quando a levedura foi plaqueada junto com a enzima sem pré-incubação, não foi observada inibição significativa do crescimento das colônias em nenhuma das concentrações testadas (Figura 21 A). Após 6 horas de pré-incubação (inóculo de levedura + enzima), as concentrações de 25 e 50 µg/mL inibiram ~ 40% do crescimento fúngico, e na concentração de 100 µg/mL a inibição foi de 76% (Figuras 21 B e 22). Depois de 24 horas de incubação, a toxina não foi capaz de inibir o crescimento da *C. albicans* em qualquer das concentrações testadas (Figura 21 C).

FIGURA 21. Atividade fungicida de CR-LAAO sobre *C. albicans*. Soluções (100 µL) contendo $2,5 \times 10^2$ UFC/mL, incubadas com CR-LAAO (25, 50 e 100 µg/mL) por 6 h (**B**) e 24 h (**C**), foram estriadas em placas com ágar. No grupo controle, as estrias foram feitas com solução contendo apenas a levedura. A levedura tratada com CR-LAAO, também foi estriada sem pré-incubação (**A**). Após 48 horas incubadas a 37°C, foi feita a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas. Resultados expressos pela média $\pm$ SD de três experimentos independentes (n=12). As diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo de PBS foram marcados com *, utilizando o teste one-way ANOVA.

FIGURA 22. Atividade fungicida de CR-LAAO sobre *C. albicans*. Soluções (100 μ L) contendo $2,5 \times 10^2$ UFC/mL, incubadas com CR-LAAO por 6 h, foram estriadas em placas com ágar. No grupo controle, as estrias foram feitas com solução contendo apenas a levedura (**A**). Os tratamentos foram feitos com soluções de 25 μ g/mL (**B**); 50 μ g/mL (**C**) e 100 μ g/mL (**D**) de CR-LAAO. Após 48 horas incubadas a 37°C, foi feita a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas. Resultados expressos pela média $\pm$ SD de três experimentos independentes (n=12).

4.11. Atividade tripanomicida

A viabilidade celular do *Trypanosoma cruzi* (forma tripomastigota) foi analisada após o tratamento com a CR-LAAO (0,5; 2; 8 ou 32 μ g/mL) na ausência e presença de catalase (150 U/mL). A adição da toxina diretamente nas formas tripomastigotas resultou em morte dos parasitas de forma dependente de concentração, sendo que a maior concentração testada (32 μ g/mL) matou 47% dos parasitas (Figura 23). A IC_{50} determinada para esse parasita foi de 196,8 μ g/mL (intervalo de confiança de 95%: 10,06 a 3,850 μ g/mL). Pode-se observar que houve uma interferência da catalase na inibição da atividade biológica promovida pela CR-LAAO em todas as concentrações testadas. A atividade tripanomicida da CR-LAAO na maior concentração foi reduzida em $\sim 70\%$, enquanto que na menor concentração essa atividade foi totalmente extinta.

FIGURA 23. Efeito tripanomicida da CR-LAAO na presença da catalase. Efeito induzido pela enzima CR-LAAO, nas formas tripomastigotas do protozoário *Trypanosoma cruzi*, em função da concentração em µg/mL, na presença ou ausência da catalase (150 U/mL). Os dados foram expressos em porcentagem de variação no número de parasitas pela média $\pm$ SD de três experimentos independentes ($n = 3$). As diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos tratados foram marcadas com *, utilizando o teste one-way ANOVA.

4.12. Atividade leishmanicida

A viabilidade celular das cepas de *Leishmania sp.* foi analisada após o tratamento com a CR-LAAO (0,5; 2; 8 ou 32 µg/mL). A adição da toxina diretamente nas formas promastigotas das duas espécies testadas resultou em morte dos parasitas de forma dependente da concentração (Figura 24 A e B). A *L. infantum chagasi* foi mais susceptível ao efeito tóxico da CR-LAAO (Figura 24 B), apresentando IC_{50} de 16,66 µg/mL (intervalo de confiança de 95%: 10,17 µg/mL a 27,30 µg/mL), enquanto que a IC_{50} para *L. braziliensis* foi de 24,47 µg/mL (intervalo de confiança de 95%: 23,7 µg/mL a 25,3 µg/mL).

O efeito leishmanicida da CR-LAAO foi analisado também na presença da catalase. Pode-se observar que a catalase inibe o efeito da CR-LAAO sobre ambas as espécies testadas. Na espécie *L. braziliensis* o efeito da CR-LAAO foi totalmente extinto em todas as concentrações testadas (Figura 24 A). Já para *L. infantum chagasi*, é possível observar que nas concentrações de 8 e 32 µg/mL o efeito da CR-LAAO não foi totalmente anulado (Figura 24 B).

FIGURA 24. Efeito leishmanicida da CR-LAAO. Efeito dependente da concentração induzido pela enzima CR-LAAO em diferentes espécies de *Leishmania*, representado em função da concentração de CR-LAAO em µg/mL **(A)**. Variação no número de parasitas em função da concentração de CR-LAAO em µg/mL na presença da catalase (0,5 mg/mL) **(B)**. Os dados foram expressos pela média da porcentagem de variação no número de parasitas $\pm$ SD ($n = 3$). As diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos tratados foram marcadas com *, utilizando o teste one-way ANOVA.

4.13. Avaliação do recrutamento de células na cavidade peritoneal induzidos por diferentes concentrações de CR-LAAO

A avaliação dos exsudatos inflamatórios peritoneais induzidos após 4 horas de administração de diferentes concentrações da CR-LAAO (1, 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL), mostrou que houve uma migração significativa de leucócitos para a cavidade peritoneal dos animais tratados com as concentrações de 25 e 50 µg/mL (1550 e 1555×10^3 células/mL) em relação ao controle negativo PBS (822×10^3 células/mL). O mesmo não foi observado no tratamento com 100 µg/mL da toxina (1110×10^3 células/mL) (Figura 25 A).

Além disso, a diferenciação dos leucócitos presentes nestes exsudatos em neutrófilos ou células mononucleares (linfócitos ou monócitos) revelou que, 4 h após a administração, a CR-LAAO nas menores concentrações (1; 5 e 10 µg/mL) testadas não promoveu alterações significativas no número de neutrófilos, mas foi capaz de promover aumentos significativos em relação ao controle negativo nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL (Figura 25 B). Entretanto, não houve alterações significativas no número de células mononucleares em relação ao controle negativo (PBS) em qualquer das concentrações testadas (Figura 25 C).

FIGURA 25. Recrutamento de leucócitos (A), neutrófilos (B) e mononucleares (C) induzido pela injeção i.p. de diferentes concentrações de CR-LAAO. As células da cavidade peritoneal de camundongos foram recuperadas 4 horas após inoculação da toxina. Animais controles foram inoculados com PBS. Resultados expressos como média $\pm$ SD de três experimentos independentes ($n=12$). As diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo de PBS foram marcados com *, utilizando o teste one-way ANOVA.

4.14. Avaliação do recrutamento de células na cavidade peritoneal induzidos por 25 µg/mL de CR-LAAO em diferentes tempos de tratamento

Após a avaliação do recrutamento de células na cavidade peritoneal induzidos por diferentes concentrações de CR-LAAO, depois de 4 horas de tratamento, avaliamos a resposta à injeção i.p. em camundongos, de 25 µg/mL CR-LAAO em diferentes tempos de tratamento (4; 24; 48 e 96 horas). Foi possível observar que a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal ocorreu apenas após 4 h da administração da enzima. Nos grupos avaliados 24, 48 e 96 horas após o tratamento, não foi observada qualquer alteração significativa, quando comparados aos grupos controle (Figura 26 A).

A diferenciação dos leucócitos presentes nos lavados em neutrófilos ou células mononucleares (linfócitos ou monócitos) revelou que apenas após 4 h da administração, a CR-LAAO foi capaz de promover aumentos significativos no número de neutrófilos ($780 \times 10^3/\text{mL}$) em relação ao controle negativo ($75 \times 10^3/\text{mL}$) na concentração testada (Figura 26 B). Observamos ainda, que não houve alterações significativas no número de células mononucleares em relação ao controle negativo (PBS) em nenhum dos tempos avaliados (Figura 26 C).

FIGURA 26. Recrutamento de leucócitos (A), neutrófilos (B) e mononucleares (C) induzido pela injeção i.p. de 25 $\mu\text{g/mL}$ de CR-LAAO. As células da cavidade peritoneal de camundongos foram recuperadas 4; 24; 48 e 96 horas após inoculação da toxina. Animais controles foram inoculados com PBS. Resultados expressos como média $\pm$ SD de três experimentos independentes ($n=12$). As diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$) em relação ao controle negativo de PBS foram marcados com *, utilizando o teste one-way ANOVA.

4.15. Determinação de citocinas presentes no fluido peritoneal após a injeção i.p. de 25 µg/mL de CR-LAAO

A resposta inflamatória é desencadeada por uma cascata que inclui elementos celulares e liberação de mediadores. Assim, as citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-4 tiveram suas concentrações determinadas no lavado peritoneal de camundongos que receberam 25 µg/mL i.p. por diferentes tempos.

A CR-LAAO não foi capaz de promover a liberação das citocinas IL-4, IL-10 e TNF- α em nenhum dos tempos de tratamento avaliados, mas observou-se a produção das interleucinas IL-6 (80 pg/mL) e IL-1 β (46 pg/mL) após 4 horas de tratamento com 25 µg/mL (Figura 27 A e B).

FIGURA 27. Avaliação da produção de citocinas induzida pela injeção i.p. de 25 µg/mL de CR-LAAO. Dosagem da citocina pró-inflamatória IL-6 (A) e IL-1 β (B) (pg/mL) após 4h de tratamento com 25 µg/mL de CR-LAAO. Resultados expressos pela média $\pm$ SD de três experimentos independentes (n=12). As diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo de PBS foram marcados com *, utilizando o teste one-way ANOVA.

4.16. Determinação de LTB₄ e PGE₂ presentes no fluido peritoneal após a injeção i.p. de 25 µg/mL de CR-LAAO

Além das citocinas, na inflamação, os mediadores lipídicos como as prostaglandinas (PGs) e os leucotrienos (LTs) também podem ser produzidos. Para determinar se LTB₄ e PGE₂ foram produzidos após a i.p. com 25 µg/mL de CR-LAAO, após 4 horas o lavado peritoneal foi coletado. Observou-se um aumento significativo na produção de ambos os mediadores, quando comparado ao grupo controle (PBS) (Figura 28 A e B).

FIGURA 28. Avaliação da liberação de LTB₄ e PGE₂ induzida pela injeção i.p. de 25 µg/mL de CR-LAAO. Dosagem dos mediadores lipídicos LTB₄ (A) e PGE₂ (B) (pg/mL) após 4h de tratamento com 25 µg/mL de CR-LAAO. Resultados expressos pela média $\pm$ SD de três experimentos independentes (n=12). As diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo de PBS foram marcados com *, utilizando o teste one-way ANOVA.

4.17. Determinação da concentração de nitrito (NO_2^-) e aumento de proteína total presentes no fluido peritoneal após a injeção i.p. de 25 $\mu\text{g/mL}$ de CR-LAAO

O perfil de produção de NO foi avaliado indiretamente, pela dosagem de NO_2^- por meio da reação de Griess, após diferentes tempos de tratamento (Figura 29). Observamos que não houve variação na concentração desse gás nos lavados peritoneais dos animais tratados com 25 $\mu\text{g/mL}$ de CR-LAAO, quando comparados com os grupos controle (PBS). O mesmo foi observado para a variação da concentração proteica no sobrenadante dos lavados, onde não há variação significativa entre os grupos tratados com CR-LAAO e os grupos controle (Figura 30).

FIGURA 29. Determinação indireta de NO nos sobrenadantes dos lavados peritoneais de camundongos tratados com CR-LAAO. Dosagem da concentração de NO_2^- livre ($\mu\text{M/mL}$), presente nos lavados peritoneais de camundongos após 4, 24, 48 e 96 h de tratamento com 25 $\mu\text{g/mL}$ de CR-LAAO. O grupo controle foi tratado com PBS. Resultados expressos pela média $\pm$ SD de três experimentos independentes ($n=12$). Nenhum dos valores foi significativamente diferente do controle negativo ($p<0,05$), utilizando o teste one-way ANOVA.

FIGURA 30. Efeitos da administração de CR-LAAO sobre os níveis de proteína total presente nos lavados peritoneais de camundongos. Dosagem da concentração de proteínas totais livre ($\mu\text{g/mL}$), presentes nos lavados peritoneais de camundongos após 4, 24, 48 e 96 h de tratamento com 25 $\mu\text{g/mL}$ de CR-LAAO. Os grupos controles foram tratados com PBS. Resultados expressos pela média $\pm$ SD de três experimentos independentes ($n=12$). Nenhum dos valores foi significativamente diferente do controle negativo ($p<0,05$), utilizando o teste one-way ANOVA.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas tem sido observada na medicina popular de diversos povos e, por muito tempo foram as únicas fontes de medicamentos (AKELERE, 1993). Hoje, mesmo com os avanços da indústria farmacêutica, esses produtos bioativos continuam sendo ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos.

Muitas toxinas isoladas de peçonhas de serpentes têm sido utilizadas como ferramentas na compreensão de diversos eventos fisiopatológicos. Isso se deve ao fato dessas proteínas apresentarem diversas atividades biológicas que podem agir de forma benéfica ao homem, como por exemplo, suas atividades antiparasitárias, microbidas e antitumoral (IZIDORO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2009; SUN et al., 2010; LEE et al., 2011; ALVES-PAIVA et al., 2011; GUO et al 2012; BURIN et al., 2013; VARGAS et al., 2013; MUÑOZ et al., 2014).

No presente trabalho, caracterizamos funcionalmente a L-aminoácido oxidase da peçonha de *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO) por meio das atividades: bactericida; fungicida; leishmanicida; tripanomicida; inflamatória; citotóxica; apoptótica/necrótica; modulação da cinética do ciclo celular; análise da expressão de genes apoptóticos, bem como a expressão de seus transcritos proteicos e das caspases envolvidas nos processos apoptóticos. Nossos estudos foram direcionados para a elucidação dos mecanismos de ação responsáveis por estas ações farmacológicas dessa classe de enzima.

5.1. Potencial antitumoral da CR-LAAO

Para avaliar a atividade citotóxica da LAAO, utilizamos o método colorimétrico de citotoxicidade proposto por Mosmann em 1983. A CR-LAAO promoveu citotoxicidade em PBMC, HepG2 e HL-60 (Figura 5). Observamos que, de maneira geral, as menores concentrações (0,1- 1 µg/mL) foram pouco citotóxicas para as diferentes linhagens celulares, mantendo alta viabilidade celular (70%-90%). Entretanto, nas demais concentrações testadas (2,5 – 100 µg/mL) a LAAO comportou-se de maneira diferente entre as linhagens. Em PBMC, nas concentrações de 5 a 100 µg/mL, a toxina manteve uma citotoxicidade de aproximadamente 50% (Figura 5 A). A concentração de 2,5

µg/mL matou cerca de 30% das células em PBMC e em HepG2, mas nas células HL-60 foi capaz de matar ~ 50% das células (Figura 5 C), ou seja, essa linhagem parece ser mais sensível a ação citotóxica da CR-LAAO. Já para as células HepG2, foram necessários aproximadamente 10µg/mL de LAAO para matar cerca de 50% das células.

A cisplatina (Incel - Darrow®) foi utilizada como controle positivo de citotoxicidade, e para tanto determinamos suas IC₅₀ para cada linhagem celular testada (PBMC = 14,6 µg/mL; HepG2 = 4,0 µg/mL; HL-60 = 2,9 µg/ml). Quando comparamos os efeitos citotóxicos induzidos pela cisplatina com os efeitos induzidos pela CR-LAAO, observamos que 100 µg/mL de CR-LAAO causam praticamente o mesmo efeito citotóxico (matam ~ 50% das células) que 14,6 µg/mL de cisplatina em PBMC. No entanto para as células tumorais, o quimioterápico e a CR-LAAO apresentaram características citotóxicas bem semelhantes, como por exemplo, 100 µg/mL de CR-LAAO ou de cisplatina matam ~ 80% de HepG2 e HL-60. A cisplatina é um agente antineoplásico, citotóxico muito utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer. É um composto à base de platina inorgânica que se liga ao DNA induzindo alterações estruturais. O seu efeito citotóxico é, assim, causado pela inibição da transcrição e replicação, induzindo a apoptose (PABLA; DONG, 2012).

Estes resultados corroboram com vários outros estudos realizados com SV-LAAOs isoladas, que também demonstram atividade citotóxica sobre diferentes células tumorais. Ahn e colaboradores (1997) mostraram que a LAAO isolada de *Ophiophagus Hannah* (King cobra) é citotóxica sobre células de câncer de estômago (SNU-1). As LAAOs isoladas de *Agkistrodon acutus* (ACTX-6) e *Bungarus fasciatus* (BF-LAAO) apresentaram efeito citotóxico sobre as células A549 (adenocarcinoma de pulmão), sendo a IC₅₀ de ACTX-6 de 20 µg/mL (ZHANG; WU, 2008; WEI et al., 2009). Em 2008, Alves e colaboradores, avaliaram os efeitos citotóxicos da LAAO isolada de *Bothrops atrox* (BatroxLAAO) sobre várias linhagens tumorais, como HL-60 (IC₅₀ 50 µg/mL), PC12, B16F10 e JURKAT (IC₅₀ 25 µg/mL), bem como sobre PBMC (IC₅₀ 50 µg/mL).

Um estudo com a LAAO isolada de *Bothrops leucurus* revelou que essa toxina tem efeito citotóxico sobre as linhagens MKN-45 (câncer de estômago),

RKO (câncer coloretal) e LL-24 (fibroblastos humanos) (NAUMANN et al., 2011). Bregge-Silva e colaboradores (2012), avaliaram o efeito citotóxico da LAAO isolada da serpente *Lachesis muta* (LmLAAO) sobre as células AGS (adenocarcinoma gástrico) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama), determinando IC₅₀ de 22,7 µg/mL e de 1,41 µg/mL, respectivamente. Recentemente, Li Lee e colaboradores (2014), observaram os efeitos citotóxicos da LAAO isolada de *Ophiophagus hannah* em células MCF-7 e A549 (adenocarcinoma de pulmão), determinando suas IC₅₀, após 24h de tratamento, em 0,05 e 0,09 µg/mL, respectivamente.

Podemos observar que a maioria das concentrações letais, capaz de matar 50% das células tumorais, determinadas nos estudos citados são bem maiores que as concentrações encontradas para a CR-LAAO (IC₅₀ para HL-60 foi de 1,7 µg/mL e para HepG2 foi de 10,78 µg/mL). O mesmo ocorre com as células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC), onde a IC₅₀ da BatroxLAAO (50 µg/mL) é aproximadamente 20 vezes maior do que a concentração encontrada para CR-LAAO (2,43 µg/mL). Esses dados nos levam a inferir que a CR-LAAO pode ser mais citotóxica que a maioria das LAAOs isoladas até o momento.

Após avaliarmos os efeitos citotóxicos das diferentes concentrações de CR-LAAO, percebemos que as células tumorais foram mais sensíveis à ação das concentrações maiores (5 – 100 µg/mL) de CR-LAAO (75% de morte em HL-60 e 83% em HepG2), e por isso selecionamos a concentração de 25 µg/mL para avaliar o efeito da catalase sobre o peróxido de hidrogênio produzido pela LAAO.

O efeito citotóxico das LAAOs tem sido atribuído, principalmente, à liberação de peróxido de hidrogênio para o meio, resultando em estresse oxidativo, e consequentemente, na morte celular. A fim de certificar-se dessa atribuição, vários estudos com L-aminoácido oxidases isoladas de serpentes, avaliam seus efeitos citotóxicos na presença da catalase, sendo possível observar que na presença dessa enzima a ação tóxica das SV-LAAOs é praticamente anulada (DU; CLEMETSON, 2002; GUO et al., 2012).

A catalase é uma enzima intracelular produzida no retículo endoplasmático rugoso de diferentes organismos vivos. Ela é conhecida por

sua capacidade em degradar H_2O_2 em H_2O e O_2 . O peróxido de hidrogênio é um produto decorrente do metabolismo celular em organismos expostos ao oxigênio atmosférico, estando relacionado com diversas patologias ligadas ao estresse oxidativo (ROJKIND et al., 2002).

Quando realizamos o tratamento das linhagens celulares citadas acima apenas com catalase, observamos que esta enzima é pouco tóxica às células tumorais e às células normais do sistema sanguíneo (Figura 7). Nos tratamentos com CR-LAAO na presença de catalase, observamos um aumento significativo da viabilidade celular quando comparado aos tratamentos com a toxina nas mesmas concentrações. Em PBMC (Figura 7 A) e HepG2 (Figura 7 B) foi possível observar um aumento de aproximadamente 40% na viabilidade (viabilidade celular de 90% e 100% respectivamente). Já as células leucêmicas, embora tenham tido um aumento da viabilidade celular (viabilidade celular de ~ 60%), o efeito citotóxico não foi totalmente revertido, o que corrobora com nossos dados de citotoxicidade já apresentados, sugerindo maior sensibilidade dessa linhagem celular aos efeitos da CR-LAAO.

A maioria dos estudos realizados a fim de desvendar o mecanismo de ação das SV-LAAOs envolve o tratamento das células com LAAO na presença de catalase. Em 2011, Alves-Paiva e colaboradores observaram que, na presença de catalase (150 U/mL), a BatroxLAAO, assim como a CR-LAAO, não induziu morte celular de maneira significativa nas células tumorais testadas (Jurkat; B16F10; PC12) e em PBMC, mantendo viabilidade celular de ~ 80% para todas as linhagens testadas.

Naumann e colaboradores (2011), também analisaram os efeitos citotóxicos da LAAO isolada de *B. leucurus* (BI-LAAO) na presença de catalase (100 µg) sobre as células tumorais MKN-45. Foi possível observar que a catalase inibiu cerca de 25% a citotoxicidade da BI-LAAO. A LAAO isolada de *L. muta*, 0,1 mg/mL de catalase foi capaz de abolir completamente os efeitos citotóxicos da LmLAAO sobre as células tumorais MCF-7 (BREGGE-SILVA et al., 2012). A LAAO isolada de *O. hannah*, na presença de 400 µg/mL de catalase, também teve seu efeito citotóxico, sobre as células tumorais MCF-7 e A549, drasticamente reduzido (LI LEE et al., 2014). Portanto, podemos sugerir que o peróxido de hidrogênio produzido por essas toxinas, incluindo a

CR-LAAO, está mesmo envolvido no mecanismo de ação citotóxica proposto para essa classe de toxinas (DU; CLEMETSON, 2002; GUO et al.; 2012; IZIDORO et al., 2014; COSTA et al., 2014).

A apoptose é uma forma controlada de morte celular, definida por várias características bioquímicas e morfológicas, tais como a exposição de fosfatidilserina ao exterior da membrana plasmática, condensação do núcleo celular e a clivagem da cromatina (DNA) em fragmentos oligonucleossomais. Por contraste, a necrose representa uma forma acidental de morte celular, desencadeando um processo inflamatório. Alguns estudos sugerem que a exposição a pró-oxidantes pode desencadear apoptose ou necrose em função da sua concentração e duração da exposição (DYPBUKT et al., 1994; BONFOCO et al., 1995; ANDE et al., 2006).

Para analisar os efeitos apoptóticos e necróticos induzidos pela CR-LAAO, foram realizados experimentos por citometria de fluxo nos quais, a capacidade de indução de apoptose dessa enzima foi analisada pela marcação com anexina V, que é conjugada com fluoresceína e funciona como um marcador de fosfatidilserina exposta por células em estágio de apoptose. Já o efeito necrótico é analisado pela marcação com o PI (iodeto de propídeo), que cora os ácidos nucleicos de células mortas.

A fosfatidilserina (PS) é um componente fosfolipídico, normalmente mantido no folheto interno (lado citosólico) das membranas celulares, por uma enzima denominada translocase aminofosfolipídio ATP. Quando uma célula entra em apoptose, a fosfatidilserina não está mais restrita ao lado citosólico da membrana, tornando-se exposta na superfície da célula, onde pode ser marcada com a anexina V (BLOKLAND et al., 1999).

Para o tratamento de PBMC com CR-LAAO (Figura 8 A), os resultados mostram que essa proteína induz apoptose (AV+) em todas as concentrações testadas (0,1 – 100 µg/mL). Isso significa que, embora existam células em estágio de apoptose/necrose (PI+/AV+) e/ou necrose, o maior percentual de células encontra-se em estágio de apoptose (60 – 70%). O mesmo ocorreu no tratamento com cisplatina, embora o quimioterápico tenha se mostrado menos tóxico às células PBMC (37% células em apoptose), do que à CR-LAAO.

No tratamento das células tumorais (HL-60 e HepG2), embora a CR-LAAO tenha se mostrado tóxica, os mecanismos de ação parecem ser distintos entre as duas linhagens. Nas células de hepatocarcinoma humano (Figura 8 B), as menores concentrações (0,1 – 5 µg/mL) causam apoptose, enquanto que as maiores (25 – 100 µg/mL) causam apoptose/necrose (PI+/AV+). A cisplatina também demonstrou ser altamente tóxica às células HepG2, levando ~ 70% das células ao processo de morte (64% de células em apoptose e 8% de células PI+/AV+).

Os resultados obtidos no tratamento da linhagem HL-60 (Figura 8 C), sugerem que essas células são mais susceptíveis a ação tóxica da CR-LAAO. As concentrações de 0,5 a 100 µg/mL induzem morte celular, principalmente, por PI+/AV+ (70 – 80%). O mesmo foi observado para o tratamento com cisplatina (70% de células em PI+/AV+).

Inúmeros estudos já relataram que os processos apoptóticos induzidos por LAAOs são parcialmente explicados pela geração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que se acumula na superfície da membrana celular. O peróxido de hidrogênio pertence às espécies reativas de oxigênio (ROS), e é amplamente aceito que o aumento da concentração de ROS promove um desarranjo mitocondrial da célula, causando a morte celular (SUHR; KIM, 1996; TORII et al., 1997; DU; CLEMETSON, 2002; ZHANG et al., 2004; ANDE et al., 2006; ALVES et al., 2008; ZHANG; WU, 2008; RODRIGUES et al., 2009; SOUZA et al., 2009; WEI et al., 2009; ALVES-PAIVA et al., 2011; GUO et al., 2012).

A fim de verificar a importância da produção do peróxido de hidrogênio pela CR-LAAO e seu envolvimento no processo de morte celular, realizamos o tratamento das células tumorais e PBMC, com 25 µg/mL de toxina na presença de catalase (150 U/mL). Observamos um aumento expressivo na viabilidade celular em todas as linhagens. No tratamento das células com apenas catalase, podemos observar que, do total das células de hepatocarcinoma analisadas (Figura 9 B), 68% entraram em processo de morte celular (52,5% de apoptose e 15,6% de PI+/AV+). A catalase também promoveu a morte das células leucêmicas (46%) (Figura 8 C) e sanguíneas normais (39%) (Figura 8 A), porém em menor intensidade. Ao analisarmos a figura 8 é possível inferir que

os processos de morte celular apresentados pelas células tumorais e normais quando tratadas com CR-LAAO juntamente com a catalase, parecem estar relacionados com a presença da catalase e não mais com o efeito tóxico do H_2O_2 produzido pela LAAO de *C. rodhostoma*.

Esses dados corroboram o estudo de Ande e colaboradores (2006), que avaliaram os efeitos da CR-LAAO na viabilidade de células leucêmicas JURKAT e a influência da catalase na indução de apoptose. Observou-se que a CR-LAAO induziu necrose (PI+) em JURKAT de maneira dose-dependente. Entretanto, na presença de catalase, o número de células necróticas foi drasticamente reduzido. Esta redução foi acompanhada por um aumento correspondente do número de células apoptóticas (AV+), provavelmente referente ao tratamento com a catalase.

São escassos os estudos que descrevem a ação apoptótica das LAAOs por citometria de fluxo. Em geral, essa técnica tem sido empregada na detecção de distúrbios no ciclo celular. A maioria das análises de apoptose é feita através da quantificação de fragmentos oligonucleossomais de DNA das células (eletroforese em gel de agarose) após o tratamento com a proteína.

A LAAO de *Vipera berus berus* (VB-LAAO) induziu, em baixas concentrações, apoptose nas linhagens tumorais HeLa e K562. Em concentrações mais elevadas, a VB-LAAO, assim como a CR-LAAO, induziu necrose nas células K562 (SAMEL et al., 2006). Ciscotto e colaboradores (2009) também observaram a indução de apoptose em células MM6 (monocíticas humanas) pela LAAO de *B. jararaca*, confirmada pela fragmentação de DNA.

Um estudo realizado com a L-aminoácido oxidase de uma serpente coreana mostrou a ação apoptótica dessa proteína em células linfoblásticas leucêmicas murinas (L1210), analisando quantitativamente a fragmentação de DNA das células após o tratamento com a proteína. Após 24 horas de tratamento foram observadas mortes por necrose, sugerindo que altas quantidades de H_2O_2 foram liberadas durante a reação enzimática. Quando o tratamento das células foi feito concomitantemente com a catalase, a viabilidade celular não foi totalmente recuperada, indicando que a atuação

apoptótica das LAAOs não pode ser completamente explicada pela geração de peróxido de hidrogênio (SUHR; KIM, 1996).

Em 1997, Torii e colaboradores avaliaram os efeitos apoptóticos de uma LAAO isolada de *Crotalus atrox* (Apoxin I). Observou-se que 10 µg/mL de Apoxin I induziram a condensação e a fragmentação da cromatina em células endoteliais umbilicais humanas, em HL-60, em A2780 (carcinoma de ovário humano) e células endoteliais de rato (NK-3). Na concentração de 2,5 µg/mL, Apoxin I induziu fragmentação de DNA em uma escala oligonucleossomal em HL-60, entretanto, em menor concentração, a toxina não induziu apoptose nessa linhagem. Neste estudo, ainda foi possível observar que nos tratamentos onde a LAAO estava inativada por mudanças de temperatura (70°C), ou na presença de catalase, a indução de apoptose foi totalmente abolida. Verificou-se ainda que, na presença do antioxidante de membrana, trolox, a Apoxin I não foi capaz de induzir apoptose nas linhagens testadas. Estes estudos sugerem que o efeito apoptótico promovido pela Apoxin I está relacionado com a atividade catalítica da enzima, que é responsável pela produção e liberação de H₂O₂ que pode estar relacionado à oxidação da membrana celular.

Outra proteína dessa classe, que também demonstrou induzir apoptose em células HL-60, foi a ACL LAO (LAAO isolada de *Agkistrodon contortrix laticinctus*). Após 24 horas de tratamento com 25 µg/ml dessa toxina, observou-se um padrão típico de fragmentação do DNA em células apoptóticas (SOUZA et al., 1999).

Os efeitos apoptóticos e necróticos da BatroxLAAO foram analisados por citometria de fluxo. Essa toxina induziu processos de morte celular em diferentes linhagens tumorais, como JURKAT, B16F10, PC12 e HL-60. As linhagens B16F10 e PC12 apresentam morte por apoptose (AV+). Para o tratamento das células JURKAT, os resultados mostraram que essa toxina induz morte por necrose (27% de células em necrose) (ALVES et al., 2008). Em HL-60, 50 µg/mL de BatroxLAAO apresentou efeito apoptótico em 28,6%, e efeito necrótico em 14,2%, mantendo uma viabilidade celular de aproximadamente 57% (ALVES-PAIVA et al., 2011). A CR-LAAO, assim como a BatroxLAAO, também induziu morte celular na linhagem HL-60 por ambos os

mecanismos (apoptose e necrose), entretanto, após o tratamento com 50 µg/mL da toxina, apenas 20% das células se mantiveram viáveis.

Diferentemente da CR-LAAO, a BatroxLAAO induziu baixo percentual de apoptose em células PBMC. A concentração de 50 µg/mL dessa proteína induziu 18% de células apoptóticas e 17% de células necróticas, mantendo a viabilidade celular em cerca de 60% (ALVES-PAIVA et al., 2011). Esses dados corroboram com os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade (MTT), permitindo mais uma vez sugerirmos que a CR-LAAO parece ser mais citotóxica que outras SV-LAAOs.

Está claro que as SV-LAAOs são enzimas altamente tóxicas a diferentes linhagens celulares. Os dados literários comprovam que a produção do peróxido de hidrogênio é um dos principais responsáveis por essa atividade biológica. Entretanto o mecanismo de ação deste agente oxidante não está bem definido. Sabe-se que muitas espécies reativas de oxigênio são capazes de oxidar, e mesmo estimular, o metabolismo celular (ANDE et al., 2006). Durante o estresse oxidativo, H₂O₂ em baixas concentrações tem uma função de ativação e transcrição de alguns genes que poderiam prevenir a morte celular, mas um aumento na concentração de H₂O₂ induz um atraso no crescimento e morte celular por apoptose (SOUZA et al., 1999, DU; CLEMETSON, 2002).

A fim de verificarmos quais são a (s) via (s) da apoptose envolvidas no processo de morte celular induzido pela CR-LAAO, analisamos a expressão de genes pró e anti-apoptóticos por células tumorais HL-60 e HepG2 tratadas com CR-LAAO, bem como a expressão de seus transcritos proteicos e a ativação das caspases, também envolvidas nesse processo.

A transcrição reversa combinada com a reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real (RT-qPCR) tem demonstrado ser um poderoso método para quantificar a expressão de genes (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Entretanto, poucos estudos de biologia molecular, envolvendo expressão gênica e peçonhas de serpentes, têm sido realizados.

Avaliamos a expressão dos genes *FAS*, *BAX* e *BCL2* nas células HepG2 e HL-60 tratadas com diferentes concentrações de CR-LAAO. Não observamos alterações significativas na expressão de nenhum dos genes citados nas

células de hepatocarcinoma (Figura 12). Entretanto, as células leucêmicas tratadas apresentaram um aumento na expressão do gene pró-apoptótico *FAS* em todas as concentrações testadas (Figura 13).

A apoptose é um processo de morte celular programado requerido para a manutenção da homeostase sob condições fisiológicas e pela resposta a vários estímulos internos e externos. As células acometidas por apoptose são caracterizadas pelo inchaço da membrana, redução do citoplasma, condensação da cromatina e fragmentação do DNA. O câncer está associado com uma diminuição do processo apoptótico e o desenvolvimento de células resistentes a apoptose é um fator que contribui significativamente para a falha das terapias em câncer. Portanto, a indução de apoptose em células cancerígenas resistentes a apoptose, seria uma estratégia ideal para a terapia de câncer (REED, 2003; NGUYEN; SUN, 2006; WELLS, 2006).

O processo de apoptose é orquestrado, principalmente, por membros de uma família de cisteína proteases conhecidas como caspases, por meio da ativação de duas vias de sinalização: via intrínseca (mitocondrial) e extrínseca (receptores de morte) (TAYLOR et al., 2008).

A ativação das caspases pela via extrínseca envolve a ligação de ligantes extracelulares com receptores de morte transmembrânicos (*FAS* ou *TNF- α*), provocando o recrutamento de proteínas adaptadoras, como a proteína do domínio de morte associada ao *FAS* (*FADD*), a qual, por sua vez recruta várias moléculas agregadas da caspase-8, promovendo, assim, a sua ativação e autoprocessamento. A caspase-8 (iniciadora) ativada, ativa as caspases -3 e -7 (efetoras) responsáveis pelo desmantelamento celular característico da apoptose (TAYLOR et al., 2008; JIN; EL-DEIRY, 2005).

A cascata de sinalização de morte é iniciada mediante a reticulação de *FAS* com o seu ligante natural (*FASL*). A redução da expressão ou mutação do gene *FAS* (*TNFRSF6* / *CD95* / *APO-1*) é encontrada em muitos tumores malignos, prejudicando a sensibilidade das células tumorais aos sinais apoptóticos (NAGATA; GOLSTEIN, 1995; WANG et al., 2014).

Nas análises de identificação das proteínas transcritas por *Western-blot* não observamos alterações para *BAX* e *BCL2* nas células HL-60 tratadas com diferentes concentrações de CR-LAAO. Em HepG2 observamos a diminuição

na expressão proteica de BCL2 dependente da concentração. Entretanto não foi possível observar nenhuma variação na expressão proteica de BAX (Figura 15). Verificamos ainda, a ativação das caspases 3 e 8 clivadas, na linhagem HL-60, mas não foi possível observar nenhuma alteração da caspase 9 nessa linhagem. Não foi possível visualizar a marcação das caspases 3, 8 e 9 em nenhuma das concentrações testadas, para HepG2.

Nossos resultados sugerem que o processo apoptótico promovido pela CR-LAAO em células tumorais HL-60 ocorre via extrínseca, pois foi possível observar a expressão do gene *FAS* (gene pró-apoptótico da super-família de receptores de morte transmembrânicos) e a ativação da caspase 8 clivada. A pró-caspase 8, quando a via extrínseca é ativada, é autoclivada e transformada em caspase 8 ativa, sendo então liberada para o citoplasma, onde poderá agir diretamente na ativação da caspase 3 (fase executora do processo de apoptose), ou então agir na clivagem da molécula BID, a qual se dirige à mitocôndria, induzindo a liberação de citocromo c e SMAC (AMARANTE-MENDES; GREEN, 1999; ZIVNY et al., 2010).

Entretanto, a via de apoptose pela qual se dá o processo de morte das células HepG2 tratadas com CR-LAAO, não ficou definida. Não houve nenhuma alteração significativa na expressão dos genes envolvidos nesse processo. A diminuição na expressão da proteína BCL2, provavelmente está relacionada ao estresse oxidativo causado pela CR-LAAO, que mesmo não promovendo alterações na expressão gênica, induz a diminuição na expressão da proteína anti-apoptótica.

A ativação das caspases 3 e 9 foram observadas após 24 h de tratamento das linhagens PC12, HL-60, Jurkat e B16F10 com BatroxLAAO (Paiva et al., 2008), sugerindo ativação da via intrínseca da apoptose. Já ativação das caspases 3, 8 e 9 foram observadas a partir de 18 h de tratamento das linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl com BpirLAAO, sugerindo ativação das vias intrínseca e extrínseca da apoptose (BURIN et al., 2013). A LAAO isolada de *O. hannah*, também foi capaz de ativar as caspases efetoras 3 e 7, sugerindo a eficiência dessa classe de enzima na ativação do processo de apoptose celular (LI LEE et al., 2014).

Em algumas situações, os sinais de morte extrínsecos podem ativar a via intrínseca por proteólises da proteína BID mediada pela caspase-8 (via mitocondrial caspase-dependente). A BID pode promover a liberação de citocromo c para o citosol, promovendo a formação do apoptossomo, que medeia a ativação da caspase-9 (ativadora) que consequentemente ativa as caspases 3, 6 ou 7 (efetoras) (McHUGH; TURINA, 2006; ELMORE, 2007; TAYLOR et al., 2008). Não foi possível observar a alteração na ativação das caspases 9 (*Western-blot*) em HL-60, sugerindo que a CR-LAAO não tem a capacidade de ativar a via intrínseca através da via extrínseca.

O processo apoptótico desencadeado pela via extrínseca é controlado por proteínas da família BCL2, sendo reguladas por p53 (proteína supressora tumoral), que regula a expressão de outras proteínas da família BCL2 (anti ou pró-apoptóticas) que têm a função de promover (BAX) ou abortar o processo de apoptose (ELMORE, 2007).

No processo de carcinogênese a p53 é frequentemente inativada, geralmente por uma mutação do gene, promovendo um distúrbio na expressão das proteínas da família BCL2 (SUN, 2006). Provavelmente o que ocorre é uma super expressão de proteínas anti-apoptóticas e uma diminuição das pró-apoptóticas.

A expressão de BAX é importante e determinante para o índice de morte celular por apoptose e essa expressão revela o processo apoptótico pela via mitocondrial. Uma vez ativada, BAX é inserida na membrana mitocondrial e aumenta a permeabilidade da mesma, permitindo a liberação do citocromo c, ativação de uma variedade de caspases, clivagem de proteínas efetoras de morte e consequente morte celular por apoptose (ESKES et al., 1998; SCORRANO et al., 2003).

Um análogo de amonafida, derivado de naftalimida (M2-A), é um potente agente anticâncer. Ele tem capacidade de induzir atraso no ciclo celular na fase G2/M, inibe proliferação de células HeLa, HL-60 e MCF-7, bem como apresenta elevada expressão de BAX e baixa de BCL2, sugerindo que o aumento da razão BAX/BCL2 deve estar envolvida com o processo de apoptose induzido por M2-A em células tumorais (WANG et al., 2009).

Nosso grupo de trabalho, em 2011, verificou a expressão de genes pró-apoptóticos *FAS* e *BAX* em fígado e baço de camundongos inoculados com diferentes células tumorais e tratados com BatroxLao, mas não foi possível detectar a expressão do gene *BCL2* (ALVES-PAIVA, 2011). A LAAO de *Agkistrodon acutus* (ACTX-8) promoveu apoptose em células HeLa, mediada pela via mitocondrial, detectada com a verificação da translocação de BAX e BAD do citosol para a mitocôndria (ZANG et al., 2007).

Bai e Meng (2009) demonstraram que a expressão de p53 foi reforçada no pulmão de ratos após a exposição à SO₂, sugerindo que este composto induz estresse oxidativo e ativam genes que levam ao dano no DNA. Em estudos anteriores, esse grupo já havia verificado que o estresse oxidativo por SO₂, diferente do H₂O₂ produzido pela CR-LAAO, altera a expressão dos genes BAX e BCL2 (BAI; MENG, 2005 a; b).

Durante o estresse oxidativo, o H₂O₂ em baixas concentrações tem uma função de ativação e transcrição de alguns genes que poderiam prevenir a morte celular. Entretanto, um aumento na concentração de H₂O₂ induz um atraso no crescimento e morte celular por apoptose (SOUZA et al., 1999, DU; CLEMETSON, 2002). O mecanismo da LAAO na atividade apoptótica é ainda pouco conhecido, mas estudos sugerem que o H₂O₂ produzido durante a reação enzimática, a ativação das caspases ou ainda a interação da LAAO com algum receptor de membrana, são os principais responsáveis por essa atividade (DiPIETRANTONIO et al., 1999; SUHR; KIM, 1996; DU; CLEMETSON, 2002; ANDE et al., 2006).

Os experimentos realizados por citometria de fluxo para a análise do ciclo celular têm por finalidade localizar a atuação da CR-LAAO no processo de divisão celular. O DNA nuclear das células foi corado por um fluorocromo específico (PI), possibilitando sua quantificação e refletindo a posição da célula no ciclo celular.

As células PBMC tratadas com as menores concentrações (0,1 – 2,5 µg/mL) de CR-LAAO não sofreram alterações significativas na modulação da cinética do ciclo celular, quando comparadas ao controle negativo. No tratamento com as maiores concentrações (5 – 100 µg/mL) ocorreu um aumento na proporção de células na fase G2/M (Figura 16 A). Células não

tumorais, como os linfócitos, têm seu ciclo celular rigorosamente regulado, e sendo assim, é normal que a maior proporção celular esteja em G0/G1, e que só saiam dessa fase a partir de algum estímulo (fator de progressão) que promova sua proliferação (SCHAFER, 1998).

Nas células HepG2, as menores concentrações de CR-LAAO (0,1 – 2,5 µg/mL) induziram um atraso na fase G0/G1, passando de 50% (CN) para 70%. Nas maiores concentrações o atraso ocorreu na fase S do ciclo celular (Figura 16 B). O mesmo ocorreu com as células leucêmicas tratadas com 50 e 100 µg/mL de CR-LAAO, onde a porcentagem de células em S passou de 24% (CN), para 35%. As demais concentrações testadas (0,1 – 25 µg/mL) não promoveram diferenças significativas na modulação do ciclo celular das células HL-60 quando comparadas ao controle negativo (Figura 16 C).

Poucos estudos têm sido realizados com toxinas isoladas de peçonhas de serpentes a fim de analisar seus efeitos sobre a progressão do ciclo celular. A Cardiotoxina III (CTX III) isolada da peçonha de *N. naja atra* demonstrou elevada inibição da proliferação celular em células HepG2. A porcentagem de células apoptóticas foi associada, por citometria de fluxo, ao atraso em S do ciclo celular. A análise de PCR em tempo real e *Western blot* revelaram que as ciclinas D1, A e E, que estão envolvidas na apoptose e progressão do ciclo celular, estavam *down* reguladas. Além desses dados, a alteração na razão BCL2/BAX e indução de caspases 8 e 9 contribuem para afirmar a indução de apoptose de CTX III em HepG2 (CHEN et al., 2009).

Em 2011, Alves-Paiva e colaboradores avaliaram, também por citometria de fluxo, a modulação do ciclo celular e a indução de apoptose em células HL-60 frente ao tratamento com BatroxLAAO. Os resultados mostraram que o tratamento com essa toxina resultou num aumento dose-dependente na distribuição das células na fase G0/G1 com diminuição na fase S, ou seja, ocorreu um atraso em G0/G1. Os autores sugerem que o atraso pode impedir a iniciação da síntese de DNA, e consequentemente, a replicação das células tumorais. O mesmo foi observado pela LAAO isolada de *Agkistrodon acutus* (ACTX-6) que promoveu um aumento de 15% de células A549 em G0/G1, quando comparadas ao grupo sem tratamento (ZHANG; WU, 2008). Células U937 e K562 expressam o mesmo perfil de atraso em G1 e diminuição de

células na fase G2/M quando tratadas com drCT-I isolada da víbora indiana *Daboia russelli russelli* (GOMES et al., 2007).

Outro estudo demonstra que a fração SVT (*snake venom toxin*), isolada de *Vipera labetina turanica*, tem o perfil de suspender o ciclo na fase G0/G1 de células tumorais prostáticas PC-3 de forma dose-dependente e com diminuição de células nas fases S e G2/M (SON et al., 2007).

Sabe-se que ao longo do ciclo celular há vários *checkpoints*, ou seja, mecanismos de sinalização que detectam danos no DNA. Algumas das proteínas (CKI's e CHK) que controlam essas paradas promovem atrasos nas fases do ciclo celular, e a progressão só é retomada quando o dano é reparado. As células com danos irreparáveis entram em apoptose (EASTMAN, 2004; BRANZEI; FOIANI, 2008). Durante a progressão do ciclo celular, o gene p53 supressor de tumores (CKI), promove o atraso em G1 para que o DNA danificado possa ser reparado ou entre em apoptose. A maioria dos tumores apresenta defeitos no gene p53, por isso o atraso em G1 pode falhar, e as células acumulam-se nas fases S e G2 (EASTMAN, 2004).

Com base na literatura pode-se sugerir que as toxinas animais atuam em diferentes fases do ciclo celular de linhagens celulares tumorais promovendo atrasos em qualquer fase do ciclo, seja ela G0/G1, S e G2/M.

Nossos dados mostram que a CR-LAAO interfere na cinética do ciclo celular de maneira mais acentuada nas células tumorais do que nas células PBMC. Esses resultados, somados aos dados de indução de apoptose/necrose e a avaliação da ativação das vias envolvidas nesse processo, revelam que a CR-LAAO apresenta um excelente potencial antitumoral.

5.2. Potencial microbicida da CR-LAAO

As infecções associadas aos cuidados de saúde são as principais causas de mortalidade e morbidade no mundo inteiro, podendo ser causadas por muitos microorganismos, tais como bactérias, fungos e vírus (PITTET et al., 2008; OKUBO et al., 2012). No entanto, os patógenos envolvidos em processos infecciosos consistem principalmente de bactérias constitutivas da microbiota humana normal. Estas bactérias são inócuas em indivíduos saudáveis, mas são capazes de causar infecções graves e perigosas,

principalmente em indivíduos imunodeprimidos (SALAMATI et al., 2006). Além disso, a prevalência de bactérias resistentes aos antibióticos comuns tem aumentado nos últimos anos, enfatizando a necessidade de desenvolver novas alternativas para o controle destes patógenos.

As LAAOs são toxinas que exibem uma vasta gama de atividades farmacológicas, incluindo o efeito bactericida. Skarnes (1970) foi o primeiro pesquisador a relatar a atividade bactericida de uma LAAO isolada de peçonha da serpente *Crotalus adamanteus*. Da mesma forma, muitas outras SV-LAAOs demonstraram ter a mesma atividade, como as LAAOs de *C. durissus cascavela*, *B. pirajai*, *B. moojeni*, *Agkistrodon halys*, *Vipera lebetina*, *B. pauloensis* e *Naja naja oxiana* (ZHANG et al., 2004; TONISMAGI et al., 2006; TOYAMA et al., 2006; IZIDORO et al., 2006; SAMUEL et al., 2008 RODRIGUES et al., 2009).

LAAOs de diversas outras origens também têm mostrado potencial bactericida, como a LAAO isolada do caramujo gigante africano e de alguns animais marinhos. A LAAO isolada do muco epidérmico de *Platichthys stellatus* é altamente bactericida contra diferentes cepas de *Staphylococcus* (EHARA, et al., 2002; KASAI et al., 2010).

A CR-LAAO teve seu efeito bactericida avaliado em duas cepas bacterianas, uma gram-positiva (*S. aureus*) e uma gram-negativa (*E. coli*). Foi possível observar que 24 µg/mL de CR-LAAO pouco inibiu o crescimento de *S. aureus* e *E. coli*, nos diferentes tempos de incubação (30 e 60 min) testados. Já a concentração de 48 µg/mL da toxina foi capaz de inibir o crescimento de ambas as cepas testadas em aproximadamente 50% (Figura 17 A e B). Embora ambas as cepas não tenham respondido muito bem ao tratamento sem pré-incubação, é possível observar que a bactéria gram-negativa parece ser mais resistente aos efeitos imediatos da CR-LAAO. Observamos ainda que, após 24 horas de incubação, a CR-LAAO não inibe o crescimento de nenhuma das cepas testadas. Isso provavelmente ocorreu, porque a toxina perdeu sua atividade catalítica após um longo período de incubação a 37°C.

Nossos resultados corroboram com os dados apresentados para as LAAOs de *B. atrox* e *B. alternatus*, que também inibiram o crescimento de ambas as cepas nas mesmas concentrações (24 e 48 µg/mL). A BatroxLAAO

mostrou-se mais eficiente contra o crescimento de *S. aureus*, inibindo 40% do crescimento após 30 minutos de incubação, enquanto que para *E.coli* observou-se apenas 16% de inibição (STÁBELI et al., 2004; ALVES-PAIVA et al., 2011).

Em nossos estudos, determinamos também a CIM e a CBM para a CR-LAAO, tanto para a cepa gram-negativa padrão, quanto para cepa gram-positiva padrão, bem como para duas cepas resistentes de cada uma das cepas padrão. A CIM é definida pela menor concentração de enzima ou antibióticos que inibe o crescimento microbiano visível *in vitro* e cuja visualização é possível (ANDREWS, 2001). Para aprimorar esta técnica, foi desenvolvido o ensaio em microplaca, que pode ter a verificação da turvação dos poços com auxílio de alguns corantes, entre eles a resazurina, que tem coloração azul na ausência e rosa na presença de células vivas (NCCLS, 2003b; LOW et al., 2006). Já a CBM da enzima ou antibióticos é determinada por meio de subcultivos das microplacas em placas de ágar Müller Hinton (MH), avaliando a presença ou ausência de crescimento microbiano. A CBM é definida como a menor concentração que produz a morte de 99,9% das células bacterianas (KONEMAN et al., 2001).

Observamos que o CIM e o CBM obtidos para a CR-LAAO (Tabela 2) em diferentes tempos de incubação (6 h e 24 h), para as cepas *S. aureus* padrão, DT e 56 foram sempre menores do que os valores obtidos para os antibióticos usuais (ampicilina e tetraciclina). É possível visualizar que os valores do CIM para as cepas de *S. aureus* são bem menores (0,2; 0,78; 0,39 µg/mL) que o valor encontrado para *E. coli* padrão, IAL e JF239 (7,8; 31,25; 125 µg/mL).

Nossos resultados revelaram ainda, que em todas as cepas de *E. coli* testadas os valores obtidos para as CIMs e CBMs foram menores para CR-LAAO do que para o antibiótico ampicilina, entretanto, as cepas resistentes IAL 45 e JF239 mostraram-se mais sensíveis à ação do antibiótico tetraciclina do que à CR-LAAO, sugerindo então, que essa enzima não é uma boa opção para o tratamento das cepas de *E.coli* resistentes testadas, uma vez que a tetraciclina apresentou CIMs e CBMs menores do que as determinadas para a CR-LAAO.

Esses dados corroboram com os dados obtidos para a LAAO de *Ophiophagus Hannah* (King cobra), que demonstrou ser um bom agente bactericida, inibindo o crescimento das seguintes cepas bacterianas: *S. aureus*, *S. epidermidis* (gram-positivas), *E. coli*, *Klebsiella pneumonia* e *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativas). Assim como a CR-LAAO, a LAAO em questão mostrou-se mais eficaz contra as cepas gram-positivas. A CIM para *S. aureus* foi de 0,78 µg/mL e para *E.coli* foi de 100 µg/mL. As CIMs determinadas para esta LAAO foram comparadas com as CIMs de alguns antibióticos comumente utilizados para combater esses microorganismos. Os resultados mostram que a CIM estimada para a LAAO contra as bactérias gram-positivas é compatível com as CIMs dos antibióticos testados, exceto para penicilina que é muito mais potente do que a LAAO de King cobra. Para as gram-negativas, a LAAO mostrou-se menos potente que os antibióticos testados. Outro parâmetro analisado nesse estudo foi a interferência dos diferentes tempos de incubação da proteína junto com o inóculo bacteriano a 37°C. Observou-se que após 5 horas de incubação, a atividade bactericida chegou à saturação, deixando de inibir o crescimento bacteriano (LEE et al., 2011).

Nossos resultados revelam que a CR-LAAO parece ser mais eficaz do que a LAAO de King cobra, pois exibiu CIMs muito menores do que as CIMs determinadas para os antibióticos testados, e também parece não ter atingido saturação bactericida em 6 h, pois ainda foi possível determinar a CIM após 24 h de incubação.

A CdcLAAO (LAAO isolada de *Crotalus durissus cumanensis*) inibiu de um modo dose-dependente o crescimento de *S. aureus* e *Acinetobacter baumannii*. Entretanto, o efeito inibitório foi mais significativo em *S. aureus*, com CIM de 8 µg/mL e CBM de 16 µg/mL, enquanto que para *A. baumannii* esses valores dobram (CIM de 16 µg/mL e CBM de 32 µg/mL). Assim como para a CR-LAAO, a CdcLAAO não teve o mesmo efeito contra a cepa *E. coli* (não mostrou efeito inibitório nas concentrações testadas 2-128 µg/mL) (VARGAS et al., 2013).

Em um estudo mais recente a LAAO isolada de *B. schlegelii*, também apresentou boa atividade bactericida contra bactérias gram-positivas *S. aureus*

e *A. baumannii*, entretanto não foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli* (MUÑOZ et al., 2014).

Os antibióticos ou as toxinas de serpentes interagem com os microorganismos, matando-os (ação bactericida) ou inibindo seu metabolismo e/ou sua reprodução (ação bacteriostática), permitindo ao sistema imunológico combatê-los com maior eficácia. Nem sempre esses agentes são bactericidas, eles podem ser apenas bacteriostáticos, isso significa que quando os microorganismos voltam a um meio favorável ao seu crescimento, são capazes de se desenvolverem novamente (PELCZAR et al., 1999). Quando subcultivamos as bactérias das placas de 96 poços em ágar MH, estamos favorecendo o desenvolvimento desses organismos. Por isso muitas vezes os valores de CBMs são maiores que os de CIMs.

Nos últimos anos, o desenvolvimento de agentes antimicrobianos eficazes e seguros para lidar com infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico. Entretanto, pela própria evolução dos organismos e, com auxílio do uso indiscriminado dos antibióticos, muitas espécies de microorganismos foram selecionadas, apresentando resistência aos agentes antimicrobianos utilizados. Na tentativa de contornar tal situação e ampliar o arsenal de compostos ativos contra microorganismos patogênicos, o estudo de produtos naturais tornou-se crescente no cenário científico. A CR-LAAO parece ser uma opção eficaz contra esses microorganismos resistentes, principalmente para os gram-positivos. As cepas resistentes de *S. aureus* testadas (resistente a oxacilina e induzida a clindamicina) apresentaram CIMs (0,39 e 0,78 µg/mL em 6 h e 1,6 µg/mL para ambas as cepas após 24 h de incubação) muito menores que os antibióticos testados.

O mecanismo de ação das LAAOs na inibição do crescimento bacteriano tem sido avaliado em alguns trabalhos científicos. Um dos mecanismos propostos é a geração de H₂O₂ pela reação oxidativa da enzima, pois quando administrada junto com a catalase, o efeito é minimizado ou mesmo abolido (DU; CLEMETSON, 2002).

Estudos demonstraram que a LAAO de *C. durissus cascavella* induz a ruptura da membrana bacteriana. Isso pode ter acontecido devido à grande quantidade de peróxido de hidrogênio gerado pela LAAO (TOYAMA et al.,

2006). Estudos de imunoquímica realizados com a LAAO de caramujo (*Achatina fulica ferussac*) mostram que essa toxina se liga à membrana da célula bacteriana, de forma mais eficiente às membranas gram-positivas. Os autores sugeriram que a alta concentração de H_2O_2 localizada próxima ao local de ligação seja altamente potente para desarranjar a membrana celular das bactérias (EHARA et al., 2002).

A fim de desvendar o mecanismo de ação da CR-LAAO sobre esses microorganismos, avaliamos os danos causados por essa enzima na parede celular das bactérias através de análises de microscopia eletrônica de transmissão.

A CR-LAAO foi capaz de promover diferentes desarranjos nas paredes de ambas às bactérias. Mas, uma diferença entre elas ficou muito evidente. Nas paredes das *S. aureus*, em sua maioria, foi possível visualizar a destruição total da membrana mais externa da parede, enquanto que nas paredes das *E. coli* essa membrana sofreu apenas um ondulamento (Figuras 18 e 19). Provavelmente, essas modificações nas paredes bacterianas foram provocadas pela inibição da síntese de peptídeoglicano. Nesse caso o peróxido de hidrogênio gerado pela CR-LAAO pode ter agido como os antibióticos β -lactâmicos, que possuem como agente antibiótico o núcleo β -lactâmico presente em sua estrutura molecular e atua inibindo a síntese de peptídeoglicano (NICKLAS, 1998).

Essas diferenças nos tipos de alterações nas paredes, também podem estar relacionadas com a variação no posicionamento da camada peptídeoglicano nas paredes dos procariotos. Em bactérias gram-negativas (*E. coli*) o peptídeoglicano situa-se entre a membrana interna e externa da bactéria, enquanto que nas gram-positivas (*S. aureus*), não existe membrana exterior, cumprindo o peptídeoglicano esta função (SEBASTIAN et al., 2005). Neste caso podemos inferir que a camada de peptidioglicano nas cepas gram-positivas está mais susceptível à ação do H_2O_2 , justamente por estarem mais expostas do que a camada das paredes das cepas gram-negativas.

As outras alterações como a formação de estruturas *mesosome-like*, formação de poros, estrangulamento citoplasmático irregular e formação de poros com extravazamento celular, já foram visualizadas em várias cepas

bacterianas tratadas com enzimas isoladas de diferentes serpentes, como as PLA₂s de *Bothrops asper* e *Crotalus adamanteus* (PÁRAMO et al., 1998; SAMY et al., 2014), demonstrando que esse desmantelamento da parede celular é uma característica comum, causado por enzimas de serpentes.

Outro parâmetro analisado foi a mensuração da espessura das paredes celulares das bactérias tratadas com CR-LAAO (Figura 20). Observamos que em ambas as cepas houve um espessamento das paredes das bactérias que se mantiveram intactas ao tratamento. Em 2008, Palazzo e colaboradores observaram esse mecanismo de resistência em diferentes espécies de *Staphylococcus* tratadas com o antibiótico comercial, vancomicina. Isso provavelmente é uma estratégia adaptativa desses microorganismos, que lhes conferem resistência a diferentes antimicrobianos.

A ação das enzimas L-aminoácido oxidase em processos com fungos já foram descritas em alguns trabalhos. Yang e colaboradores (2005) relataram a atividade de uma LAAO de anêmona marinha em *Candida krusei* e *Saccharomyces cerevisiae*, apresentando CIMs de 62 e 15 µg/mL, respectivamente. Estudos com a BatroxLAAO mostraram que essa toxina na concentração de 37,5 µg/mL foi capaz de inibir 100% do crescimento de *C. albicans* (ALVES-PAIVA et al., 2011).

A LAAO de *C. rhodostoma*, assim como as LAAOs citadas inicialmente, também se mostrou um bom agente contra a levedura *C. albicans* após 6h de pré-incubação (Figura 21 B), sendo que a toxina foi capaz de inibir 40% do crescimento da *C. albicans* nas concentrações de 25 e 50 µg/mL e ~ 80% na concentração de 100 µg/mL. Sem prévia incubação (Figura 21 A) e após 24h de pré-incubação (Figura 21 C) a enzima não foi capaz de inibir significativamente o crescimento da levedura em nenhuma das concentrações testadas. Esses resultados se devem, provavelmente, à instabilidade enzimática das SV-LAAOs frente a mudanças de temperatura. Embora a CR-LAAO seja uma das toxinas mais estáveis dessa família, provavelmente perdeu sua atividade catalítica após passar por pré-incubação a 37°C por 24h e depois de plaqueada por mais 48h de incubação.

Em 2008, Ande e colaboradores avaliaram a ação da CR-LAAO na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e observaram que 1,2 µM da toxina foram

capazes de induzir a morte da levedura por apoptose, enquanto que na presença de catalase o mesmo não ocorreu, sugerindo que a atividade fungicida dessa classe de enzima esteja relacionada, mais uma vez, com a produção do peróxido de hidrogênio produzido durante seu ciclo catalítico.

Os resultados obtidos sobre as atividades bactericidas e fungicidas da CR-LAAO, deixam claro seu potencial biotecnológico como modelo para o desenvolvimento de novos e eficientes antimicrobianos.

5.3. Potencial antiparasitário da CR-LAAO

Os estudos de toxinas animais em atividades antiparasitárias ainda são bastante limitados, principalmente em relação aos protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* sp.

A CR-LAAO apresentou-se potencialmente ativa contra o *T. cruzi*, na forma tripomastigota do parasita (Figura 23). Embora a IC₅₀ relativa determinada (196,8 µg/mL) tenha sido muito alta, o efeito dose-dependente obtido foi bem homogêneo.

A catalase utilizada no tratamento junto com a CR-LAAO, foi capaz de inibir proporcionalmente a atividade da enzima. No tratamento com 32 µg/mL de CR-LAAO na presença de 150 U/mL de catalase, a atividade tripanomicida da enzima foi reduzida em 70%, reforçando mais uma vez o envolvimento do peróxido de hidrogênio nos efeitos biológicos das SV-LAAOs.

Na literatura são encontrados poucos trabalhos com o parasita *T. cruzi* e SV-LAAOs. As LAAOs de *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. atrox* induziram a morte do parasita, assim como a CR-LAAO, de forma dose-dependente, sendo que este efeito foi inibido pela catalase (FRANÇA et al., 2007; ALVES-PAIVA et al., 2011).

A ação leishmanicida da CR-LAAO (Figura 24), também ocorreu de maneira dose-dependente, sendo a espécie *L. infantum chagasi* (IC₅₀ = 16,66 µg/mL) mais susceptível à ação da CR-LAAO do que a *L. brasiliensis* (IC₅₀ = 24,47 µg/mL). Na presença de catalase o efeito da CR-LAAO foi totalmente abolido para ambas as cepas testadas.

A LAAO-I de *B. pirajai* foi capaz de induzir morte de maneira dose-dependente em diferentes espécies de *Leishmania*, sendo a *L. brasiliensis* a

mais susceptível aos efeitos tóxicos dessa proteína. Na presença de catalase, a espécie *L. donovani* mostrou uma sobrevivência de 100%, sugerindo novamente o envolvimento do H_2O_2 no mecanismo de morte desses microrganismos (IZIDORO et al., 2006). A Bp-LAAO isolada de *B. pauloensis* também induziu mortalidade dose-dependente em diferentes espécies de *Leishmania*, sendo a espécie *L. brasiliensis* a mais sensível aos efeitos da toxina. A proteína apresentou IC_{50} de 1,48 $\mu g/mL$ para *L. amazonensis*, 1,59 $\mu g/mL$ para *L. donovani*, 1,03 $\mu g/mL$ para *L. brasiliensis* e 1,29 $\mu g/mL$ para *L. major*. Na presença de catalase, *L. major* apresentou ~ 70% de sobrevivência celular (RODRIGUES et al., 2009).

A LAAO de *B. jararaca*, foi capaz de induzir a morte da espécie *L. amazonensis* (0,8 mg/mL), sendo esse efeito revertido pela presença da catalase (CISCOTO et al., 2009)

A BatroxLAAO também mostrou-se eficiente contra diferentes espécies de *Leishmania*, sendo as espécies *L. donovani* e *L. major* as mais susceptíveis aos efeitos tóxicos da enzima. A proteína apresentou IC_{50} de 4,3 $\mu g/mL$ para *L. donovani*, 23,34 $\mu g/mL$ para *L. brasiliensis* e 4,5 $\mu g/mL$ para *L. major*. Na presença de catalase, o efeito da BatroxLAAO foi praticamente abolido (ALVES-PAIVA et al., 2011). Uma LAAO isolada de *L. muta* (LmLAAO), teve seu efeito leishmanicida testado, apresentando IC_{50} de 2,2 $\mu g/mL$ para *L. brasiliensis* (BREGGE-SILVA et al., 2012).

Neste contexto nossos resultados são de grande importância, pois está auxiliando no mapeamento dos efeitos dessa classe de toxinas sobre os parasitas causadores de doenças negligenciadas. A CR-LAAO com certeza poderá servir de modelo para o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes contra essas doenças.

5.4. Potencial inflamatório da CR-LAAO

O envenenamento ofídico é caracterizado por um estado inflamatório generalizado. Após o acidente, uma série de cascatas imunológicas complexas são desencadeadas, garantindo uma resposta de proteção contra as peçonhas (BARROS et al., 1998). Embora a ativação do sistema imunológico durante o envenenamento é geralmente de proteção, o choque séptico desenvolve-se em

uma série de pacientes como uma consequência da resposta imune excessiva ou mal regulada do organismo (PETRICEVICH, 2004). Esta reação desequilibrada é causada devido à liberação de mediadores endógenos que incluem citocinas, mediadores lipídicos e óxido nítrico (CARREGARI et al., 2013).

O processo inflamatório promovido pela mordida das serpentes se manifesta principalmente no local da mordida, e os principais componentes envolvidos são as PLA₂s (TEIXEIRA et al., 2003; ZULIANI et al., 2005) e as metaloproteases (FERNANDES et al., 2006 ; MOURA -DA- SILVA et al., 2007). Entretanto, outras proteínas já foram descritas com atividade pró-inflamatória, como as duas serinoproteases isoladas de *B. pirajai* (BpirSP27 e BpirSP41) e a LAAO de *Bungarus fasciatus* (BF-LAAO) (WEI et al., 2009; MENALDO et al., 2013).

Para avaliarmos o caráter inflamatório da CR-LAAO, analisamos a cinética de recrutamento de células pró-inflamatórias para a cavidade peritoneal de camundongos Balb/c, inicialmente, após 4 horas de tratamento com diferentes concentrações da enzima. Observamos aumentos significativos ($p > 0,05$) na quantidade de leucócitos (número total de células) apenas após a administração de 25 ou 50 µg/mL de CR-LAAO (Figura 25 A). Observamos ainda, uma infiltração proeminente de neutrófilos nesses lavados peritoneais (Figura 25 B), mas nenhuma alteração significativa foi visualizada no número de células mononucleares (Figura 25 C).

A fim de avaliar o caráter (agudo ou crônico) desse potencial inflamatório, administramos via i.p. 25 µg/mL de CR-LAAO em camundongos e avaliamos esse efeito em diferentes intervalos de tempo (4; 24; 48 e 96 h). Novamente observamos a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal apenas após 4h de tratamento, com infiltração proeminente de neutrófilos (Figura 26).

Os leucócitos são elementos-chave nas respostas inflamatórias devido às suas atividades fagocitárias e secretórias, migrando ao local afetado em resposta a estímulos inflamatórios variados. Na resposta inflamatória aguda, os neutrófilos migram rapidamente ao local lesado, sendo os principais

responsáveis pela fagocitose inicial dos agentes infecciosos e liberação de citocinas (TEIXEIRA et al., 2009).

A resposta de fase aguda, também pode ser caracterizada por um aumento nos níveis de proteína totais, promovido pelo processo de leucocitose (PETRICEVICH et al., 2010). Em nenhum dos tempos de tratamento foi possível observar variações nos níveis proteicos induzidos pela CR-LAAO (Figura 30), sendo assim podemos sugerir que, o número de leucócitos recrutados para o peritoneo dos animais tratados, não foram suficientes para modularem a alteração dos níveis protéicos.

Em 2013, Zoccal e colaboradores observaram resultados semelhantes aos nossos, em lavados peritoneais de camundongos tratados com toxinas isoladas de *Tityus serrulatus* (Ts2 e Ts6) após 4 horas, entretanto, diferentemente dos resultados obtidos com a CR-LAAO, foi observado o aumento de leucócitos em todos os tempos de tratamentos analisados (4, 24, 48 e 96h), com consequente aumento dos níveis proteicos depois de 24, 48 e 96 h.

A maioria dos estudos envolvendo o processo inflamatório e peçonhas de serpentes foram realizados com a peçonha bruta e as PLA₂s (GUTIÉRREZ et al., 1986; FLORES et al., 1993; LANDUCCI et al., 2000; ZYCHAR et al., 2010; MOREIRA et al., 2012; CARREGARI et al., 2013). Em 2009, Wei e colaboradores, avaliaram o efeito inflamatório da LAAO isolada de *B. fasciatus* (BF-LAAO), após 2, 6 e 16 horas de tratamento. Eles observaram que o aumento no número de leucócitos, células mononucleares e mastócitos só foi significativo após 16 horas de tratamento, entretanto um aumento no número de neutrófilos foi visualizado após 6 e 16 horas. Assim como a CR-LAAO, a BF-LAAO não foi capaz de induzir aumento de eosinófilos em nenhuma das concentrações testadas.

O processo inflamatório envolve uma variedade de citocinas que são liberadas de acordo com o agente causador, a duração do estímulo e do equilíbrio entre as respostas pró e antiinflamatórias (PETRICEVICH et al., 2010). Esses mediadores são produzidos e/ou liberados por células endoteliais, como os neutrófilos (liberação de interleucinas), e células residentes como os mastócitos (liberação de TNF- α) (TERLIKOWSKI, 2001).

Com o objetivo de avaliar quais são os principais mediadores solúveis envolvidos no processo inflamatório promovido pela CR-LAAO, foi determinada a concentração das seguintes citocinas: TNF- α ; IL-6, IL-4, IL-1 β e IL-10, presentes no sobrenadante do lavado peritoneal de camundongos tratados com 25 μ g/mL da enzima após diferentes intervalos de tratamento. Observamos que houve a liberação de IL-6 e IL-1 β (citocinas pró-inflamatórias) apenas após 4 h de tratamento, entretanto não observamos a liberação de TNF- α (citocina pró-inflamatória), nem de IL-10 e IL-4 (citocinas anti-inflamatórias) em nenhum dos tempos avaliados.

A IL-6 é um importante mediador inflamatório que promove a leucocitose (aumento na migração de leucócitos), caracterizada por uma rápida neutrofilia (aumento de neutrófilos) (SUWA et al., 2000) exatamente o que foi observado com os dados obtidos para a migração celular induzida pela CR-LAAO após 4 horas de tratamento. Já o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) quase sempre é liberado por células residentes, como por exemplo, os mastócitos, que não migraram no tratamento com a enzima em nenhum dos tempos analisados.

A IL-1 é uma citocina pró-inflamatória envolvida na resposta imune contra infecções e agressões. Ela é produzida principalmente por monócitos e macrófagos (BIRD et al., 2002). Ela influencia em diversas funções biológicas: aumenta a quimiotaxia de linfócitos T e B; estimula a síntese de tromboxanos por neutrófilos e macrófagos; a liberação de histamina por basófilos e degranulação dos eosinófilos; citotoxicidade para células tumorais; estimula a síntese de Interferon β 1 e β 2; age como um pirógeno endógeno; induz a síntese de proteínas de fase aguda (ex. proteína C reativa e fibrinogênio) em hepatócitos (ENDERS et al., 1987); ativa linfócitos T (MIZEL, 1982) e aumenta a síntese de anticorpos pelas células B (FALKOFF et al., 1983).

IL-1 α e β são dois agonistas funcionais da família da IL-1. Acredita-se que elas induzem respostas celulares idênticas, mas há relatos de diferenças nas suas atividades. Por exemplo, a produção de anticorpos dependente de célula T é mediada pela IL-1 β , mas não pela IL-1 α (NAKAE et al., 2001).

A IL-4 é uma citocina produzida por células T tipo 2 (Th2), basófilos, mastócitos e eosinófilos ativados. Age como anti-inflamatório, bloqueando a síntese de IL-1, TNF- α , IL-6 e proteína inflamatória de macrófagos. A IL-4

participa na regulação do sistema imune em vários níveis. Entre outras funções, promove a diferenciação de linfócitos Th2, a proliferação e diferenciação de linfócitos B e é um potente inibidor da apoptose (MARUYAMA et al., 2014).

A IL-10 é um inibidor de macrófagos ativados (principalmente para inibir a produção de IL-12 e TNF), apresentando um importante papel no controle homeostático da resposta inflamatória. Embora 4h de tratamento tenha sido o suficiente para o recrutamento de neutrófilos para o local de interesse, o número total dessas células não foi o bastante para estimular a produção de citocinas antiinflamatórias (IL-10). Esses resultados divergem dos dados obtidos para a peçonha de escorpião *Tityus serrulatus*, que induziu tanto produção de citocinas pró quanto antiinflamatórias (ZOCCAL et al., 2011; 2013), sugerindo que a peçonha desse artrópode contenha compostos com atividades contraditórias e com um potencial inflamatório muito maior do que o da CR-LAAO.

Wei e colaboradores (2007) induziram a liberação de citocinas em monócitos e células T (humanos) com a LAAO de *Agkistrodon blomhoffi ussurensis* (ABU-LAO). ABU-LAO, na concentração de 10 µg/mL, promove a produção de IL-6 e IL-12 em monócitos humanos após 16h de incubação, e a liberação de IL-2 e IL-6 em células T.

Embora as citocinas participem da geração e manutenção da imunidade inata e adaptativa, o mecanismo pelo qual as mesmas atuam pode ser convergente à produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, sendo o óxido nítrico (NO) o mais importante (SÁ-NUNES et al., 2004; HADDAD, 2007).

O óxido nítrico (NO) está normalmente presente tanto no coração como na parede dos vasos, e apresenta papel fisiológico, sendo gerado pela enzima, denominada NO sintetase constitutiva. Após exposição à endotoxina lipopolissacáride ou ao TNF, em nível de células endoteliais e musculatura lisa da parede vascular, ocorre indução da isoforma cálcio-independente NO sintetase, denominada NO sintetase induzida. Esta indução leva a grande produção de NO, contribuindo assim para a vasodilatação e resistência a vasoconstrictores característico da resposta inflamatória. A ausência de NO₂ (subproduto do NO) no sobrenadante dos lavados peritoneais dos

camundongos tratados com CR-LAAO, provavelmente, deve-se ao fato dessa enzima não ter produzido TNF- α (HADDAD, 2007; RITTNER et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2009; ZOCCAL et al., 2011; 2013).

Recentemente, um grupo de pesquisa avaliou os efeitos *in vitro* da LAAO de *Calloselasma rhodostoma*, em neutrófilos humanos. Eles observaram que a LAAO foi capaz de estimular os neutrófilos a liberarem mediadores pró-inflamatórios, tais como a IL-8 e TNF- α (PONTES et al., 2014).

Durante a inflamação, os mediadores lipídicos, tais como PGs e LTs podem ser liberados em adição às citocinas, por diferentes células ativadas como neutrófilos, mastócitos e macrófagos. Estes mediadores são produzidos após distúrbios na membrana que levam a um aumento do cálcio intracelular (LEWIS et al., 1990; FUNK, 2001).

A CR-LAAO foi capaz de induzir a produção de PGE₂ e LTB₄, após 4 horas de tratamento com 25 μ g/mL (Figura 28). Essa liberação provavelmente está relacionada com a ativação de células, como os neutrófilos, que migraram para a cavidade peritoneal dos animais tratados, bem como a ação das citocinas pró-inflamatórias liberadas.

Nosso estudo sobre o potencial inflamatório revelou a cinética de migração celular induzida pela CR-LAAO e nos permitiu caracterizar uma reação inflamatória local, com o aumento gradual do número de neutrófilos, citocinas inflamatórias (exclusivamente na fase inicial da resposta) e mediadores lipídicos.

Há uma correlação direta entre resposta imunológica e inflamação. Uma atividade inflamatória de curta duração geralmente traz benefícios para o organismo hospedeiro na presença de agentes agressores (DE VISSER et al., 2006), pois as células ativadas do sistema imune podem ser coadjuvantes no combate a infecções causadas por microorganismo ou mesmo a células tumorais.

Dessa forma, a resposta inflamatória aguda e de curta duração induzida pela CR-LAAO é aceitável, considerando que o nosso real interesse é que essa proteína sirva como modelo para o desenvolvimento de novos fármacos microbicida, antiparasitário e antitumoral, e para isso é imprescindível que ocorra o mínimo de efeitos colaterais possíveis.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos revelaram importantes características funcionais da L-aminoácido oxidase isolada da peçonha de *Calloselasma rhodostoma*.

A CR-LAAO mostrou ação anti-tumoral *in vitro* eficiente, com alta citotoxicidade em células tumorais HepG2 e HL-60, e baixa citotoxicidade em células normais (PBMC). Além disso, a CR-LAAO comportou-se como um indutor de apoptose para as diferentes linhagens testadas.

O processo de morte celular induzido pela enzima em células HL-60 se deu pela ativação da via extrínseca da apoptose, confirmado pela expressão do gene *FAS* e da ativação das caspases 8 e 3. Entretanto nenhuma alteração foi percebida na expressão de genes envolvidos na apoptose para a linhagem HepG2, o que inviabilizou a determinação da ativação da(s) via(s) de apoptose para essa linhagem.

Não foi possível observar alterações significativas na modulação do ciclo celular nas células PBMC, havendo apenas um pequeno atraso na fase G0/G1 na concentração de 100 µg/mL. Em HepG2 detectamos que nas menores concentrações (0,1 – 2,5 µg/mL) o atraso, também, ocorreu em G0/G1, mas nas demais concentrações testadas o atraso se deu na fase S. Em HL-60, observamos mudanças na progressão do ciclo celular, apenas nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, que induziram atraso em S.

A CR-LAAO comportou-se como um excelente agente bactericida, sendo capaz de inibir o crescimento de bactérias gram-positivas (*S. aureus*) e negativas (*E. coli*), entretanto apresentou uma maior especificidade para bactérias gram-positivas, sendo eficiente inclusive contra as cepas resistentes aos antibióticos comerciais testados (*S. aureus* a oxaciclina e clindamicina). Foi possível observar que a CR-LAAO interage com esses microorganismos promovendo um desmantelamento de suas paredes celulares.

A L-aminoácido oxidase de *C. rhodostoma* apresentou ainda atividade antifúngica contra a levedura *C. albicans*, sendo que 100 µg/mL da toxina, após 6 h de incubação, foi capaz de inibir o crescimento do microorganismo em 80%. Sem prévia incubação e após 24 h de incubação, a CR-LAAO perdeu atividade e as leveduras voltaram a crescer.

A CR-LAAO apresentou ação leishmanicida contra as espécies *L. brasiliensis* e *L. i. chagasi*, sendo que esta última foi mais sensível à ação da enzima. Formas tripomastigotas do protozoário *T. cruzi*, tiveram seu crescimento inibido de maneira dependente da concentração de CR-LAAO.

As atividades antitumoral e antiparasitária foram testadas na presença da catalase, sendo inibidas ou totalmente extintas, o que sugere o envolvimento do peróxido de hidrogênio na atividade farmacológica da CR-LAAO.

A CR-LAAO apresentou um potencial inflamatório local e inicial (agudo) *in vivo*, sendo capaz de recrutar células inflamatórias, produzir citocinas (IL-6 e IL-1 β) e mediadores lipídicos (LTB₄ e PGE₂), processo que pode auxiliar no combate à microorganismos, ou mesmo potencializar o efeito antitumoral da CR-LAAO.

Com base nos resultados obtidos, podemos dizer que a CR-LAAO é uma molécula multifuncional que poderá servir como modelo para o desenvolvimento de novos fármacos, com possíveis aplicações no tratamento de muitas doenças como o câncer, infecções bacterianas e parasitárias ou mesmo como coadjuvante de fármacos não tão eficazes que já estão no mercado.

Referências

REFERÊNCIAS

- AHN, M. Y.; LEE, B. M.; KIM, Y. S. Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of King Cobra (*Ophiophagus Hannah*). **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 29, p. 911-919, 1997.
- AKELERE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **Herbalgram**, v. 28, p. 13-19, 1993.
- ALI, A.; HAMID, F.; ABBASI, A.; ZAIDI, Z. H.; SHEHNAZ, D.. Pharmacological effects of the leaf-nosed viper snake (*Eristocophis macmahoni*) venom and its HPLC fractions. **Toxicon**, vol. 37, p. 1095–1107, 1999.
- ALI, S. A.; STOEVA, S.; ABBASI, A.; ALAM, J. M.; KAYED, R.; FAIGLE, M.; NEUMEISTER, B.; VOELTER, W. Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 384, p. 216–226, 2000.
- ALVES, R. M.; ANTONUCCI, G. A.; PAIVA, H. H.; CINTRA, A. C. O.; FRANCO, J. J.; MENDONÇA-FRANQUEIRO, E. P.; DORTA, D. J.; GIGLIO, J. R.; ROSA, J. C.; FULY, A. L.; DIAS-BARUFFI, M.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol. A.**, v. 151, p. 542–550, 2008.
- ALVES-PAIVA, R. M.; De FREITAS FIGUEIREDO, R.; ANTONUCCI, G. A.; PAIVA, H. H.; DE LOURDES PIRES BIANCHI, M.; RODRIGUES, K. C.; LUCARINI, R.; CAETANO, R. C.; LINHARI RODRIGUES PIETRO, R. C.; GOMES MARTINS, C. H.; DE ALBUQUERQUE, S.; SAMPAIO, S. V. Cell cycle arrest evidence, parasitocidal and bactericidal properties induced by L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochimie**, v. 93, p. 941-947, 2011.
- AMARANTE-MENDES, G. P.; GREEN, D. R.. The regulation of apoptotic cell death. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 1053-1061, 1999.
- AMATO NETO, V.; NICODEMO, A. C.; LOPES, H. V. Antibióticos na prática clínica, Sarvier Editora, 6ª ed. São Paulo, 2007.
- ANDE, S. R.; KOMMOJU, P. R.; DRAXL, S.; MURKOVIC, M.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; FERRANDO-MAY, E. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, v. 11, p. 1439–1451, 2006.
- ANDRADE, L. N.; MINARINI, L. A. R.; PITONDO-SILVA, A.; CLÍMACO, E. C.; PALAZZO, I. C. V.; MEDEIROS, M. I. C.; DARINI, A. L. C. Determinants of β -lactam resistance in meningitis-causing Enterobacteriaceae in Brazil. **Cam. J. Microbiol.**, v. 56, p. 399-407, 2010.
- ARAKI, S.; ISHIDA, T.; YAMAMOTO, T.; KAJI, K.; HAYASHI, H.. Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venom in vascular endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 190, p. 148-153, 1993.
- AU, L. C.; HUANG, Y. B.; HUANG, T. F.; TEH, G. W.; LIN, H. H.; CHOO, K. B. A common precursor for a putative hemorrhagic protein and rhodostomin, a platelet

aggregation inhibitor of the venom of *Calloselasma rhodostoma*: molecular cloning and sequence analysis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 181, p.585-593, 1991.

AU, L. C.; CHOU, J. S.; CHANG, K. J.; THE, G. W.; LIN, S. B. Nucleotide sequence of a full-length cDNA encoding a common precursor of platelet aggregation inhibitor and hemorrhagic protein from *Calloselasma rhodostoma* venom. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1173, p. 243-245, 1993a.

AU, L. C.; LIN, S. B.; CHOU, J. S.; THE, G. W.; CHANG, K. J.; SHIH, C. M. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for ancrod, a thrombin-like enzyme from the venom of *Calloselasma rhodostoma*. **Biochem. J.**, v. 294, p. 387-390, 1993b.

BAI, J.; MENG, Z. Effect of sulfur dioxide on apoptosis-related gene expressions in lungs from rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, v. 43, p. 272-279, 2005a.

BAI, J.; MENG, Z. Expression of apoptosis-related in livers from rats exposed to sulfur dioxide. **Toxinology**, v. 216, p. 253-260, 2005b.

BAI, J.; MENG, Z. Effect of sulfur dioxide on expression of proto-oncogenes and tumor suppressor genes from rats. **Environ. Toxicol.**, v. 25, p. 272-283, 2009.

BANDO, E.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H. Hemorrhagic protease from the venom of *Calloselasma rhodostoma*. **Int. J. Biochem.** v. 23, p.1193-1199, 1991.

BARRAVIERA, B. Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. Rio de Janeiro, EPUB, p. 205-223, 1999.

BARROS, S. F.; FRIEDLANSKAIA, I.; PETRICEVICH, V. L.; KIPNIS, T. L. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Mediators of inflammation**, v. 7, p. 339–346, 1998.

BENDER, M.; BRUBACHER, L.. Catálisis y acción enzimática. Reverte, Barcelona, Spain, 1ª ed., 1977.

BEOVIC, B. The issue of antimicrobial resistance in human medicine. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 112, p. 280-287, 2006.

BIRD, S.; ZOU, J.; WANG, T.; MUNDAY, B.; CUNNINGHAM, C.; SECOMBES, J. Evolution of interleukin-1beta. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 13, p. 483-502, 2002.

BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol. Ther.**, v. 62, p. 325-372, 1994.

BLOKLAND, A.; HONIG, W.; BROWNS, F.; JOLLES, J. Cognition-enhancing properties of subchronic phosphatidylserine (PS) treatment in middle-aged rats: comparison of bovine cortex PS with egg PS and soybean PS. **Basic Nutritional Investigations**, v. 15, p. 778–783, 1999.

BONFIM, V. L.; PONCE-SOTO, L. A.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.. Structural and functional properties of cr 5, a new lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of the snake *Calloselasma rhodostoma*. **The Protein Journal**, Vol. 25, p. 7–8, 2006.

- BONFIM, V. L.; PONCE-SOTO, L. A.; MARTINS DE SOUZA, D.; SOUZA, G. H.; BALDASSO, P. A.; EBERLIN, M. N.; MARANGONI, S.. Structural and functional characterization of myotoxin, Cr-IV 1, a phospholipase A₂ D49 from the venom of the snake *Calloselasma rhodostoma*. **Biologicals**, v. 36, p. 168-176, 2008.
- BONFOCO, E.; KRAINIC, D.; ANKARCRONA, M.; NICOTERA, P.; LIPTON, S. A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 7162–7166, 1995.
- BORNER, C.. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol. Immunol.**, v. 39, p. 615-647, 2003.
- BRANZEI, D.; FOIANI, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. **Nat Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 9, p. 297 – 308, 2008.
- BREGGE-SILVA C.; NONATO M. C.; DE ALBUQUERQUE S.; HO P. L.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO I. L.; VASCONCELOS DINIZ M. R.; LOMONTE B.; RUCAVADO A.; DÍAZ C, GUTIÉRREZ J. M.; ARANTES E. C. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. **Toxicon**, v. 60, p. 1263-1276, 2012.
- BRUSERUD, O. The snake venom rhodocytin from *Calloselasma rhodostoma* - A clinically important toxin and a useful experimental tool for studies of C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2). **Toxins**, v. 5, p. 665-674, 2013.
- BURIN, S. M.; AYRES, L. R.; NEVES, R. P.; AMBROSIO, L.; MORAIS, F. R.; DIAS-BARUFFI, M.; SAMPAIO, S. V.; PEREIRA-CROTT, L. S.; CASTRO, F. A. L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* induces apoptosis in BCR-ABL-positive cells and potentiates imatinib mesylate. **Effect Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 113, p. 103–112, 2013.
- BUTZKE, D.; HURWITZ, R.; THIEDE, B.; GOEDERT, S.; RUDEL, T. Cloning and biochemical characterization of APIT, a new L-amino acid oxidase from *Aplysia punctata*. **Toxicon**, v. 46, p. 479–489, 2005.
- CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **J. Mass Spectrom.**, v. 42, p. 1405-1414, 2007.
- CAMPOS, L.C.; TRABULSI, L.R. *Staphylococcus*. In: TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, p.149-155, 1999.
- CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, S. A.; HADDAD, V. J. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Ed. Sarvier, 2003.
- CARREGARI, V. C.; FLORIANO, R. S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; WINCK, F. V.; BALDASSO, P. A.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S. Biochemical, pharmacological and structural characterization of new basic PLA₂ Bbil-TX from *Bothriopsis bilineata* snake venom. **BioMed Research International**, p. 1-12, 2013.
- CAVALLI, A; BOLOGNESI, M.L. Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*, **J. Med. Chem.**, v. 52, p. 7339–7359, 2009.

- CHANG, M. C.; HUANG, T. F. The antiplatelet activity of ancrod on administration to rabbits. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 125, p. 508-516, 1995.
- CHAVES, F.; BARBOSA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo) in mice. **Toxicon**, v. 33, p. 31-39, 1995.
- CHEN, X.; LV, P.; LIU, J.; XU, K. Apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell (HepG2) induced by cardiotoxin III through S-phase arrest. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 61, p. 307-15, 2009.
- CHEN, W. M.; SHEU, F. S.; SHEU, S. Y. Novel L-amino acid oxidase with algicidal activity against toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* synthesized by a bacterium Aquimarina sp. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 49, p. 372-379, 2011.
- CHEN, H. S.; WANG, Y. M.; HUANG, W. T.; HUANG K. F.; TSAI, I. H. Cloning, characterization and mutagenesis of *Russell's viper* venom L-amino acid oxidase: Insights into its catalytic mechanism. **Biochimie**, v. 94, p. 335-344, 2012.
- CHINONAVANIG, L.; BILLINGS, P. B.; MATANGKASOMBUT, P.; RATANABANANGKON, K. Antigenic relationships and relative immunogenicities of venom proteins from six poisonous snakes of Thailand. **Toxicon**, v. 26, p. 883-890, 1988.
- CHUNG, M. C.; PONNUDURAI, G.; KATAOKA, M.; SHIMIZU, S.; TAN, N. H. Structural studies of a major hemorrhagin (rhodostoxin) from the venom of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper). **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 325, p. 199-208, 1996.
- CISCOTTO, P.; DE AVILA, R. A. M.; COELHO, E. A. F.; OLIVEIRA, J.; DINIZ, C. G.; FARIAS, L. M.; DE CARVALHO, M. A. R.; MARIA, W. S.; SANCHEZ, E. F.; BORGES, A.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 53, p. 330-341, 2009.
- CISNEROS. Características bioquímicas de una proteína antibacteriana aislada del veneno de *Lachesis muta* "Shushupe" **Tesis para optar al Título profesional de Biólogo, UNMSM**, Lima, Peru, 1996.
- COLES, C. J.; EDMONDSON, D. E.; SINGER, T. P. Reversible inactivation of L-amino acid oxidase. Properties of the three conformational forms. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 8035-8039, 1977.
- COSTA, T. A. F.; DANTAS, R. T.; TOYAMA, M. H.; DIZ FILHO, E.; ZARA, F. J.; RODRIGUES DE QUEIROZ, M. G.; PINTO NOGUEIRA, N. A.; ROSA DE OLIVEIRA, M.; DE OLIVEIRA TOYAMA, D.; MONTEIRO, H. S.; MARTINS, A. M. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 55, p. 795-804, 2010.
- COSTA, Tássia Rafaella. Avaliação da atividade antiofídica do extrato vegetal de *Anacardium humile*: Isolamento e caracterização fitoquímica do ácido gálico com potencial antimiotóxico. **Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em toxicologia da faculdade de Ciências Farmacêuticas de**

Ribeirão Preto/USP, para obtenção do título de mestre em Ciências. RIBEIRÃO PRETO/SP. p. 1. 2011.

COSTA, T. R.; BURIN, S. M.; MENALDO, D. L.; DE CASTRO, F. A.; SAMPAIO, S. V. Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.** **2014.** Review.

CURTI, B.; MASSEY, V.; ZMUDKA, M. Inactivation of snake venom L- amino acid oxidase by freezing. **J. Biol. Chem.**, v. 243, p. 2306-2314, 1968.

CURTI, B.; RONCHI, S.; SIMONETA, P. M. D- and L-aminoacid oxidases. In: **Mueller, F. Chemistry and Biochemistry of Flavoenzyme**, Ed. CRC Press, Boca Roton, p. 69-94, 1992.

DEMPFLE, C. E.; ARGIRIOU, S.; KUCHER, K.; MULLER-PELTZER, H.; RUBSAMEN, K.; HEENE, D. L. Analysis of fibrin formation and proteolysis during intravenous administration of ancrod. **Blood**, v. 96, p. 2793–2802, 2000.

DEMPFLE, C. E.; ARGIRIOU, S.; ALESCI, S.; KUCHER, K.; MÜLLER-PELTZER, H.; RÜBSAMEN, K.; HEENE, D. L. Fibrin formation and proteolysis during ancrod treatment. Evidence for des-A-profibrin formation and thrombin independent factor XIII activity. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 936, p. 210-214, 2001a.

DEMPFLE, C. E.; ALESCI, S.; KUCHER, K.; MÜLLER-PELTZER, H.; RÜBSAMEN, K.; BORGGREFE, M. Plasminogen activation without changes in tPA and PAI-1 in response to subcutaneous administration of ancrod. **Thromb. Res.**, v. 104, p. 433-438, 2001b.

DEOLINDO, P.; TEIXEIRA-FERREIRA, A. S.; DAMATTA, R. A.; ALVES, E. W.; 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**, v. 56, p. 944-55, 2010.

DIPIETRANTONIO, A. M.; HSIEH, T.; WU, J. W. Activation of caspase 3 in HL-60 cells exposed to hydrogen peroxide. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 255, p. 477-482, 1999.

DOUGLAS, R. M., HADDAD, G. G. Invited Review: Effect of oxygen deprivation on cell cycle activity: a profile of delay and arrest. **J. Appl. Physiol.**, v.94, p. 2086-2083, 2003.

DU, C.; FANG, M.; LI, Y.; LI, L. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, v. 102, p. 33-42, 2000.

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

DUARTE, M. C.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L.; DELARMELENA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, p. 305-311, 2005.

DYPBUKT, J. M.; ANKARCROMA, M.; BURKITT, M.; SJOHOLM, A.; STROM, K.; ORRENIUS, S.; NICOTERA, P.; Different prooxidant levels stimulate growth, trigger

apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 30553–30560, 1994.

EASTMAN, A. Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies. **J. Cell. Biochem.**, v. 91, p. 223-231, 2004.

EHARA, T.; KITAJIMA, S.; KANZAWA, N.; TAMIYA, T.; TSUCHIYA, T. Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity, **FEBS Lett.**, v. 531, p. 509-512, 2002.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 495–516, 2007.

ENDERS, S.; VAN DER MEER, J.W.M.; DINARELLO, C.A. Interleukin 1 and the pathogenesis of fever. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 17, p. 469-474, 1987.

ESKES, R.; ANTONSSON, B.; OSEN-SAND, A.; MONTESSUIT, S.; RICHTER, C.; SADOUL, R.; AZZEI, G.; NICHOLS, A.; MARTINOU, J. C. Bax-induced cytochrome c release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. **J. Cell Biol.**, v. 143, p. 217-224, 1998.

FALKOFF, R.J.M.; MURAGUCHI, A.; HONG, J-X.; BUTLER, J.L.; DINARELLO, C.A.; FAUCI, A.S. The effects of interleukin 1 in human B cell activation and proliferation. **J. Immunol.**, v. 131, p. 801-805, 1983.

FARSKY, S. H. P.; COSTA-CRUZ, J. W. M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C. F. P. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom. *In vivo* and *in vitro* studies. **Toxicon**, v. 35, p. 85-93, 1997.

FERNANDES, C. M.; ZAMUNER, S. R.; ZULIANI, J. P.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. Inflammatory effects of BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: leukocyte recruitment and release of cytokines. **Toxicon** v. 47, p. 549-559, 2006.

FLORES, C. A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Lipoxygenase-derived mediators may be involved in *in vivo* neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon** v. 31, p. 1551-1559, 1993.

FRANÇA, S. C.; KASHIMA, S.; ROBERTO, P. G.; MARINS, M.; TICLI, F. K.; PEREIRA, J. O.; ASTOLFI-FILHO, S.; STABELI, R. G.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Molecular approaches for structural characterization of *Bothrops moojeni* L-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 355, p. 302–306, 2007.

FUNG, S. Y.; TAN, N. H.; SIM, S. M. Protective effects of *Mucuna pruriens* seed extract pretreatment against cardiovascular and respiratory depressant effects of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom in rats. **Trop. Biomed.**, v. 27, p. 366-372, 2010.

GALVÃO NASCIMENTO, N.; SAMPAIO, M. C.; AMARAL OLIVO, R.; TEIXEIRA, C. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. **Toxicon**, v. 55, p. 343-352, 2010.

- GARDINER, E.E.; ANDREWS, R.K. The cut of the clot(h): snake venom fibrinogenases as therapeutic agents. **J. Thromb. Haemost.**, v. 6, p. 1360-1362, 2008.
- GASANOV, S. E.; DAGDA, R. K.; RAEL, E. D. Snake Venom Cytotoxins, Phospholipase A₂s, and Zn²⁺-dependent Metalloproteinases: Mechanisms of Action and Pharmacological Relevance. **J. Clin. Toxicol.**, v. 4, p. 1-34, 2014.
- GEYER, A.; FITZPATRICK, T. B.; PAWELEK, P. D.; KITZING, K.; VRIELINK, A.; GHISLA, S.; MACHEROUX, P. Structure and characterization of the glycan moiety of L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 4044–4053, 2001.
- GOMES, A., CHOUDHURY, S. R., SAHA, A., MISHRA, R., GIRI, B., BISWAS, A.K., DEBNATH, A., GOMES, A. A heat stable protein toxin (drCT-I) from the Indian Viper (*Daboia russelli russelli*) venom having antiproliferative, cytotoxic and apoptotic activities. **Toxicon**, v. 49, p. 46-56, 2007.
- GUO, C.; LIU, S.; YAO, Y.; ZHANG, Q.; SUN, M. Z. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 60, p. 302-311, 2012. Review.
- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 40, p. 367-379, 1984.
- GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841-850, 2000.
- GUTIÉRREZ, J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. **Rev. Biol. Trop.**, v. 50, p. 377-394, 2002.
- HADDAD, J. J. On the enigma of pain and hyperalgesia: a molecular perspective. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 353, p. 217-224, 2007.
- HAO, Q; WANG, H; WANG, J; DOU, J; ZHANG, M; ZHOU, W; ZHOU, C. Effective antimicrobial activity of Cbf-K16 and Cbf-A7A13 against NDM-1-carrying *Escherichia coli* by DNA binding after penetrating the cytoplasmic membrane in vitro. **J. Pept. Scienc.**, v. 19, p. 173–180, 2013.
- HENNERICI, M. G.; KAY, R.; BOGOUSLAVSKY, J.; LENZI, G. L.; VERSTRAETE, M.; ORGOGOZO, J. M. Intravenous ancrod for acute ischaemic stroke in the european stroke treatment with ancrod trial: A randomized controlled trial. **Lancet**, v. 368, p. 1871–1878, 2006.
- HO, M.; WARRELL, D. A.; LOOAREESUWAN, S.; PHILLIPS, R. E.; CHANTHAVANICH, P.; KARBWANG, J.; SUPANARANOND, W.; VIRA VAN, C. HUTTON, R. A.; VEJCHOË, S. Clinical significance of venom antigen levels in patients envenomed by the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 35, p. 579-587, 1986.
- HOSSMANN, V.; HEISS, W. D.; BEWERMEYER, H.; WIEDEMANN, G. Controlled trial of ancrod in ischemic stroke. **Arch Neurol.**, v. 40, p. 803–808, 1983.
- HSU, C. C.; WU, W. B.; CHANG, Y. H.; KUO, H. L.; HUANG, T. F.. Antithrombotic effect of a protein-type I class snake venom metalloproteinase, kistomin, is mediated

by affecting glycoprotein Ib-von Willebrand factor interaction. **Mol Pharmacol.**, v. 72, p. 984-992, 2007.

HUANG, J. J.; XU, Y. L. The research of L-amino acid oxidase in snake venom. **World J. Tumor**, v. 8, p. 91-95, 2009.

IMLAY, J. A.. Pathways of oxidative damage. **Annu. Ver. Microbiol.**, v. 57, p. 395-418, 2003.

IZIDORO, L. F. M.; RIBEIRO, M. C.; SOUZA, G. R. L.; SANT'ANA, C. D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GOULART, L. R.; BELEBONI, R. O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S. V., SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from Bothrops pirajai snake venom. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 14, p. 7034-7043, 2006.

IZIDORO, L. F.; SOBRINHO, J. C.; MENDES, M. M.; COSTA, T. R.; GRABNER, A. N.; RODRIGUES, V. M.; DA SILVA, S. L.; ZANCHI, F. B.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. F.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. **Biomed Res.**, p. 1-19, 2014. Review.

JIN, Y.; LEE, W. H.; ZENG, L.; ZHANG, Y. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from king cobra venom. **Toxicon**, v. 50, p. 479-489, 2007.

JIN, Z.; EL-DEIRY, W. S. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biol. Ther.**, v.4, p. 139-163, 2005. Review.

KAMIO, M.; KO, K. C.; ZHENG, S.; WANG, B.; COLLINS, S. L.; GADDA, G.; TAI P. C.; DERBY, C. D. The chemistry of escapin: identification and quantification of the components in the complex mixture generated by an L-amino acid oxidase in the defensive secretion of the sea snail *Aplysia californica*. **Chemistry**, v. 15, p. 1597-1603, 2009.

KAO, P.; LIN, S.; HU, W.; CHANG, L. *Naja naja atra* and *Naja nigricollis* cardiotoxins induce fusion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane-mimicking liposomes, **Toxicon**, v. 60, p. 367-377, 2012.

KASAI, K.; ISHIKAWA, T.; KOMATA, T.; FUKUCHI, K.; CHIBA, M.; NOZAKA, H.; NAKAMURA, T.; SATO, T.; MIURA T. Novel L-amino acid oxidase with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from epidermal mucus of the flounder *Platichthys stellatus*. **FEBS J.**, v. 277, p. 453-465, 2010.

KHANAPURE, S. P.; GARVEY, D. S.; JANERO, D. R.; LETTS, L. G. Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. **Current Topic in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 311-340, 2007.

KOH, D. C.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 63, p. 3030-3041, 2006.

KOK, A.; RAWITCH, A. B. "Studies on L-amino acid oxidase. II. Dissociation and characterization of its subunits," **Biochemistry**, v. 8, p. 1405-1411, 1969.

- KOMMOJU, P. R.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S. Molecular cloning, expression and purification of L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **Protein Expression and Purification**, v. 52, p. 89-95, 2007.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
- KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. **Medical Mycology**, Philadelphia, USA: Lea & Febiger, 1992.
- LANDUCCI, E. C. T.; TOYAMA, M.; MARANGONI S. Effect of crotafotin and heparin on the rat paw edema induced by different secretory phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 38, p. 199–208, 2000.
- LEVY D. E.; DEL ZOPPO G. J.. Ancrod: A potential treatment for acute, ischemic stroke from snake venom. **Toxin reviews**, v. 25, p. 323–333, 2006.
- LEE, M. L.; CHUNG, I.; FUNG, S. Y.; KANTHIMATHI, M. S.; TAN, N. H.. Anti-Proliferative Activity of King Cobra (*Ophiophagus hannah*) Venom L-Amino Acid Oxidase. **Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.**, 2013
- LI LEE, M.; CHUNG, I.; YEE FUNG, S.; KANTHIMATHI, M. S.; HONG TAN, N. Antiproliferative activity of king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase. **Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 114, p. 336-43, 2014.
- LIU, S.; MARDER, V. J.; LEVY, D. E.; WANG, S. J.; YANG, F.; PAGANINI-HILL, A.; FISHER, M. J.. Ancrod and fibrin formation: perspectives on mechanisms of action. **Stroke**, v.42, p.3277-3280, 2011.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Method.Methods**. v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOPES, D. S.; BALDO, C.; OLIVEIRA, C. F.; DE ALCÂNTARA, T. M.; OLIVEIRA, J. D.; GOURLART, L. R.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; MOURA-DASILVA, A. M.; CLISSA, P. B.; RODRIGUES, V. M. Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom. **Toxicon**, v. 54, p. 42-49, 2009.
- LOW, S. P.; WILLIAMS, K. A.; CANHAM, L. T.; VOELCKER, N. H. Evaluation of mammalian cell adhesion on surface-modified porous silicon. **Biomaterials**, v. 27, p. 4538-4546, 2006.
- MACHEROUX, P.; SETH, O.; BOLLSCHWEILER, C.; SCHWARZ, M.; KURFURST, M.; AU, L.C.; GHISLA, S. L-amino-acid oxidase from Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. Comparative sequence analysis and characterization of active and inactive forms of the enzyme. **Eur J Biochem**, v. 268, p. 1679-86, 2001.
- MACKESSY, S.P. Thrombin-like enzymes in snake venoms, in: R.M. **Toxins and Hemostasis**, p. 519-557, 2010.
- MANNERVICK, B. BOGGARAM, V. CARLBERG I. The Catalytic Mechanism of Mechanism of Glutathione Reductase-Flavin and Flavoproteins, **Scientific Societies Press**, Tokyo, Japan, 1st edition, 1980.

- MARCUSSI, S.; SANTOS, P. R.; MENALDO, D. L.; SILVEIRA, L. B.; SANTOS-FILHO, N. A.; MAZZI, M. V.; DA SILVA, S. L.; STÁBELI, R. G.; ANTUNES, L. M.; SOARES, A. M. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 724, 59-63, 2011.
- MARTINS, L.T. *Staphylococcus*. In: TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, p.149-155, 1999.
- MARUYAMA, S.; KANO, M.; MATSUMOTO, A.; KUWAHARA, M.; YAMASHITA, M.; ASANO, Y.. A novel function of Interferon regulatory factor-1: Inhibition of Th2 cells by down-regulating the *IL4* gene during *Listeria* infection. **Int. Immunol.** 2014.
- McDIARMID, R. W.; CAMPBELL, J. A.; TOURÉ, T. Snake Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference, v. 1, p. 511, 1999.
- McHUGH, P.; TURINA, M. Apoptosis and Necrosis: A Review for Surgeons. **Surgical Infections**, v. 7, p. 53-68, 2006.
- McMAHON, S. B., CAFFERTY, W. B., MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Exp. Neurol.**, v. 192, p.444-462, 2005.
- MEBS, D. Venomous and Poisonous Animals: A Handbook for Biologists, Toxicologists and Toxinologists, Physicians and Pharmacists. **Medpharm Scientific Publishers**, Stuttgart, Germany, 2002.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, p. 428-435, 2008.
- MEHRTENS, J. M. Living Snakes of the World in Color. New York: **Sterling Publishers**. p. 480, 1987.
- MENALDO, D. L.; BERNARDES, C. P.; PEREIRA, J. C.; SILVEIRA, D. S. C.; MAMEDE, C. C. N.; STANZIOLA, L. OLIVEIRA, F.; PEREIRA-CROTT, L. S.; FACCIOLI, L. H.; SAMPAIO, S. V. Effects of two serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom on the complement system and the inflammatory response. **International Immunopharmacology**, v. 15, p. 764–771, 2013.
- MINARINI, L. A. R.; POIREL, L.; TREVISANI, N. A. C.; DARINI, A. L. C.; NORDMANN, P. Predominance of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 65, p. 202–206, 2009.
- MIZEL, S. B. Interleukin 1 and T cell activation. **Immunol Rev.**, v. 63, p. 51-72, 1982.
- MOLFETTA, F. A.; BRUNI, A. T.; HONORIO, K. M.; DA SILVA, A. B. F. A structure–activity relationship study of quinine compounds with trypanocidal activity. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 40, p. 329–338, 2005.
- MOREIRA, V.; DOS-SANTOS, M.C.; NASCIMENTO, N.G.; DA SILVA, H.B.; FERNANDES, C.M.; D'IMPÉRIO LIMA, M.R.; TEIXEIRA, C. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon** v. 60, p. 12-20, 2012.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOURA-DA-SILVA, A.M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Curr. Pharm. Des.**, v. 13, p. 2893-2905, 2007.
- MOUSTAFA, I. M.; FOSTER, S.; LYUBIMOV, A. Y.; VRIELINK, A. Crystal structure of laao from *Calloselasma rhodostoma* with an L-phenylalanine substrate: insights into structure and mechanism. **J. Mol. Biol.**, v. 364, p. 991-1002, 2006.
- MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GOMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitol. Res.**, v. 86, p. 999-1002, 2000.
- MUÑOZ, L. J.; ESTRADA-GOMEZ, S.; NÚÑEZ, V.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Characterization and cDNA sequence of *Bothriechis schlegelii* L-amino acid oxidase with antibacterial activity. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 69, p. 200-207, 2014.
- NAGATA, S.; GOLSTEIN, P. The Fas death factor. **Science**. v. 267, p. 1449-1456, 1995. Review.
- NAKAE, S.; ASANO, M.; HORAI, R.; IWAKURA, Y. Interleukin-1 beta, but not interleukin-1 alpha, is required for T-cell-dependent antibody production. **Immunology**, v. 104, p. 402-409, 2001.
- NAUMANN, G. B.; SILVA, L. F.; SILVA, L.; FARIA, G.; RICHARDSON, M.; EVANGELISTA, K.; KOHLHOFF, M.; GONTIJO, C. M.; NAVDAEV, A.; DE REZENDE, F. F.; EBLE, J.A.; SANCHEZ, E. F. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochim Biophys. Acta.**, v. 1810, p. 683-694, 2011.
- NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada - Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2002.
- NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard - Sixth Edition. NCCLS document M7-A6. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2003b.
- NGUYEN, J. T.; WELLS, J. A. Direct activation of the apoptosis machinery as a mechanism to target cancer cells. **Proc.Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 753-7538, 2003.
- NICKLAS, R. A. Beta-lactam antibiotics. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 101, p. 498-501, 1998.
- NUNES EDOS, S; DE SOUZA, M. A; VAZ, A. F; SANTANA, G. M; GOMES, F. S; COELHO, L. C; PAIVA, P. M; DA SILVA, R. M; SILVA-LUCCA, R. A; OLIVA, M. L; GUARNIERI, M. C; CORREIA, M. T. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol. and Biochem. Mol. Biol.**, v. 159, p. 57-63, 2011.

- NUUTINEN, J. T.; MARTTINEN, E.; SOLIYMANI, R.; HILDÉN, K.; TIMONEN, S. L-Amino acid oxidase of the fungus *Hebeloma cylindrosporum* displays substrate preference towards glutamate. **Microbiology**, v. 158, p. 272-283, 2012.
- OKIN, D.; MEDZHITOV, R. Evolution of Inflammatory Diseases. **Current Biology**, v. 22 p. 733-740, 2012.
- OKUBO, B. M.; SILVA, O. N.; MIGLIOLO, L.; GOMES, D. G.; PORTO, W. F.; BATISTA, C. L.; RAMOS, C. S.; HOLANDA, H. H.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L.; MORENO, S. E.. Evaluation of an antimicrobial L-amino acid oxidase and peptide derivatives from *Bothropoides matogrosensis* pitviper venom. **PLoS ONE**, v.7, p. 1-10, 2012.
- OLIVA, I. B.; COELHO, R. M.; BARCELLOS, G. G.; SALDANHA-GAMA, R.; WERMELINGER, L. S.; MARCINKIEWICZ, C.; BENEDETA ZINGALI, R.; BARJA-FIDALGO, C. Effect of RGD-disintegrins on melanoma cell growth and metastasis: involvement of the actin cytoskeleton, FAK and c-Fos. **Toxicon**. v. 50, p. 1053-63, 2007.
- OLIVO, R. A.; TEIXEIRA, C .F.; WALLACE, J. L.; GUTIÉRREZ, J. M.; ZAMUNER, S. R. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. **Toxicon**, v. 49, p. 670-677, 2007.
- PALAZZO, I.C.; ARAUJO, M. L.; DARINI, A. L.. First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43,p.179-185, 2005.
- PALAZZO, I. C.; D'AZEVEDO, P. A.; SECCHI, C.; PIGNATARI, A. C.; DARINI, A. L..*Staphylococcus hominis* subsp. novobiosepticus strains causing nosocomial bloodstream infection in Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 62, p. 1222-1226, 2008.
- PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDA, J.; BENGOCHEA, J. A.; GORVEL, J. P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom Synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. **Eur. J. Biochem.**, v. 253, p. 452-461, 1998.
- PABLA, N.; DONG, Z. Curtailing side effects in chemotherapy: a tale of PKCO in cisplatin treatment. **Oncotarget**, v. 3, 107-111,2012.
- PAWELEK, P.D.; CHEAH, J.; COULOMBE, R.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; VRIELINK, A. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. **The Embo Journal**, v. 19, p. 4204 – 4215, 2000.
- PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Host-Parasite Interaction; Nonspecific Host Resistance, In: **Microbiology Concepts and Applications**, 6ª ed., McGraw-Hill Inc., New York, U.S.A. p. 478-479, 1999.
- PESSATTI, M.; FONTANA, J. D.; FURTADO, M. F.; GUIMARÃES, M. F.; ZANETTE, L. R.; COSTA, W. T.; BARON, M. Screening of *Bothrops* snake venom for L-amino acid oxidase activity. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 51, p. 197-210,1995.

PETRICEVICH, V. L. Cytokine and nitric oxide production following severe envenomation. **Current Drug Targets**, v. 3, p. 325–332, 2004.

PETRICEVICH, V. L. Scorpion venom and the inflammatory response. **Mediators Inflamm.**, p. 1-16, 2010. Review.

PFAFFL, M. W.. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA I.D. Ofidismo. **Ass. Med. Brasil**, v. 47, p. 24-29, 2001.

PITTET, D.; ALLEGRANZI, B.; STORR, J.; BAGHERI NEJAD, S.; DZIEKAN, G.; LEOTSAKOS, A.; DONALDSON, L. Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. **J. Hosp. Infect.**, v. 68, p. 285–292, 2008.

POBER, J. S.; BEVILACQUA, M. P.; MENDRICK, D. L.; LAPIERRE, L. A.; FIER, W.; GIMBRONE, M. A. Two distinct monokines, interleukin-1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. **J. Immunol.**, v. 136, p. 1680-1687, 1986.

PONNUDURAI, G.; CHUNG, M. C.; TAN, N. H. Isolation and characterization of a hemorrhagin from the venom of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper). **Toxicon**, v. 31, p. 997-1005, 1993.

PONNUDURAI, G.; CHUNG, M. C.; TAN, N. H. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 313, p. 373-378, 1994.

PONTES, A. S.; DAS SETÚBAL, S.; XAVIER, C. V.; LACOUTH-SILVA, F.; KAYANO, A. M.; PIRES, W. L.; NERY, N. M.; BOERI DE CASTRO, O.; DA SILVA, S. D.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M.; ZULIANI, J. P.; Effect of L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodostoma* snake venom on human neutrophils. **Toxicon**, v. 80, p. 27-37, 2014.

PORNMANEE, P.; SÁNCHEZ, E. E.; LÓPEZ, G.; PETSOM, A.; KHOW, O.; PAKMANEE, N.; CHANHOM, L.; SANGVANICH, P.; PÉREZ, J. C. Neutralization of lethality and proteolytic activities of Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom with North American Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) serum. **Toxicon**, v. 52, p. 186-189, 2008.

PORNMUTTAKUN, D.; RATANABANANGKON, K.. Development of an *in vitro* potency assay for antivenom against Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). **Toxicon**, v.77, p. 1–5, 2014.

PUKRITTAYAKAMEE, S.; DESAKORN, V.; CLEMENS, R.; NONTPRASERT, A.; BOCK, H. L.; WHITE, N. J.; BUNNAG, D. Synergy of antithrombin III concentrate 60 and antivenom in preventing coagulopathy in a rat model of Malayan pit viper envenoming. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 84, p. 880-884, 1990.

RABINOVITCH, M.; DE STEFANO, M. J. Macrophage spreading *in vitro*. Inducers of spreading. **Exp. Cell Res.**, v. 77, p. 323-334, 1973.

- REED, J. C. Apoptosis-target therapies for cancer. **Cancer Cell**, v. 3, p. 17-22, 2003.
- REID, H. A.; THEAN, P. C.; CHAN, K. E.; BAHAROM, A. R. Clinical effects of bites by Malayan viper (*Agkistrodon rhodostoma*). **Lancet**, v. 7, p. 617-621, 1963a.
- RIPPON, J.W. Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes. 3 ed. Philadelphia, USA: WB Saunders, 1988.
- ROCHA E SILVA, M. A brief survey of the history of inflammation. **Agents Actions**, v. 8, p. 45-49, 1978.
- RODRIGUES, R.S.; DA SILVA, J.F.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F.P.; OTAVIANO, A.R.; HENRIQUE-SILVA, F.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A.J.; BRAZ, A.S.; DOS SANTOS, J.I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; FONTES, M.R.; FULY, A.L.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie**, v. 91, p. 490-501, 2009.
- ROITT, I. M. Different CD4 T-cell subsets can make different cytokines patterns. **The essential immunology**, 9th ed. p. 184-200, London, 1997.
- ROJKIND M.; DOMÍNGUEZ-ROSALES J. A.; NIETO N.; GREENWEL P. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 1872-1891, 2002.
- ROSÁRIO, N. A.; GRUMACH, A. S. Allergy to beta-lactams in pediatrics: a practical approach. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. 181-188, 2006.
- RUNYORO, D.K.B.; NGASSAPA, O.D.; MATEE, M.I.N.; JOSEPH, C.C.; MOSHI, M.J. Medicinal plants used by Tanzanian traditional healers in the management of Candida infections. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 2, p. 158-165, 2006.
- SAKURAI, Y.; SHIMA, M.; MATSUMOTO, T.; TAKATSUKA, H.; NISHIYA, K.; KASUDA, S.; FUJIMURA, Y.; YOSHIOKA, A. Anticoagulant activity of M-LAO, L-amino acid oxidase purified from *Agkistrodon halys blomhoffii*, through selective inhibition of factor IX. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1649, p. 51-57, 2003.
- SALAMATI, P.; RAHBARIMANESH. A. A.; YUNESIAN, M.; NASERI, M. Neonatal nosocomial infections in Bahrami Children Hospital. **Indian J. Pediatr.**, v. 73, p. 197-200, 2006.
- SAMEL, M.; TÖNISMÄGI, K.; RÖNNHOLM, G.; VIJA, H.; SIIGUR, J.; KALKKINEN. N.; SIIGUR, E. L-amino acid oxidase from *Naja naja oxinana* venom. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, v. 149, p. 572-580, 2008.
- SAMSA, G. P.; MATCHAR, D. B.; WILLIAMS, G. R.; LEVY, D. E. Cost effectiveness of ancreod treatment of acute ischaemic stroke: results from the Stroke Treatment with Ancreod Trial (STAT). **J. Eval. Clin. Prac.**, v. 8, p. 61-70, 2002.
- SCHAFER. K. A. The cell cycle. **Vet. Pathol.**, v. 35, p. 461-478, 1998. Review.
- SCHULTZ, D. R.; HARRINGTON W. J. Apoptosis: Programmed Cell Death at a Molecular Level. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 32, p. 345-369, 2003.

- SCORRANO, L.; OAKES, S. A.; OPFERMAN, J. T.; CHENG, E. H.; SORCINELLI, M. D.; POZZAN, T.; KORSMEYER, S. J. BAX and BAK regulation of endoplasmatic reticulum Ca^{2+} : a control point for apoptosis. **Science**, v. 300, p. 135-139, 2003.
- SHARMA, K.; WANG, R. X.; ZHANG, L. Y.; YIN, D. L.; LUO, X. Y.; SOLOMON, J. C.; JIANG, R. F.; MARKOS, K.; DAVIDSON, W.; SCOTT, D. W.; SHI, Y. F.. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. **Pharmacol. Ther.**, v. 88, p. 333-347, 2000.
- SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 1191-1197, 2005.
- SHERMAN, D. G.; ATKINSON, R. P.; CHIPPENDALE, T.; LEVIN, K. A.; NG K.; FUTRELL, N. Intravenous ancrod for treatment of acute ischemic stroke: The STAT study: A randomized controlled trial. Stroke Treatment with Ancrod Trial. **JAMA**, v. 283, p. 2395-2403, 2000.
- SHIN, Y.; MORITA, T.. Rhodocytin, a functional novel platelet agonist belonging to the heterodimeric C-type lectin family, induces platelet aggregation independently of glycoprotein Ib. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 245, p. 741-745, 1998.
- SKARNES, R. C. L-amino acid oxidase, a bactericidal system. **Nature**, v. 225, p. 1072-1073, 1970.
- SOLIS, C.; ESCOBAR, E.; YARLEQUE A.. "Purificación y caracterización de la L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* 'Jergón shushupe', **Revista Peruana de Biología**, vol. 6, p. 75-84, 1999.
- SON, D. J., PARK, M. H., CHAE, S. J., MOON, S. O., LEE, J. W., SONG, H. S., MOON, D. C., KANG, S. S., KWON, Y. E., HONG, J. T. Inhibitory effect of snake venom toxin from *Vipera lebetina turanica* on hormone-refractory human prostate cancer cell growth: induction of apoptosis through inactivation of nuclear factor kappaB. **Mol. Cancer Ther.**, v. 6, p. 675-683, 2007.
- SOUZA, D. H.; EUGENIO, L. M.; FLETECHER, J. E.; JIANG, M. S.; GARRATT, R. C.; OLIVA, G.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix lactincintus* snake venom: preliminary crystallographic data. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 368, p. 285-290, 1999.
- STÁBELI, R. G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B.; PIETRO, R. C.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; OLIVEIRA, E. B.; SOARES, A. M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 12, p. 2881-2886, 2004.
- STÁBELI RG, SANT'ANA CD, RIBEIRO PH, COSTA TR, TICLI FK, PIRES MG, NOMIZO A, ALBUQUERQUE S, MALTA-NETO NR, MARINS M, SAMPAIO SV, SOARES AM. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 41, p. 132-140, 2007.
- STILES, B. G.; SEXTON, F. W.; WEINSTEIN, S. A. Antibacterial effects of different snake venom: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon**, v. 29, p. 1129-1141, 1991.

- STUMPF, P. K.; GREEN, D. E. L-Amino acid oxidase of *Proteus vulgaris*. The **J. Biol. Chemistry**, v. 153, p. 387–399, 1944.
- SUHR, S. M.; KIM, D. S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, p. 134-139, 1996.
- SUN, M. Z.; GUO, C.; TIAN, Y.; CHEN, D.; GREENAWAY, F.T.; LIU, S. Biochemical, functional and structural characterization of Akbu-LAAO: A novel snake venom l-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Biochimie**, v. 92, p. 343-349, 2010.
- SUSIN, S. A.; LORENZO, H. K.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; SNOW, B. E.; BROTHERS, G. M.; MANGION, J.; JACOTOT, E.; COSTANTINI, P.; LOEFFLER, M.; LAROCLETTE, N.; GOODLETT, D. R.; AEBERSOLD, R.; SIDEROVSKI, D. P.; PENNINGER, J. M.; KROEMER, G.; Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature**, v.397, p. 441-446, 1999.
- SUWA, T.; HOGG, J. C.; ENGLISH, D.; VAN EEDEN, S. F. Interleukin-6 induces demargination of intravascular neutrophils and shortens their transit in marrow. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 279, p. 2954-2960, 2000.
- SWEETMAN, G. M.; GARNER, G. V.; GORDON, D. B.; TETLER, L.; THEAKSTON, R. D. Electrospray mass spectrometry of Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 6, p. 724-726, 1992.
- TAGA, T.; HIBI, M.; HIRATA, Y.; YAMASAKI, K.; YASUKAWA, K.; MATSUDA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer. **Cell**, v. 58, p. 573-581, 1989.
- TAN, N. H.; KANTHIMATHI, M. S.; TAN, C. S. Enzymatic activities of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom. **Toxicon**, v. 24, p. 626-630, 1986.
- TAN, N. H.; SAIFUDDIN, M. N. Substrate specificity of king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase. **Int. J. Biochem**, v. 23, p. 323–327, 1991.
- TAN, N. H., PONNUDURAI, G.. The toxinology of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom. **J. Toxicol. Toxin. Rev.**, v.15, p.1–17, 1996.
- TAN, C. H.; LEONG, P. K.; FUNG, S. Y.; SIM, S. M.; PONNUDURAI, G.; ARIARATNAM, C.; KHOMVILAI, S.; SITPRIJA, V.; TAN, N. H. Cross neutralization of *Hypnale hypnale* (hump-nosed pit viper) venom by polyvalent and monovalent Malayan pit viper antivenoms in vitro and in a rodent model. **Acta. Trop.**, v. 117, p. 119-124, 2011.
- TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews**, v. 9, 231-241, 2008.
- TEIXEIRA, A. R; MONTEIRO, P. S; REBELO, J. M. Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. **Emerging Infect Disease**, v. 7, p. 100–112, 2001.
- TEIXEIRA, C. F.; LANDUCCI, E. C.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 42, p. 947-962, 2003.

- TEIXEIRA, C. F.; FERNANDES, C. M.; ZULIANI, J. P.; ZAMUNER, S. F. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 181-184, 2005.
- TEIXEIRA, C.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICCOLO, G.; CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon** v. 154, p. 988-997, 2009.
- TEMPONE, A. G.; ANDRADE Jr, H. F.; SPENCER, P. J.; LOURENCO, C. O.; ROGERO, J. R.; NASCIMENTO, N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania spp.* with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 280, p. 620-624, 2001.
- TERLIKOWSKI, S. J. Tumour necrosis factor and cancer treatment: a historical review and perspectives. **Rocz. Akad. Med. Białymst.**, v. 46, p. 5-18, 2001.
- THEAKSTON, R. D.; PHILLIPS, R. E.; LOOAREESUWAN, S.; ECHEVERRIA, P.; MAKIN, T.; WARREL, D. A. Bacteriological studies of the venom and mouth cavities of wild Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) in southern Thailand. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.84, p. 875-879, 1990.
- TONISMAGI, K.; SAMEL, M.; TRUMMAL, K.; RONNHOLM, G.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, E. L-amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: isolation, characterization, effects on platelets and bacteria. **Toxicon**, v. 48, p. 227-237, 2006.
- TORII, S.; NAITO, M.; TSURUO, T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from *Western diamondback rattlesnake* venom. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 9539-9542, 1997.
- TORII, S.; YAMANE, K.; MASHIMA, T.; HAGA, N.; YAMAMOTO, K.; FOX, J. W.; NAITO, M.; TSURUO, T. Molecular cloning and functional analysis of apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. **Biochemistry**, v. 39, p. 3197-3205, 2000.
- TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; TOMOKANE, T. Y.; FONSECA, F. V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O.; MARTINS, M. A.; MONTEIRO, H. S.; FONTELES, M. C.; Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 47, p. 47-57, 2006.
- TREBIEN, H. A.; CALIXTO, J. B. Pharmacological evaluation of rat paw edema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents Actions**, v. 26, p. 292-300, 1989.
- TSENG, Y. L.; PENG, H. C.; HUANG, T. F.. Rhodostomin, a disintegrin, inhibits adhesion of neutrophils to fibrinogen and attenuates superoxide production. **J. Biomed. Sci.**, v. 11, p. 683-691, 2004.
- VALLON, O.; BULTE, L.; KURAS, R.; OLIVE, J.; WOLLMAN, F.A. Extensive accumulation of an extracellular L-amino acid oxidase during gametogenesis of *Chlamydomas reinhardtii*. **Eur. J. Biochemistry**, v. 215, p. 351-360. 1993.

- VARGAS, L. J.; QUINTANA, J. C.; PEREAÑEZ, J. A.; NÚÑEZ, V.; SANZ, L.; CALVETE, J. Cloning and characterization of an antibacterial L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cumanensis* venom. **Toxicon**, v. 64, p. 1–11, 2013.
- VEGA, C.; ROLON, M.; MARTINEZ-FERNANDEZ, A. R.; ESCARIO, J. A.; GOMEZ-BARRIO, A. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing beta-galactosidase. **Parasitology Research**, v. 95, p. 296–298, 2005.
- VEJAYAN, J.; KHOON, T. L.; IBRAHIM, H..Comparative analysis of the venom proteome of four important Malaysian snake species. **J. Venom. Animals and Toxins: including Tropical Diseases**, v. 20, 2014.
- VERMEULEN, K., VAN BOCKSTAELE D. R., BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.**, v. 36, p. 131–149, 2003.
- WANG, D.; ZHANG, N.; YE, Y.; QIAN, J.; ZHU, Y.; WANG, C.. Role and mechanisms of microRNA 503 in drug resistance reversal in HepG2/ADM human hepatocellular carcinoma cells. **Mol. Med Rep.**, 2014.
- WANG, F.; LI, R.; XIE, M.; LI, A. The serum of rabbitfish (*Siganus oramin*) has antimicrobial activity to some pathogenic organisms and a novel serum L-amino acid oxidase is isolated. **Fish Shellfish Immunol**, v. 30, p. 1095–1108, 2011.
- WANG, J.; WU, A.; XU, Y.; LIU, J.; QIAN, X. M(2)-A induces apoptosis and G(2)-M arrest via inhibiting PI3K/Akt pathway in HL60 cells. **Cancer Lett.**, v. 283, p. 193–202, 2009.
- WANG, R.; KINI, R. M.; CHUNG, M. C. Rhodocetin, a novel platelet aggregation inhibitor from the venom of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper): synergistic and noncovalent interaction between its subunits. **Biochemistry**, v. 38, p. 7584–7593, 1999.
- WANG, R.; KONG, C.; KOLATKAR, P.; CHUNG, M. C. A novel dimer of a C-type lectin-like heterodimer from the venom of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper). **FEBS Lett**, v. 508, p. 447–453, 2001.
- WARRELL, D. A.; LOOAREESUWAN, S.; THEAKSTON, R. D.; PHILLIPS, R. E.; CHANTHAVANICH, P.; VIRAVAN, C.; SUPANARANOND, W.; KARBWANG, J.; HO, M.; HUTTON, R. A. Randomized comparative trial of three monospecific antivenoms for bites by the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) in southern Thailand: clinical and laboratory correlations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 35, p. 1235–1247, 1986.
- WEI, J. F.; YANG, H. W.; WEI, X. L.; QIAO, L. Y.; WANG, W. Y.; HE, S. H. Purification, characterization and biological activities of the L-amino acid oxidase from *Bungarus fasciatus* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 262–71, 2009.
- WEI, X. L.; WEI, J. F.; LI, T.; QIAO, L. Y.; LIU, Y. L.; HUANG, T.; HE, S. H. Purification, characterization and potent lung lesion activity of an L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* snake venom. **Toxicon**, v. 50, p. 1126–1139, 2007.

- WHO, World Health Organization (2007). Rabies and Envenoming. A neglected public health issue: Report of a consultative meeting. Geneva: WHO, Available: http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/rabies.pdf. Acesso em: 26/02/2013.
- WHO, World Health Organization (2011). Department of Communicable Disease Surveillance. World Health Organization, Department of Essential Drugs and Medicines Policy. Available: <http://www.who.int/en/> Acesso em: 13/05/2012
- WHO, World Health Organization (2010), acesso em 18/09/2014 <http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/default.htm>
- YANG, C. A.; CHENG, C. H.; LIU, S. Y.; LO, C. T.; LEE, J. W.; PENG, K. C.. Identification of antibacterial mechanism of L-amino acid oxidase derived from *Trichoderma harzianum* ETS 323. **FEBS J.**, v. 278, p. 3381-3394, 2011.
- ZAMUNER, S. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; MUSCARA, M. N.; TEIXEIRA, S. A.; TEIXEIRA, C. F. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. **Toxicon**, v. 39, p. 1505-1513, 2001.
- ZAMUNER, S. R.; TEIXEIRA, C. F. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. **Mediators Inflamm.**, v. 11, p. 351-357, 2002.
- ZHANG, H.; TENG, M.; NIU, L.; WANG, Y.; LIU, Q.; HAO, Q.; DONG, Y.; LIU, P. Purification, partial characterization, crystallization and structural determination of AHP-LAAO, a novel L-amino acid oxidase with cell apoptosis-inducing activity from *Agkistrodon halys pallas* venom. **Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, v. 60, p. 974-977, 2004.
- ZHANG, L.; WEI, L. J. ACTX-8, a cytotoxic L-amino acid oxidase isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom, induces apoptosis in Hela cervical cancer cells. **Life Sci.**, v. 80, p. 1189-1197, 2007.
- ZHANG, L.; WU, W. T. Isolation and characterization of ACTX-6: a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon acutus* snake venom. **Nat. Prod. Res.**, v. 22, p. 554-563, 2008.
- ZHONG, S. R.; JIN, Y.; WU, J. B.; JIA, Y. H.; XU, G. L.; WANG, G. C.; XIONG, Y. L.; LU, Q. M. Purification and characterization of a new L-amino acid oxidase from *Daboia russellii siamensis* venom. **Toxicon**, v. 54, p. 763-771, 2009.
- ZIVNY, J.; KLENER, P. J. R.; PYTLIK, R. ANDERA, L.. The role of apoptosis in cancer development and treatment: focusing on the development and treatment of hematologic malignancies. **Curr. Pharm. Des.**, v. 16, p. 11-33, 2010.
- ZOCCAL, K. F.; BITENCOURT, C. D. A. S.; SECATTO, A.; SORGI, C. A.; BORDON K. C. F.; SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C.; FACCIOLI, L. H. *Tityus serrulatus* venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators. **Toxicon**, v. 57, p. 1101-1108, 2011.
- ZOCCAL, K. F.; BITENCOURT, C. S.; SORGI, C. A.; BORDON, K. C. F.; SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C.; FACCIOLI, L. H. Ts6 and Ts2 from *Tityus serrulatus* venom induce inflammation by mechanisms dependent on lipid mediators and cytokine production. **Toxicon**, v. 61, p. 1-10, 2013.

ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; ZAMUNER, S. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon** v. 45, p. 335-346, 2005.

ZYCHAR, B. C.; DALE, C. S.; DEMARCHI, D. S.; GONÇALVES, L. R. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon** v. 55, p. 227-234, 2010.

Anexos

ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 52/2011
kms

Ribeirão Preto, 4 de julho de 2011.

À
PROFA. DRA. SUELY VILELA
Pós-graduanda Tássia Rafaella Costa
DACTB / FCFRP / USP

Prezada Senhora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 92ª Sessão Ordinária, realizada em 30/06/2011, o projeto de pesquisa intitulado "CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTUDO DOS MECANISMOS DE RESPOSTA AO DANO CELULAR CAUSADO PELA L-AMINOÁCIDO OXIDASE DE CALLOSELASMA RHODOSTOMA EM LINHAGENS CELULARES HUMANAS", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 218.

Informamos que conforme Carta Circular 003/2011 da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso e também o pesquisador responsável deverão rubricar todas as páginas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Ainda, de acordo com a Resolução 196/96, item IV.2, letra d, "o TCLE *deverá ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador*".

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,

PROP. DRª. MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP

ANEXO B

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.497.53.6), intitulado "Caracterização Funcional e Estudo dos Mecanismos de Resposta ao Dano Celular Causado pela L-Aminoácido Oxidase de *Calloselasma rhodostoma* em Linhagens Celulares Humanas", de autoria de **Tássia Rafaella Costa**, e de **Suely Vilela Sampaio** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 01/06/2011.

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.497.53.6), entitled: "Caracterização Funcional e Estudo dos Mecanismos de Resposta ao Dano Celular Causado pela L-Aminoácido Oxidase de *Calloselasma rhodostoma* em Linhagens Celulares Humanas", by **Tássia Rafaella Costa** and **Suely Vilela Sampaio**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, June 01, 2011.

Ribeirão Preto, 6 de junho de 2011.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro