UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Sistema de cocultura com as linhagens celulares humanas
HepG2 e HUVEC na investigação da genotoxicidade de
toxinas isoladas de *Bothrops jararacussu***

Ana Rita Thomazela Machado

**Ribeirão Preto
2017**

ANA RITA THOMAZELA MACHADO

Sistema de cocultura com as linhagens celulares humanas HepG2 e HUVEC na investigação da genotoxicidade de toxinas isoladas de *Bothrops jararacussu*

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

Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes

Ribeirão Preto

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Ana Rita Thomazela Machado
Machado, A.R.T.

Sistema de cocultura com as linhagens celulares humanas HepG2 e HUVEC na investigação da genotoxicidade de toxinas isoladas de *Bothrops jararacussu*
Ribeirão Preto: FCFRP, 2017

Número de Páginas: #90#

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo/USP. Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes

1. L-aminoácido oxidase; 2. Peçonha de serpente; 3. Ensaio do cometa; 4. Cocultura.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Rita Thomazela Machado

Sistema de cocultura com as linhagens celulares humanas HepG2 e HUVEC na investigação da genotoxicidade de toxinas isoladas de *Bothrops jararacussu*

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

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria
Greggi Antunes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Sebastião Carlos Machado** e **Ana Maria Thomazela Machado** por me ensinarem que sonhar é possível, que lutar é essencial e que realizar sonhos é uma das coisas mais gratificantes da vida. É e sempre será para vocês.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por mais um objetivo alcançado, por me guiar, iluminar, me fortalecer e me tranquilizar, ajudando-me a seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

À minha orientadora **Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes** pela oportunidade concedida, por me auxiliar em todas as dificuldades encontradas nesta trajetória, por dedicar-se tanto a minha evolução profissional e por ser o meu maior e melhor exemplo de pesquisadora e orientadora. Sou imensamente grata por ter me acolhido e caminhado ao meu lado nas minhas dificuldades. Muito obrigada professora.

À **Profa. Dra. Suely Vilela Sampaio**, por me receber em seu laboratório e não medir esforços para que o projeto caminhasse.

Aos funcionários do laboratório de Nutrigenômica **Joana D’Arc Castania Darin**, **Regislaine Valéria Burim** e **Jefferson Leandro Codognotto**, por me auxiliarem nos experimentos e principalmente pelo convívio e amizade. Ao funcionário do laboratório de Toxinas Animais **Sante Emmanuel Imai Carone**, pelo isolamento e purificação da proteína, sempre fazendo o possível para que o projeto se desenvolvesse da melhor forma.

Aos meus colegas de laboratório **Carla da Silva Machado** e **Diego Luis Ribeiro** por me receberem tão calorosamente e me introduzirem no mundo do *in vitro*. **Patrick Wellington Santos** e **Rone Aparecido de Grandis** pela convivência harmoniosa, por todo auxílio prestado e não menos importante, por fazer os dias mais agradáveis e felizes. **Livia Cristina Hernandes** meu exemplo de vida, perseverança e de jovem pesquisadora, obrigada pela honra de conviver contigo. Ao **Alexandre Ferro Aissa** o meu muito obrigada por cada incentivo quando tudo parecia ruim, pela disponibilidade em ajudar independentemente do problema e pelas suas belas correções e colocações.

À minha carona, companheira e sobretudo amiga **Camila Alessandra Mini**, você florzinha, é um grande presente que a USP me deu! Obrigada pela companhia de todos os dias, por ouvir meus lamentos, por me ajudar com tarefas do mestrado, por partilhar a minha vida com você e tornar nossas viagens mais prazerosas.

À **Tássia Rafaela Costa** obrigada por me ensinar as bases da Toxinologia, por me socorrer em todas as dificuldades e pelos bons momentos proporcionados. À minha fiel colaboradora **Maria Fernanda Hornos Carneiro** cuja relação é muito mais que trabalho, uma queridona com quem aprendo todos os dias.

Ao **Bruno Henrique Marinheiro**, meu companheiro de jornada e um dos meus maiores incentivadores. Obrigada por ser rígido quando necessário, por se interessar por coisas tão abstratas e principalmente por ser meu refúgio.

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP)** e aos seus funcionários pelo auxílio no desenvolvimento do projeto e pela acolhida.

Este projeto foi realizado com o apoio financeiro da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, por meio de concessão de bolsa de mestrado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** por meio do **Projeto Temático de Toxinas Animais – NAP-TOXAN-USP** (processo #2011/23236-4) pelo apoio financeiro concedido.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo apoio financeiro concedido.

Normalização Adotada

Este documento foi elaborado de acordo com:

Referências: Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) - NBR 6023

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. Diretrizes para apresentações de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso. São Paulo, 2016.

RESUMO

MACHADO, Ana Rita Thomazela. **Sistema de cocultura com as linhagens celulares humanas HepG2 e HUVEC na investigação da genotoxicidade de toxinas isoladas de *Bothrops jararacussu***. 2017. 90f. Dissertação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O carcinoma hepatocelular é um dos tipos de cânceres mais comuns em adultos com sua incidência aumentando mundialmente a cada ano. O tratamento curativo é o transplante de fígado, mas as muitas dificuldades encontradas para o procedimento faz com que a quimioterapia seja amplamente utilizada. Além disso, pode ocorrer quimiorresistência e muitos efeitos adversos, o que impulsiona a busca por novos compostos terapêuticos. L-aminoácido oxidases (LAAO) isoladas de peçonhas de serpentes têm demonstrado bons resultados de citotoxicidade em linhagens celulares tumorais, no entanto estes resultados representam sistemas *in vitro* em monocultura e estudos recentes demonstram que o microambiente tumoral tem um importante papel na transformação neoplásica, no crescimento e invasão do tumor e na resistência quimioterápica. Assim, avaliou-se uma LAAO purificada da peçonha de *Bothrops jararacussu* (BjussuLAAO-II) em células de carcinoma hepatocelular (HepG2) em monocultura e em cocultura com células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) com o objetivo de simular o microambiente tumoral, onde, normalmente, é observado mais de um tipo celular. A atividade citotóxica foi avaliada por meio do ensaio do MTT e do ensaio de sobrevivência clonogênica, a atividade genotóxica por meio do ensaio do cometa, a produção de espécies reativas de oxigênio por meio de fluorescência e os danos ao cromossomo por meio do ensaio do micronúcleo. Em células HepG2, em monocultura, todas as concentrações testadas (0,25 – 5,00 µg/mL) foram citotóxicas e aumentaram os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio. Verificou-se dano genotóxico na concentração de 5,00 µg/mL e não houve dano cromossômico. Quando cultivada em cocultura com células HUVEC, as concentrações de 1,00 e 5,00 µg/mL de BjussuLAAO-II foram citotóxicas às células HepG2 e aumentaram os níveis de espécies reativas de oxigênio. A concentração de 5,00 µg/mL induziu danos ao DNA e não houve danos aos cromossomos. Estes efeitos podem ser correlacionados ao aumento de espécies reativas de oxigênio intracelulares e as diferenças entre os resultados de mono e cocultura devido à simulação de parte do microambiente tumoral. Em monocultura de células HUVEC, todas as concentrações testadas foram citotóxicas, houve dano genotóxico nas concentrações de 1,00 e 5,00 µg/mL e nenhuma concentração testada induziu danos cromossômicos. Como há elevada citotoxicidade, danos ao DNA e indução de efeitos pró-oxidantes em células HepG2, BjussuLAAO-II representa um composto promissor no desenvolvimento de novos fármacos antitumorais.

Palavras-chave: L-aminoácido oxidase, peçonha de serpente, ensaio do cometa, cocultura.

ABSTRACT

MACHADO, Ana Rita Thomazela. **Co-culture system with the human cell lines HepG2 and HUVEC in the genotoxicity investigation of toxins isolated from *Bothrops jararacussu***. 2017. 90f. Dissertação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Hepatocellular carcinoma is one of the most common types of cancers in adults whose incidence increases worldwide each year. Liver chirurgic and transplantation is the best choice of treatment, but the many difficulties encountered in the procedure cause chemotherapy to be widely used. In addition, chemo resistance and many adverse effects can occur, which improves the search for new therapeutic molecules. L-amino acid oxidases (LAAO) isolated from snake venoms have demonstrated good cytotoxicity results in tumor cell lines, however these results represent *in vitro* monoculture systems and recent studies have shown that the tumor microenvironment plays an important role in neoplastic transformation in tumor growth and invasion and chemotherapeutic resistance. A LAAO purified from *Bothrops jararacussu* venom (BjussuLAA-II) was evaluated in hepatocellular carcinoma (HepG2) cells in monoculture and co-culture with human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) with the aim of simulating the tumor microenvironment, where more than one cell type is normally observed. Cytotoxic activity was assessed by the MTT assay and clonogenic survival assay, genotoxic activity by comet assay, reactive oxygen species production by fluorescence, and chromosome damage by the micronucleus assay. In HepG2 cells, in monoculture, all concentrations tested (0.25 - 5.00 µg/mL) were cytotoxic and increased intracellular levels of reactive oxygen species. Genotoxic damage at the concentration of 5.00 µg/mL was observed and there was no chromosomal damage. When cultured with HUVEC cells, concentrations of 1.00 and 5.00 µg/mL of BjussuLAA-II were cytotoxic to HepG2 cells and increased levels of reactive oxygen species. The concentration of 5.00 µg/mL induced DNA damage and there was no damage to the chromosomes. These effects can be correlated to the increase of intracellular reactive oxygen species and the differences between the mono and co-culture results due to the simulation of part of the tumor microenvironment. In HUVEC monoculture, all concentrations tested were cytotoxic, genotoxic damage at concentrations of 1.00 and 5.00 µg/mL, and no concentration tested induced chromosome damage. As there is high cytotoxicity, DNA damage and induction of pro-oxidant effects in HepG2 cells, BjussuLAAO-II represents a promising compound in the development of novel antitumor drugs.

Keywords: L-amino acid oxidase, snake venom, comet assay, co-culture.

Lista de figuras

- Figura 1.** Toxinas animais e marcadores do câncer. Fonte: Adaptado de CHAISAKUL et al., 2016.....5
- Figura 2.** Representação da reação de desidrogenação catalisada por L-aminoácido oxidases. Fonte: Adaptado de COSTA, et al. (2014)..8
- Figura 3.** Representação esquemática do sistema de inserto utilizado para a cocultura das linhagens HepG2 e HUVEC. Fonte: Acervo pessoal, Laboratório de Nutrigenômica - FCFRP, 2015.....21
- Figura 4.** Imagem do ensaio de sobrevivência clonogênica. Ensaio de sobrevivência clonogênica em placa de 6 poços com colônias de células HepG2. (A) células não tratadas (CN), (B) células tratadas com MMS 300 μ M (CP). Fonte: acervo pessoal, Laboratório de Nutrigenômica - FCFRP, 201525
- Figura 5.** Imagens de nucleoides capturados com o software CometAssay IV. (A) Nucleoide com ausência de dano ao DNA e (B) nucleoide com elevado grau de dano ao DNA. Fonte: Laboratório de Nutrigenômica – FCFRP. Captura: Carla da Silva Machado, 2015.....27
- Figura 6.** Fotomicrografia obtida no teste do micronúcleo *in vitro*. Coloração com laranja de acridina e aumento original de 1.000 x. Célula binucleada com micronúcleo. Fonte: Laboratório de Nutrigenômica – FCFRP, 2016. Captura: Lívia Cristina Hernandez.....29
- Figura 7.** Efeito da BjussuLAAO-II na viabilidade de células HepG2 e HUVEC. Viabilidade Celular (%) de células HepG2 (A, B) e HUVEC (C, D) após 24 horas ou 48 horas de tratamento com BjussuLAAO-II (0,25 – 5 μ g/mL). CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 μ M). Média $\pm$ desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).....32
- Figura 8.** Comparação da viabilidade celular de 0,25 μ g/mL de BjussuLAAO-II em células HepG2 e HUVEC em diferentes tempos de tratamento. Viabilidade Celular (%) de células HepG2 e HUVEC após 24 horas ou 48 horas de tratamento. CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 μ M). Média $\pm$ desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).....34
- Figura 9.** Efeito da BjussuLAAO-II em cocultura detectado por MTT. Viabilidade Celular (%) de células HepG2 em cocultura após 24 horas de tratamento com BjussuLAAO-II (0,25 – 5,00 μ g/mL). CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 μ M). Média $\pm$ desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).....35

Figura 10. Efeito citotóxico da BjussuLAAO-II em células HepG2 e HUVEC. Fração de sobrevivência (%) das células HepG2 e HUVEC. Sobrevivência clonogênica (%) de células HepG2 (A) e HUVEC (B) após 24 horas de tratamento com BjussuLAAO-II (0,25 – 5 µg/mL) e 7 dias de observação. CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 µM). Média ± desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).36

Figura 11. Comparação da citotoxicidade de 0,25 µg/mL de BjussuLAAO-II em células HepG2 e HUVEC em 24 horas de tratamento e 7 dias de observação. Fração de sobrevivência (%) das células HepG2 e HUVEC. CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 µM). Média ± desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).....37

Figura 12. Efeito citotóxico da BjussuLAAO-II em células HepG2 e HUVEC. Fração de sobrevivência (%) de células HepG2 após 24 horas de tratamento com BjussuLAAO-II (0,25 – 5,00 µg/mL) e 7 dias de observação. CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 µM). Média ± desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).....38

Figura 13. Porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides avaliada pelo ensaio do cometa. Porcentagem de DNA na cauda em células HepG2 (A) e HUVEC (B) após tratamento com a BjussuLAAO-II em diferentes concentrações por 4 horas. CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 µM). Média ± desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).....39

Figura 14. Porcentagem de DNA na cauda em células HepG2 cultivadas em cocultura com células HUVEC após tratamento com a BjussuLAAO-II em diferentes concentrações por 4 horas. CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 µM). Média ± desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).....40

Figura 15. Porcentagem de DNA na cauda em células HepG2 e células HUVEC após tratamento com a BjussuLAAO-II na concentração de 5 µg/mL por 4 horas. CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 µM). Média ± desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).....41

Figura 16. Níveis intracelulares de ERO em células HepG2 em monocultura. Níveis intracelulares de ERO em células HepG2 em 4 horas (A) e 24 horas (B) após tratamento com a BjussuLAAO-II em diferentes concentrações. u.a.: unidades aritrárias. CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (H₂O₂ 1,0 mM). Média $\pm$ desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).42

Figura 17. Níveis intracelulares de ERO em células HepG2 em cocultura com células HUVEC. Níveis intracelulares de ERO em células HepG2 em 4 horas (A) e 24 horas (B) após tratamento com a BjussuLAAO-II em diferentes concentrações em cocultura com células HUVEC. u.a.: unidades aritrárias. CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (H₂O₂ 1,0 mM). Média $\pm$ desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).43

Lista de tabelas

Tabela 1. Frequência de micronúcleos, índice de proliferação pelo bloqueio da citocinese, porcentagens de células binucleadas (% BN), e citotoxicidade em células HepG2 em monocultura tratadas com BjussuLAAO-II.44

Tabela 2. Frequência de micronúcleos, índice de proliferação pelo bloqueio da citocinese, porcentagens de células binucleadas (% BN), em células HUVEC em monocultura tratadas com BjussuLAAO-II.....45

Tabela 3. Frequência de micronúcleos, índice de proliferação pelo bloqueio da citocinese, porcentagens de células binucleadas (% BN), em células HepG2 em cocultura tratadas com BjussuLAAO-II.....45

Lista de abreviaturas e siglas

Akbu-LAAO	LAAO proveniente da peçonha de <i>Agkistrodon blomhoffii ussurensis</i>
BaltLAAO-I	LAAO proveniente da peçonha de <i>Bothrops alternatus</i>
BatxLAAO	LAAO proveniente da peçonha de <i>Bothrops atrox</i>
BjussuLAAO-II	LAAO proveniente da peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i>
CAS	<i>chemical abstract servisse</i>
CBPI	<i>cytokinesis-block proliferation index</i>
CCL2	citocina pertencente à família de quimiocinas CC – ligante 2
CR-LAAO	LAAO proveniente da peçonha de <i>Calloselasma rhodostoma</i>
CXCL16	citocina pertencente à família de quimiocinas CXC – ligante 16
DNA	ácido desoxirribonucleico
DMSO	dimetilsulfóxido
FAD	flavina adenina dinucleótido
FADH ₂	FAD reduzido
FAK	proteína quinase de adesão focal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMN	flavina mononucleotídeo
FS	fração de sobrevivência
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EP	eficiência do plaqueamento
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
H ₂ DCFDA	2',7'-dichlorofluorescein diacetato
HepG2	linhagem celular de hepatocarcinoma humano
HIF-1 α	fatores de hipóxia
HIV	<i>human immunodeficiency vírus</i>
HUVEC	linhagem de células endoteliais da veia umbilical humana
IL-8	interleucina 8
LAAO	L-aminoácido oxidase
LmLAAO	LAAO proveniente da peçonha de <i>Lachesis muta</i>
MMP2	sequência do primer de metaloproteinase 2
MMP9	sequência do primer de metaloproteinase 9
MMS	metanossulfonato de metila
MNVit	micronúcleo <i>in vitro</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i>
NF- κ B	Complexo proteico que regula a transcrição do DNA, produção de citocinas e sobrevivência celular
OH-LAAO	LAAO isolada da peçonha de <i>Ophiophagus hannah</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
PBS	<i>phospate buffer saline</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
pl	ponto isoelétrico
PI3K/Akt	via de regulação de ciclo celular

SV-LAAO
VASH2
VEGF

LAAO proveniente da peçonha de serpentes
gene Vasohibin 2
vascular endothelial growth factor

Sumário

Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas	vi Erro! Indicador não definido.
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Carcinoma hepatocelular.....	1
1.2 Toxinas animais.....	4
1.2.1 L-aminoácido-oxidase.....	7
1.3 Sistema de cocultura celular.....	11
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Agentes químicos e reagentes	19
3.2 Toxina.....	19
3.2.1 Atividade enzimática da L-aminoácido oxidase	20
3.3 Linhagens celulares	20
3.4 Cocultura	20
3.5 Ensaio biológicos	21
3.5.1 Ensaio de citotoxicidade	21
3.5.1.2 Ensaio do MTT em cocultura	22
3.5.2 Ensaio de sobrevivência clonogênica.....	23
3.5.3 Ensaio do cometa	25
3.5.3.1 Ensaio do cometa em monocultura	25
3.5.3.2 Ensaio do cometa em cocultura	27
3.5.4 Determinação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	27
3.5.4.1 Determinação dos níveis intracelulares de ERO em monocultura ...	27
3.5.4.2 Determinação dos níveis intracelulares de ERO em cocultura	28
3.5.5 Ensaio do micronúcleo	28
3.5.5.1 Ensaio do micronúcleo em monocultura	28
3.5.5.2 Ensaio do micronúcleo em cocultura	30

3.6	Análise estatística	30
4.	RESULTADOS.....	32
4.1	BjussuLAAO-II induz citotoxicidade em células HepG2 e HUVEC.....	32
4.1.1	Citotoxicidade em células HepG2 e HUVEC em monocultura.....	32
4.1.2	Citotoxicidade em células HepG2 cultivadas em cocultura com células HUVEC	34
4.2	BjussuLAAO-II diminui a fração de sobrevivência em células HepG2 e HUVEC	36
4.2.1	BjussuLAAO-II diminui a fração de sobrevivência em células HepG2 e HUVEC em monocultura.....	36
4.2.2	BjussuLAAO-II diminui a fração de sobrevivência em células HepG2 em cocultura.....	38
4.3	BjussuLAAO-II induz danos ao DNA em células HepG2 e HUVEC	39
4.3.1	BjussuLAAO-II induz danos ao DNA em células HepG2 e HUVEC em monocultura.....	39
4.3.2	BjussuLAAO-II induz danos ao DNA em células HepG2 cultivadas em cocultura com células HUVEC.....	40
4.4	BjussuLAAO-II induz a geração de espécies reativas de oxigênio em células HepG2 e HUVEC	41
4.4.1	BjussuLAAO-II induz a geração de espécies reativas de oxigênio em células HepG2 e HUVEC em monocultura.....	42
4.4.2	BjussuLAAO-II induz a geração de espécies reativas de oxigênio em células HepG2 em cocultura com células HUVEC.....	43
4.5	BjussuLAAO-II não induz danos cromossômicos	44
5.	DISCUSSÃO	47
6.	CONCLUSÕES	57
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
	REFERÊNCIAS.....	60

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que aflige o ser humano há muito tempo, sendo que sua ocorrência é destacada a partir do século XIX para se tornar atualmente uma “doença da civilização” (CHEN e MALHOTRA, 2015; BECHOHRA et al., 2016). É uma doença complexa de uma série de doenças relacionadas em que as células de um tecido específico já não respondem plenamente aos sinais que regulam a diferenciação celular, a sobrevivência, a proliferação e a morte. Como resultado, estas células se acumulam e proliferam dentro do tecido, causando danos locais, inflamação e formando tumores (CÂNCER, 2016). Nem todos os tumores são malignos, mas estes têm capacidade de invasão em tecidos adjacentes podendo atingir a corrente sanguínea e/ou linfática e assim iniciar o processo de metástase ou câncer secundário (CHACKO e SAMANTA, 2016). É inquestionável que o câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo e, portanto, um problema de saúde pública especialmente em países subdesenvolvidos. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer “José Alencar Gomes da Silva”, é esperado para as próximas décadas, um aumento de 20 milhões de novos casos em países subdesenvolvidos (INCA, 2015). Dentre os tipos de cânceres com maior número de casos, o carcinoma hepatocelular é considerado o quinto tipo de câncer mais prevalente no mundo.

1.1 Carcinoma hepatocelular

O fígado é o maior órgão glandular e lobular do corpo humano e responsável pelo metabolismo primário de muitas substâncias. Doenças ou lesões no órgão podem comprometer este processo e levar a acumulação de compostos tóxicos no organismo (CHACKO e SAMANTA, 2016). O mecanismo envolvido na hepatocarcinogênese é complexo e multifatorial. Pode ser iniciado por estresse oxidativo, inflamação crônica e morte celular seguida de mutação em células somáticas que levam a sua proliferação anormal. A patogenia molecular envolve diferentes fatores ambientais juntamente com aberrações e alterações genéticas e epigenéticas (CHACKO e SAMANTA, 2016; DUTTA e MAHATO, 2017). O câncer de fígado pode ser classificado em duas categorias: primário e secundário (ou metastático – originado em outro órgão). Dentre todos os tipos de cânceres primários, o carcinoma hepatocelular

é o de maior relevância. Também chamado de hepatocarcinoma, é um câncer de fígado primário que atinge os hepatócitos. Corresponde de 80 a 90% dos casos de câncer de fígado, sua incidência aumenta 3-9% por ano mundialmente, é o quinto tipo de câncer com maior número de mortes no mundo e sua prevalência é cerca de três vezes maior em homens do que em mulheres (ACHARYA, 2014; CHACKO e SAMANTA, 2016; HSIEH et al., 2016).

Quase todos os carcinomas hepatocelulares ocorrem quando há cirrose hepática ou fibrose no fígado, assim qualquer doença que conduza a cirrose é considerada um fator de risco. Os principais fatores de risco são: infecção por vírus de hepatite B ou C, etilismo e síndrome metabólica. Outros cofatores incluem a ingestão de aflatoxinas e o tabagismo. No mundo, mais da metade dos casos são decorrentes de complicações por infecção de hepatite B. Nestes pacientes, o sexo, a idade avançada, a co-infecção com HIV (*human immunodeficiency vírus*), diabetes e obesidade aumentam o risco de desenvolvimento de carcinoma (CHACKO e SAMANTA, 2016; HSIEH et al., 2016; LLOVET et al., 2016; SCHUTTE et al., 2016; DHUNGEL et al., 2017; DUTTA e MAHATO, 2017).

No Brasil, um levantamento epidemiológico de 2009 com 1405 pacientes e 29 centros oncológicos demonstrou que a média de idade para carcinoma hepatocelular era de 59 anos e 78% eram homens. De todos os pacientes, 98% tinham cirrose, sendo o vírus da hepatite C a principal etiologia, seguido do vírus da hepatite B e álcool. O número de casos de carcinoma hepatocelular vem aumentando no país devido ao consumo de aflatoxinas e ao aumento de esteatose hepática não alcoólica (KIKUCHI et al., 2013). Quimioembolização é a principal terapia em estágios iniciais e intermediários da doença no Brasil (KIKUCHI et al., 2013). A vasta gama de condições de predisposição associadas a sobreposição de sintomas clínicos dificultam o diagnóstico. Assim, a maioria dos pacientes são diagnosticados em estágios avançados da doença e, frequentemente, não tem tratamento cirúrgico (CHACKO e SAMANTA, 2016; HSIEH et al., 2016; LLOVET et al., 2016; SCHUTTE et al., 2016; DHUNGEL et al., 2017; DUTTA e MAHATO, 2017).

O tratamento depende, portanto, do estágio em que a doença se encontra e da qualidade do fígado do paciente. A classificação do Hospital Clínico de Câncer de Fígado em Barcelona - amplamente utilizada na classificação deste tipo de tumor (CHACKO e SAMANTA, 2016) - diferencia estágios primários e avançados da doença e indica qual a melhor forma de tratamento. Os tratamentos podem ser divididos em

curativos e paliativos. Dentre os curativos, tem-se a cirurgia de remoção do tumor seguida ou não de transplante e ablação ou embolização; os paliativos incluem a radiação, terapia-alvo e quimioterapia (CHACKO e SAMANTA, 2016; HSIEH et al., 2016; LLOVET et al., 2016). Quando elegível, o paciente que faz transplante de fígado tem em média 90% de taxa de cura, mas a escassez de doadores limita sua ampla aplicabilidade. O transplante é considerado hoje como a melhor opção de cura, mas é limitado ao estágio do tumor, à saúde do paciente e à falta de doadores, além da possibilidade de rejeição, de infecções oportunistas e imunossupressão. A ressecção ou ablação tumoral também é indicada em estágios iniciais da doença, mas o câncer pode reincidir, o que faz necessário o desenvolvimento de fármacos específicos e medicina personalizada (CHACKO e SAMANTA, 2016).

O sorafenib, um inibidor de multiquinase oral, é o único fármaco disponível para tratamento, aumentando a sobrevida do paciente de 2 a 3 meses e só pode ser usado em pacientes com a função hepática preservada. A sua eficácia provavelmente está relacionada a indução de morte das células cancerosas e também por atuar sobre o microambiente tumoral. Atua sobre a inibição de genes como *VEGFR-1*, *VEGFR-2*, *VEGFR-3*, *PDGFR-β*, *RAF*, *RET* e *FLT-3*, relacionados à proliferação e angiogênese tumoral (FITZMORRIS et al., 2015; LLOVET et al., 2016; DHUNGEL et al., 2017; DUTTA e MAHATO, 2017).

O estágio avançado do carcinoma hepatocelular aumenta a disfunção hepática, tornando a entrega do medicamento ineficiente, o que pode acarretar no desenvolvimento de quimiorresistência e muitos efeitos adversos, dificultando a eficiência da terapia (DUTTA e MAHATO, 2017). A quimiorresistência juntamente com o aumento na mortalidade e morbidade combinadas à escassez de tratamentos para os estágios avançados da doença impulsionam a busca por novas moléculas capazes de tratar a doença na quimioterapia (FITZMORRIS et al., 2015; LLOVET et al., 2016; DHUNGEL et al., 2017; DUTTA e MAHATO, 2017).

Neste âmbito, recursos naturais representam uma boa fonte de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos. Nas três últimas décadas, aproximadamente 80% de todas as novas moléculas aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento de câncer são provenientes de produtos naturais – que são pequenas moléculas produzidas naturalmente por qualquer organismo incluindo, metabólitos primários e secundários. Podem ser moléculas muito pequenas, como a ureia, e estruturas complexas o Taxol. São isolados em pequenas

quantidades e de interesse biológico e químico (NATURAL..., 2017) – o que corrobora com a literatura que tem demonstrado muitos compostos naturais bioativos eficientes na prevenção e no tratamento do câncer por meio de diferentes vias de sinalização celular (TRENDOWSKI, 2015; BISHAYEE e SETHI, 2016; NEWMAN e CRAGG, 2016). Assim, a biodiversidade de peçonhas e toxinas torna-as uma fonte importante a partir da qual novos medicamentos podem ser desenvolvidos (JAIN e KUMAR, 2012; CALDERON et al., 2014; CHAISAKUL et al., 2016).

1.2 Toxinas animais

As toxinas são produzidas pelos organismos vivos como um sistema de defesa, utilizadas para induzir morte ou injúrias em outros seres vivos. Estas toxinas, ou biotoxinas, são produzidas por plantas, animais e micro-organismos. Têm efeito toxicológico e farmacológico podendo ser usadas como fontes naturais para o desenvolvimento de novos fármacos no tratamento de vários problemas patofisiológicos, tais como o câncer e as doenças cardiovasculares (VONK et al., 2011; LIU et al., 2014; BECHOHRA et al., 2016).

As células cancerosas são capazes de crescer de maneira desordenada e de atingir outros tecidos originando metástase. A Figura 1 correlaciona determinados componentes das peçonhas que atuam sobre os marcadores do câncer dificultando a progressão tumoral por meio da interrupção do ciclo celular e inibição da proliferação e indução de apoptose.

Figura 1 – Toxinas animais e marcadores do câncer

Fonte: Adaptado de CHAISAKUL et al., 2016.

Na literatura, há diversos estudos que relatam elevada toxicidade destas toxinas em diversos tipos celulares *in vitro* como uma desintegrina, Obtustatin, cuja ligação específica à integrina $\alpha 1\beta 1$ inibe a adesão e migração das células tumorais de músculo sarcoma (S-180); a Jararhagin, uma metaloprotease, capaz de inibir a proliferação celular de células de melanoma em ratos (B16F10) por induzir apoptose via capase-3. Outro exemplo é OH-LAAO, uma toxina de serpente, que induziu apoptose por meio da geração de peróxido de hidrogênio alterando a expressão gênica de células de câncer de próstata (PC-3). A crotoxina (neurotoxina isolada da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*), é uma toxina já utilizada na clínica como adjuvante no tratamento do câncer é cuja utilização minimiza o consumo de analgésicos (CHAISAKUL et al., 2016).

Um notável exemplo de um medicamento obtido a partir de produto natural é o captopril. Este fármaco é um inibidor da enzima conversora de angiotensina e indicado para o tratamento da hipertensão arterial. O desenvolvimento do captopril foi baseado em estudos com pequenos peptídeos isolados da peçonha de *Bothrops jararaca* da América do Sul, envolvendo pesquisadores ingleses e o brasileiro Sérgio Ferreira, que exploraram o conceito de que a bradicinina poderia reduzir a pressão sanguínea pelo bloqueio da enzima conversora de angiotensina. O resultado foi o captopril introduzido no tratamento para os pacientes hipertensos em 1981 (HARVEY, 2014). Este caso é

um ótimo exemplo da aplicação da pesquisa básica realizada nas universidades pelos cientistas, com a transferência de conhecimentos da academia para a indústria farmacêutica ou de biotecnologia (FERREIRA, 1994; VONK et al., 2011).

Outros dois medicamentos desenvolvidos com base em toxinas animais são os anticoagulantes Integrilin® e o Aggrastat®. O Integrilin® foi aprovado para uso nos Estados Unidos em 1998 e sua substância ativa é a eptifibatida, que foi isolada da peçonha da cascavel-anã *Sistrurus miliarius barbouri*. O Integrilin® impede as plaquetas de se agregarem ao bloquear os receptores da glicoproteína IIb/III, reduzindo assim o risco de formação de coágulos sanguíneos e prevenindo o ataque cardíaco (O'SHEA; TCHENG, 2002). O tirofiban, substância ativa do Aggrastat®, é baseado na ação da desintegrina encontrada na peçonha da víbora *Echis carinatus* e é indicado para pacientes com angina instável e na prevenção da ocorrência de eventos cardíacos isquêmicos (MARCINKIEWICZ, 2005).

Outros medicamentos com base nas neurotoxinas isoladas de peçonhas estão em fase de desenvolvimento nos Estados Unidos. Como exemplo podemos citar o acobrotoxin isolado da peçonha de *Naja nivea* e o acobratoin, isolado da peçonha de *Naja kaouthia*. Estudos *in vitro*, demonstram que ambos estimulam a produção de citocinas e interferon pelas células T humanas, podendo ser incluídos em futuras triagens clínicas para esclerose múltipla e doenças neurodegenerativas (HARVEY, 2014).

Atualmente, os avanços alcançados na área de Toxinologia - área da Toxicologia que estuda animais peçonhentos, plantas e micro-organismos a fim de entender os mecanismos de ação sobre seus alvos. Investiga a composição bioquímica, genômica e proteômica de toxinas e venenos para o desenvolvimento de antídotos no ofidismo e exploram seu potencial farmacológico (TOXINOLOGY, 2017) - permitem que os pesquisadores estudem os processos de farmacodinâmica, toxicidade e os efeitos biológicos e fisiológicos das peçonhas e toxinas com a proposta de identificar possíveis alvos terapêuticos para intervenção e tratamento de diferentes doenças humanas (DHANANJAYA e SIVASHANKARI, 2015).

As peçonhas de serpentes provavelmente são as peçonhas mais complexas que existem. São compostas por vinte ou mais componentes diferentes, sendo a maior porcentagem do seu peso seco constituído por proteínas, com uma grande variedade de enzimas, e a parte não proteica composta de carboidratos, metais, lipídeos, aminoácidos livres e nucleotídeos (GUO et al., 2012; VYAS et al., 2013; IZIDORO et

al., 2014). Estas apresentam uma diversidade de efeitos biológicos tais como neurotoxicidade, cardiotoxicidade, miotoxicidade, efeitos hemorrágicos, anticoagulantes, antiparasitários, antibacterianos e efeito antitumoral (COSTA TORRES et al., 2010; GUO et al., 2012). São constituídas de metaloproteinases, desintegrinas, fosfolipase A₂, lectinas e L-aminoácido oxidases (LAAOs) (DHANANJAYA e SIVASHANKARI, 2015).

1.2.1 L-aminoácido-oxidase

As L-aminoácido oxidases (LAAOs), são enzimas amplamente distribuídas em diferentes espécies animais e vegetais. Podem ser encontradas em plantas que utilizam a amônia como fonte de nitrogênio no metabolismo celular ou em animais como insetos, fungos, bactérias e serpentes (GUO et al., 2012; COSTA et al., 2014; IZIDORO et al., 2014). Na sua maioria, são enzimas termo lábeis e podem ser inativadas com mudança temperatura, pH e composição do tampão em que estão solubilizadas (CALDERON et al., 2014).

As LAAOs geralmente são purificadas na sua forma ácida ou básica com ponto isoelétrico entre 4,4 e 8,5 com massa molecular entre 120 a 150 kDa na sua forma nativa e de 55 a 66 kDa na sua forma monomérica. Formas acídicas, neutras e básicas podem coexistir em uma mesma peçonha (CALDERON et al., 2014; COSTA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2016). Foram descritas primeiramente em 1944 em peçonha de *Vipera aspis*, mas somente em 1979 é que Iwanaga e Suzuki descreveram o seu potencial observando a sua elevada especificidade química com L-aminoácidos (IZIDORO et al., 2014).

Geralmente LAAOs são proteínas hemodiméricas com cofatores FAD (flavina adenina dinucleotídeo) ou FMN (flavina mononucleotídeo) covalentemente ligadas às suas estruturas químicas. A coloração amarelada da peçonha é devido à presença de flavina que também contribui para sua toxicidade no envenenamento devido à produção de peróxido de hidrogênio, que ocasiona efeito pró-oxidante e que conduz a um estresse oxidativo, definido com uma falta de balanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio e o sistema antioxidante (HALLIWELL, 2007). Quantitativamente há diferenças na concentração de flavina na peçonha intra e interespecies, o que provoca uma alteração na cor da mesma (IZIDORO, et al., 2014).

Estão associadas a alterações na função plaquetária e são capazes de induzir morte celular por apoptose em diversos tipos celulares, além de apresentarem efeitos antimicrobianos e antiparasitários já relatados na literatura (COSTA et al., 2014; ABDELKAFI-KOUBAA et al., 2016; CHAISAKUL et al., 2016).

São proteínas que catalisam desaminação oxidativa estereoespecífica de substratos L-aminoácidos em α -cetoácidos com produção de amônia e peróxido de hidrogênio (ALVES et al., 2008; JAIN e KUMAR, 2012; IZIDORO et al., 2014). O ciclo catalítico inicia-se com a meia-reação redutora envolvendo a conversão de FAD em FADH₂ e, concomitantemente, 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 FADH₂ com o oxigênio molecular produzindo peróxido de hidrogênio (Figura 2) (COSTA et al., 2014).

Figura 2 – Representação da reação de desidrogenação catalisada por L-aminoácido oxidases

Fonte: Adaptado de COSTA et al., 2014.

Peçonhas de serpentes das famílias Viperidae, Crotalidae e Elapidae contêm de 1 a 9% de LAAOs (COSTA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2016). LAAOs isoladas de peçonhas de serpentes (SV-LAAOs – *snake venom L-aminoacid oxidases*) têm atraído grande interesse científico devido ao seu potencial farmacológico e têm sido descritas na literatura como capazes de induzir morte celular em diferentes linhagens celulares humanas *in vitro*, tais como HL-60 (leucemia promielocítica humana), Jurkat (leucemia T aguda), B16-F10 (melanoma) e PC12 (feocromocitoma murino), bem como em células não tumorais (linfócitos e macrófagos) (ALVES et al., 2008; ZHANG

e WU, 2008). Da mesma forma, BI-LAAO, isolada de *Bothrops leucurus*, apresentou citotoxicidade nas linhagens celulares humanas MKN-45 (câncer gástrico), HUTU (adenocarcinoma de duodeno), RKO (câncer colo-retal) e fibroblasto LL-24 (NAUMANN et al., 2011).

Outros resultados demonstram que SV-LAAOs parecem estar envolvidas com a inibição de metástase mediante a prevenção de agregação plaquetária e ativação de fagócitos interrompendo a adesão das células tumorais levando a indução de apoptose. OH-LAAO (isolada da peçonha de *Ophiophagus hannah*) possui atividade antitumoral específica em tumor xenográfico de mama por meio da indução da via intrínseca e extrínseca da apoptose e alteração de 178 genes sendo 27 relacionados a efeitos citotóxicos e apoptóticos, destes, 16 estão super expressos e 9 tiveram sua expressão diminuída (FUNG et al., 2015; CHAISAKUL et al., 2016).

Estas proteínas exercem efeitos antitumorais por meio da geração de espécies reativas de oxigênio, ou pela indução de apoptose ou ainda por inibição da agregação plaquetária (GUO et al., 2012). Portanto, os mecanismos pelos quais SV-LAAOs exercem seus efeitos não estão totalmente esclarecidos, mas estudos relatam que estes podem estar associados à produção de peróxido de hidrogênio que desestabilizam a membrana mitocondrial da célula, induzindo morte celular (BURIN, 2015). Muitas LAAOs já têm seus efeitos biológicos demonstrados na literatura e correlacionam a morte celular e indução de apoptose com a produção de peróxido de hidrogênio, que induz a alteração da expressão gênica. O excesso de peróxido de hidrogênio na superfície celular desencadeia o processo de apoptose que pode ser inibido na presença de antioxidantes, como a catalase (enzima que degrada H_2O_2 em H_2O e O_2) ou sequestradores de peróxido de hidrogênio (CALDERON et al., 2014; COSTA et al., 2014; BURIN, 2015; RIBEIRO et al., 2016).

Assim, os mecanismos de citotoxicidade podem envolver dois processos: apoptose e necrose. A morte celular por necrose está associada à perda precoce da integridade da membrana plasmática, levando a um colapso da homeostase interna, extravasamento do conteúdo celular e, conseqüentemente, a uma ativação da resposta inflamatória. Isto diferencia o processo de morte por necrose e apoptose, já que nesta última observa-se a conservação da integridade da membrana plasmática, permitindo a eliminação da célula sem a ativação da resposta inflamatória (RAFFRAY e COHEN, 1997). Já a apoptose é uma forma distinta e importante de morte celular programada determinada geneticamente, que resulta na eliminação de células

(ELMORE, 2007). Este processo ocorre durante o desenvolvimento normal e envelhecimento como um mecanismo fisiológico essencial para manutenção da homeostase em populações de células nos tecidos e, além disso, pode ocorrer como um mecanismo de defesa em reações imunológicas ou quando as células sofrem danos causados por agentes nocivos ou por doenças (NORBURY e HICKSON, 2001). Neste mecanismo de defesa, o processo apoptótico elimina células com danos irreversíveis no material genético ou com defeitos em sua replicação, pois estes podem levar ao estabelecimento de mutações, e o acúmulo destas pode resultar no surgimento de algumas doenças, como o câncer. Em células cancerosas, observa-se frequentemente a inibição de genes relacionados a este processo (BURHANS et al., 2003).

SV-LAAOs induzem apoptose em células endoteliais e inibem a angiogênese o que sugere seu uso na busca por novos tratamentos de câncer (GUO et al., 2012). O mecanismo de indução de apoptose por peróxido de hidrogênio produzido por SV-LAAOs é diferente da indução de apoptose por peróxido de hidrogênio exógeno - as alterações morfológicas são diferentes entre os dois mecanismos. A indução de apoptose por SV-LAAOs é enzimática, por meio da geração de espécies radicais de oxigênio durante a conversão do aminoácido em iminoácido, há ativação das vias das caspases e parecem estar relacionadas na alteração do ciclo celular em células cancerosas (GUO et al., 2012; COSTA et al., 2014). Muitos trabalhos têm sido publicados com ênfase na avaliação de pontos específicos de metabolismo tumoral, como aspectos imunológicos e indução de apoptose. Proliferação celular não é o único evento alvo do tratamento quimioterápico, a capacidade do tumor de invasão em tecidos adjacentes e a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) também podem ser usados como alvo de tratamento (CALDERON et al., 2014).

Apesar dos resultados favoráveis na avaliação dos efeitos citotóxicos e mutagênicos de toxinas isoladas de peçonha de serpentes, estes, descritos na literatura, representam sistemas *in vitro* em monocultura e estudos recentes têm demonstrado que o microambiente tumoral tem um importante papel na transformação neoplásica, no crescimento e invasão do tumor e na resistência quimioterápica. O microambiente tumoral é composto por células estromais como fibroblastos, células mesenquimais pluripotentes, células endoteliais e células imunes que promovem o suporte, invasão tumoral e modulam a resposta a fármacos. A comunicação intercelular entre as células normais e tumorais ocorrem via contato direto e

sinalização parácrina por meio de fatores de crescimento tumorais, citocinas e quimiocinas (FANG e DECLERCK, 2013; BOELEN et al., 2014; DAVEREY et al., 2015). Para isso, técnicas *in vitro* envolvendo a cultura simultânea de mais de uma linhagem celular, permitindo o compartilhamento do meio de cultura e, assim, mantendo a comunicação parácrina entre essas diferentes células, têm sido empregadas.

1.3 Sistema de cocultura celular

Procedimentos para a manutenção e estabelecimento de técnicas de células ou tecidos em cultura *in vitro* forneceram informações cruciais, tais como a compreensão da biologia básica do câncer. As culturas celulares permitem que as células de um determinado tumor cresçam e sejam mantidas no exterior do organismo. No entanto, é praticamente impossível reproduzir o microambiente tumoral utilizando uma única linhagem celular *in vitro* e assim o sistema de cocultura celular tem sido usado nas investigações sobre as interações entre as populações celulares e é fundamental nos estudos sobre as comunicações do tipo célula-célula (MORAES et al., 2012; GOERS et al., 2014; KATT et al., 2016). A cocultura está fundamentada no cultivo de duas ou mais linhagens celulares diferentes, que crescem simultaneamente, com algum grau de comunicação entre elas. São modelos tumorais de baixo custo importantes em testes preliminares de potenciais novos agentes antitumorais. Este modelo experimental permite o estudo em ambientes biomiméticos *in vitro*, uma vez que interações complexas são afetadas pelo meio extracelular. A presença de uma segunda linhagem em cultura pode contribuir para o crescimento e sucesso da mesma e ainda é possível controlar parâmetros do microambiente celular para melhor compreensão dos mecanismos biológicos. Isto apresenta grande relevância para a pesquisa de novos medicamentos, pois são modelos mais representativos do que acontece em situações *in vivo* (MORAES et al., 2012; GOERS et al., 2014; KATT et al., 2016).

A cocultura, potencialmente, apresenta uma série de características desejáveis em comparação com a monocultura, incluindo estabilidade, modularidade, robustez e escalabilidade. O contato entre as diferentes linhagens celulares na metodologia de cocultura está associado com inúmeras dificuldades técnicas, sendo que o método

mais indicado é a cocultura indireta, a qual apresenta vantagens de maior reprodutibilidade *in vitro* com a manutenção das populações celulares separadas por membranas porosas. As tecnologias disponíveis para a realização de cocultura mais comumente usadas, com algum grau de separação entre as células, incluem as placas *transwell*, plataformas de microfluidos e suportes sólidos, tais como: placas de Petri, hidrogéis ou *microarrays* (MIKI et al., 2012). As aplicações para o modelo de *transwell* incluem basicamente o estudo da influência de novas moléculas na invasão e migração celular e estudos da influência que um tipo celular pode exercer sobre outro (KATT et al., 2016). A complexidade do modelo é dependente dos objetivos. Por exemplo, a triagem preliminar de fármacos antitumorais pode ser realizada com a identificação das respostas celulares nas linhagens em cultura isoladamente, para a subsequente análise dos parâmetros nas coculturas com as diferentes linhagens em associação (GOERS et al., 2014; KATT et al., 2016).

Muitos pesquisadores recomendam o aumento do poder preditivo dos testes de genotoxicidade em células em cultura, por meio do aperfeiçoamento dos modelos *in vitro*. A maioria dos sistemas de monocultura celular usados para a realização dos testes de genotoxicidade não podem refletir adequadamente os processos de absorção e metabolização que ocorrem *in vivo*. A realização do *International Workshop on Genotoxicity Testing*, na Suíça em 2008, indicou a necessidade de desenvolvimento de novos métodos *in vitro*, pois a avaliação da genotoxicidade em monoculturas convencionais envolvem uma única linhagem celular (LE HÉGARAT; HUET; FESSARD, 2012). Alguns estudos na literatura mostram a aplicação do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo na avaliação da genotoxicidade *in vitro* no modelo de cocultura de linhagens celulares humanas, como exemplo, a cocultura de macrófagos com linfócitos irradiados com raios γ ou com íons carbônicos e de células de carcinoma pulmonar humano (A549) com macrófagos (FLAMAND et al., 2006; NEUSS et al., 2010; JANTZEN et al., 2012; DONG et al., 2015).

Linhagens de células imortalizadas estão disponíveis a partir de uma variedade de espécies, incluindo seres humanos, e são facilmente mantidas em cultura, por isso são preferencialmente consideradas para utilização em modelos *in vitro*. As linhagens de células humanas são amplamente utilizadas na investigação das propriedades tóxicas de agentes químicos, tanto novos quanto aqueles já em uso. Estes experimentos e resultados são importantes para as indústrias farmacêutica, química e de cosméticos. Os ensaios com células em cultura são alternativas ao uso de

animais, com as vantagens de baixo custo, em relação à manutenção dos animais e da alta reprodutibilidade (TYAKHT et al., 2014).

Considerando-se as vantagens de estudos *in vitro* frente às dificuldades encontradas em estudos *in vivo* e que o câncer de fígado primário, predominantemente o carcinoma hepatocelular e o hepatoblastoma, é um dos mais prevalentes dentre os tumores sólidos, os estudos *in vitro* utilizando as linhagens celulares HepG2 (células de carcinoma hepatocelular) e Hep3B (células de carcinoma hepatocelular com hepatite B) são frequentemente empregadas como modelos experimentais devido à sua disponibilidade, caracterização e por manter algumas características comuns aos hepatócitos (QIU et al., 2015).

A linhagem HepG2 é muito bem caracterizada e frequentemente utilizada como um modelo *in vitro* de respostas biológicas do fígado humano (KNASMULLER et al., 2004). Esta linhagem tem algumas das funções celulares semelhantes aos hepatócitos normais, como a expressão de receptores específicos de superfície celular, síntese e secreção de proteínas plasmáticas e, além disso, possuem a atividade de certas enzimas de metabolização de fase I e fase II relacionadas com a ativação e detoxificação de substâncias mutagênicas e genotóxicas e, assim, tem sido amplamente utilizada em estudos de genotoxicidade (DEHN et al., 2004; HOSHINA et al., 2013).

O crescimento tumoral é um processo dinâmico, amplamente induzível e facilitado por meio da secreção de fatores pró-angiogênicos como fator de crescimento derivado de plaquetas (*Platelet-derived growth factor* - PDGF), fatores de hipóxia (como o HIF-1 α) e fator de crescimento vascular endotelial (como o *vascular endothelial growth factor* - VEGF). Estas citocinas induzem angiogênese, que suporta o crescimento tumoral, garantindo-lhe oxigênio e nutrientes necessários para sobrevivência e facilitam o processo de metástase (VAN MOORST e DASS, 2011).

Dado o papel da angiogênese no crescimento e progressão do câncer, a vascularização do tumor tem sido proposta como uma importante estratégia terapêutica (XUE et al., 2013; KOTOKU et al., 2016). Entre as células endoteliais mais utilizadas em estudos de investigação sobre a complexidade do microambiente tumoral, está a linhagem HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana). Estas proporcionaram um modelo *in vitro* importante para grandes avanços na medicina molecular incluindo conhecimentos relevantes sobre eventos celulares e moleculares na fisiopatologia da aterosclerose, mecanismos de controle da angiogênese ou

neovascularização no tecido isquêmico, na embriogênese e, principalmente, no tecido tumoral (KOKURA et al., 1999; ZHANG et al., 2003; BURNS e DEPAOLA, 2005).

A presença de células endoteliais também está correlacionada com a indução de quimiossensibilização. No trabalho de Tavora et al. (2014) houve a identificação de um mecanismo no qual a deleção de uma proteína quinase de adesão focal (FAK) de células endoteliais induziu aumento da apoptose e redução da proliferação celular em tumores de camundongos tratados com o quimioterápico doxorrubicina.

Com isso, a utilização de cocultura de células tumorais como a HepG2 e células endoteliais, como a HUVEC, tem se mostrado uma ferramenta importante para a compreensão do microambiente tumoral. Xue et al. (2013) demonstraram em cocultura de HepG2 e HUVEC que o aumento na expressão do gene Vasohibin 2 (*VASH2*) em células HepG2 promoveu a proliferação e migração das células HUVEC, e a supressão da atividade do gene inibiu este efeito, indicando que a comunicação celular entre as duas linhagens desempenha um papel chave na progressão do câncer, promovido, provavelmente, pela vascularização do tecido tumoral. Sendo assim, a presença de uma linhagem celular endotelial em cocultura com uma linhagem tumoral, como a HepG2, simulando um microambiente tumoral, pode ajudar na compreensão dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade por meio de danos ao DNA, potencialmente induzidos por toxinas animais.

Ainda que as toxinas de serpentes sejam muito estudadas, a BjussuLAAO-II, não tem todo seu potencial farmacológico descrito na literatura. Os artigos disponíveis da toxina relatam o seu isolamento, caracterização, atividade antiparasitária (efetiva na morte de *Trypanosoma cruzi*), ação leishmanicida, tripanocida e citotóxica apenas na linhagem celular humana SK-BR-3 (adecorcinoma de mama) (TICLI, 2006; FRANCA et al., 2007; ULLAH et al., 2012). Estes poucos relatos sobre a atividade farmacológica desta toxina justifica o interesse em estudá-la.

Diante do exposto, neste projeto de pesquisa elucidou-se os efeitos citotóxicos, genotóxicos, oxidativos e mutagênicos de uma LAAO isolada e purificada da peçonha de *Bothrops jararacussu* (BjussuLAAO-II) em células HepG2 e HUVEC em monocultura e em cocultura.

A hipótese do presente estudo é que a BjussuLAAO-II, isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*, poderia apresentar diferentes efeitos citotóxicos, oxidativos, genotóxicos e mutagênicos em células HepG2 em monocultura quando comparados

ao tratamentos realizados em HepG2 em cocultura com células endoteliais HUVEC simulando parte do microambiente tumoral.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos, oxidativos e mutagênicos de uma L-aminoácido oxidase proveniente da peçonha de *Bothrops jararacussu*, BjussuLAAO-II, em células HepG2 cultivadas em monocultura e em cocultura com células HUVEC.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade de BjussuLAAO-II em células HepG2 e HUVEC cultivadas em monocultura e em células HepG2 cultivadas na presença de células HUVEC;
- Avaliar a atividade genotóxica de BjussuLAAO-II em células HepG2 e HUVEC em monocultura e em células HepG2 cultivadas na presença de células HUVEC;
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio em monocultura e em células HepG2 cultivadas na presença de células HUVEC;
- Avaliar a atividade mutagênica de BjussuLAAO-II em células HepG2 e HUVEC em monocultura e em células HepG2 cultivadas na presença de células HUVEC;
- Comparar os resultados encontrados no ensaio do MTT, cometa e micronúcleo em monocultura de HepG2 com os resultados encontrados em cocultura de HepG2 e HUVEC.

Material e métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Agentes químicos e reagentes

A BjussuLAAO-II isolada e purificada da peçonha de *Bothrops jararacussu* foi cedida pelo Laboratório de Toxinas Animais da FCFRP – USP e pelo Núcleo de Apoio à Pesquisa em Toxinas Animais (NAP-TOXAN-USP) armazenada a 4°C e diluída em PBS (*Phosphate Buffer Saline*) imediatamente antes de cada experimento. O meio de cultura RPMI 1640, mix de antibióticos (penicilina/estreptomicina/neomicina), soro bovino fetal, agarose de baixo ponto de fusão (CAS: 15517-022) e agarose de ponto de fusão normal (CAS: 9012-36-6) foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, California, Estados Unidos). O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, CAS 60-00-4), Triton X-100 (CAS 9002-93-1), azul de tripan (CAS 72-57-1), Tris (CAS 77-86-1), dimetilsulfóxido (DMSO, CAS D5879), Metanossulfonato de metila (MMS; CAS: 66-27-3), MTT (CAS: 57360-69-7) e 2',7'-dichlorofluorescein diacetato (H2DCFDA; CAS: 4091-99-0), o Giemsa (CAS: 51811-82-6) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos). A coloração das lâminas para o ensaio do cometa foi realizada com o corante GelRed™ (Biotium, Hayward, California, Estados Unidos) obtido da Uniscience (São Paulo, São Paulo, Brasil). Os insertos (Cat. 657641) utilizados na cocultura foram adquiridos da Greiner Bio-One (Áustria). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2 Toxina

A LAAO foi isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu* - proteína denominada BjussuLAAO-II no âmbito do projeto temático “Toxinas animais nativas e recombinantes: caracterização funcional, estrutural e molecular” Proc. Nº 2011/23236-4 no Laboratório de Toxinas Animais da FCFRP-USP. O isolamento foi realizado em três etapas cromatográficas, por meio de exclusão molecular, hidrofobicidade e afinidade. É uma proteína com massa molecular de 60,36 kDa, pl 3,9 e de elevada atividade enzimática (4884.53 U/mg/mim) (TICLI, 2006).

3.2.1 Atividade enzimática da L-aminoácido oxidase

Antes de cada análise, a atividade da LAAO foi determinada de acordo com (BORDON et al., 2015). A toxina foi analisada por meio da geração de peróxido de hidrogênio produzida na oxidação de L-leucina. A mistura reacional foi composta por L-leucina 2 mM, Tris-HCl 16 mM (pH 7,5), 4-aminoantipireno 0,04 mM, fenol 0,7 mM, 5 UI de peroxidase, e a BjussuLAAO-II em concentração de 2 mg/mL. Após 30 minutos de incubação no escuro em temperatura ambiente, a absorbância foi lida a 490 nm (Beckman DU-640). Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 nM de peróxido de hidrogênio por minuto (Apêndice A).

3.3 Linhagens celulares

A linhagem celular HepG2, de hepatocarcinoma humano, obtida da ATCC (*American Type Culture Collection*, Cat. Nº HB-8065), foi gentilmente cedida pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e já pertence ao estoque do Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP – USP. A linhagem celular HUVEC, de células endoteliais da veia umbilical humana, obtida da ATCC (*American Type Culture Collection*, Cat. Nº CRL-4053), foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP.

As células foram cultivadas conforme os procedimentos para manutenção de linhagens celulares propostos por Bal-Price e Coecke (2011), em garrafas de 25 cm² com 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de solução antibiótico-antimicótico (estreptomicina, gentamicina e neomicina) a 37°C em atmosfera 5% CO₂ em estufa Forma Series II, Water Jacket CO₂ Incubator (Thermo Fisher Scientific - Waltham, Massachusetts, USA). Os experimentos foram realizados entre a terceira e oitava passagem de descongelamento.

3.4 Cocultura

O método de escolha para o cocultivo celular foi em insertos utilizando-se placa de 6 poços com membrana de policarbonato porosa de 0,4 µm. Este protocolo baseia-

se na cultura simultânea de duas linhagens celulares no mesmo poço divididas, mecanicamente, por uma membrana porosa que permite o compartilhamento do mesmo meio de cultura e mantém a comunicação celular entre as duas linhagens. A linhagem celular HepG2 foi cultivada aderida ao fundo do poço na densidade 4×10^5 células por poço, enquanto a linhagem HUVEC foi cultivada no compartimento superior, numa densidade de 1×10^4 células por inserto de $0,4 \mu\text{m}$ conforme demonstrado na Figura 3.

Figura 3 – Representação esquemática do sistema de inserto que foi utilizado para a cocultura das linhagens HepG2 e HUVEC

Fonte: Acervo pessoal, Laboratório de Nutrigenômica - FCFRP, 2015.

As células HUVEC foram semeadas inicialmente e o fechamento da monocamada no inserto foi monitorado quanto ao valor da resistividade elétrica utilizando um minivoltímetro Millicell ERS® - Millipore. Foram considerados confluentes os inserts cuja resistividade elétrica transepitelial (RET) foi maior ou igual a $750 \Omega/\text{cm}^2$. Quando atingido este valor, as células HepG2 foram semeadas na parte debaixo do poço na placa de cocultura.

3.5 Ensaios biológicos

3.5.1 Ensaios de citotoxicidade

A viabilidade celular das culturas após exposição à toxina foi determinada pelo ensaio do MTT, de acordo com o protocolo descrito por Mosmann (1983) e Wang et al (2010). Este ensaio consiste na redução do sal de tetrazolium (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) em cristais de formazan (1-[4,5-dimetil-2-il]3,5-diphenylformazan) por enzimas desidrogenases que estão presente principalmente nas mitocôndrias (ex: enzima da membrana interna mitocondrial succinato desidrogenase) e também em outras organelas como o retículo endoplasmático de células viáveis (VAN TONDER et al., 2015). Estes cristais produzidos estão diretamente relacionados com a quantidade de células metabolicamente ativas e fornecem uma viabilidade estimada (BERNHARD et al., 2003).

3.5.1.1 Ensaio do MTT em monocultura

Inicialmente, as células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços na densidade de 1×10^4 células por poço para a linhagem HepG2 e 2×10^4 células por poço na linhagem HUVEC. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 37°C, 5 % CO₂ por 24 horas. Após o tempo de incubação, as células foram tratadas com a toxina nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 5,0 µg/mL, controle negativo (PBS) e controle positivo (MMS - 300 µM ou 33,039 mg/L). Após 24 ou 48 horas de tratamento, 20 µL de solução MTT (5 mg/mL) foi diluído em PBS e adicionado em cada poço. Por fim, as células foram reincubadas em estufa a 37°C, 5 % CO₂ por 3 horas. Após o tempo de incubação, as placas foram centrifugadas por 5 minutos a 1027 x g, retirado o sobrenadante e adicionado 200 µL de DMSO. A leitura da absorbância foi feita a 570 nm usando um leitor de microplacas (Biotek EL800 – Winooski, USA). A porcentagem de viabilidade celular foi obtida pela relação entre a absorbância de cada poço de tratamento e a absorbância dos poços das culturas controle negativo, consideradas com 100% de viabilidade celular. Cada experimento independente foi realizado em triplicata.

3.5.1.2 Ensaio do MTT em cocultura

As células HepG2 foram semeadas em placas de cultura de 6 poços na densidade de 4×10^5 células por poço e as células HUVEC semeadas na densidade de 1×10^4 células por inserto na membrana porosa de 0,4 μm . As placas foram incubadas em estufa a 37°C, 5 % CO_2 por 24 horas. Após o tempo de incubação, as células foram tratadas com a toxina nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 5,0 $\mu\text{g/mL}$, o controle negativo (PBS) e o controle positivo (MMS 300 μM). Após 24 horas de tratamento, 300 μL de solução MTT 5 mg/mL , diluído em PBS foi adicionado em cada poço, e as células foram reincubadas em estufa a 37°C, 5 % CO_2 por 3 horas. Após este período, as células HUVEC foram separadas e destacadas da membrana com auxílio de tripsina (0,25%). A avaliação da citotoxicidade em células HepG2 foi feita mediante leitura da absorbância a 570 nm em um leitor de microplacas (Biotek EL800 – Winooski, USA). A porcentagem de viabilidade celular em células HepG2 foi obtida pela relação entre a absorbância de cada poço de tratamento e a absorbância dos poços das culturas controle negativo, consideradas com 100% de viabilidade celular. As células HUVEC foram submetidas à análise de viabilidade celular pelo método de exclusão por Azul de Trypan. Cada experimento foi realizado em triplicata.

3.5.2 Ensaio de sobrevivência clonogênica

3.5.2.1 Ensaio de sobrevivência clonogênica em monocultura

O ensaio de sobrevivência clonogênica é um método *in vitro* bem estabelecido para testar a capacidade de sobrevivência e proliferação celular. Pode ser utilizado para determinar os efeitos de diversos compostos incluindo agentes quimioterápicos (FEDR et al., 2013).

O ensaio foi realizado segundo Franken et al (2006). As células HepG2 ou HUVEC foram semeadas em placa de cultivo de células de 6 poços na densidade de 2×10^5 com meio de cultura completo e incubadas por 24 horas a 37°C em CO_2 . Posteriormente, foram tratadas com BjuusuLAAO-II (0,25 – 5,00 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. PBS foi utilizado como controle negativo e MMS 300 μM como controle positivo. No final dos tratamentos, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, contadas e semeadas 150 células em placas de 6 poços em triplicata. Depois de 7 dias de cultura, as células foram lavadas com PBS e fixadas com metanol:ácido acético:água (1:1:8)

por 30 minutos. Foram, então, coradas com Giemsa:tampão fosfato (1:20) por 20 minutos e após lavagem com água destilada foram contadas em contador hematológico manual. Colônias contendo 50 células ou mais foram consideradas viáveis. O número de colônias do controle negativo foi considerado 100% e a eficiência do plaqueamento (EP) e a fração de sobrevivência (FS) foram calculados pela seguintes equações:

$$PE = \frac{\text{número de células contadas}}{\text{número de células semeadas}} \times 100$$

$$FS = \frac{\text{número de colônias em cada tratamento}}{\text{número de colônias semeadas} \times PE} \times 100$$

3.5.2.2 Ensaio de sobrevivência clonogênica em cocultura

O ensaio foi realizado segundo Franken et al. (2006) com modificações. As células HepG2 foram semeadas em placas de cultura de 6 poços na densidade de 4×10^4 células por poço e as células HUVEC semeadas na densidade de 1×10^5 células por inserto na membrana porosa de $0,4 \mu\text{m}$. As placas foram incubadas em estufa a 37°C , 5 % CO_2 por 24 horas. Posteriormente, foram tratadas com BjussuLAAO-II (0,25 – 5,00 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. PBS foi utilizado como controle negativo e MMS 300 μM como controle positivo. No final dos tratamentos, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, contadas em Countess® *Automated Cell Counter* (Life Technologies, Carlsbad, EUA) e semeadas 150 células em placas de 6 poços em triplicata. Depois de 7 dias de cultura, o protocolo seguiu o mesmo descrito para as células em monocultura.

Figura 4 – Imagem do ensaio de sobrevivência clonogênica

Ensaio de sobrevivência clonogênica placa de 6 poços com colônias de células HepG2. (A) células não tratadas (CN), (B) células tratadas com MMS 300 μ M (CP). Fonte: acervo pessoal, Laboratório de Nutrigenômica - FCFRP, 2017.

3.5.3 Ensaio do cometa

3.5.3.1 Ensaio do cometa em monocultura

O ensaio do cometa, foi realizado de acordo com o protocolo de Tice et al. (2000). O ensaio do cometa baseia-se na avaliação da migração do DNA em um gel de agarose. Quando removido o material extra nuclear da célula, esta é denominada nucleóide. Os nucleóides são submetidos a uma eletroforese que causa a migração do DNA danificado em direção ao ânodo formando o cometa, que contém na cabeça, o DNA que não foi danificado e na cauda a porção de DNA que sofreu danos. Desse modo, as células com maior dano ao DNA apresentam maior quantidade de DNA na cauda (WITTE et al., 2007). A mensuração da cauda do cometa na imagem captada pela câmera é feita por meio da intensidade da luz emitida (fluorescência) à partir da transformação de cada pixel (cinza) da imagem em sinais elétricos que serão transformados em microns. A intensidade da fluorescência proveniente da cabeça e da cauda do cometa são utilizados para calcular diferentes parâmetros de cometas (KUMARAVEL, et al., 2009).

Em cada poço de uma placa de 24 poços foi adicionado 2 mL de suspensão celular de células HepG2 ou células HUVEC na densidade de 2×10^5 células por mL. As células foram tratadas por 4 horas e as placas foram incubadas em estufa a 37°C

e 5 % CO₂ com diferentes concentrações das toxinas (0,25; 0,50; 1,00 e 5,00 µg/mL), o controle positivo foi tratado com MMS (300 µM) e o controle negativo recebeu PBS. Após o tempo de tratamento, a viabilidade celular das culturas foi avaliada pela técnica de exclusão por Azul de Tripan. Apenas as culturas que apresentaram viabilidade celular superior a 70% foram submetidas ao ensaio do cometa.

Todo o procedimento foi realizado na ausência de luz. No preparo das lâminas foram utilizados 20 µL de suspensão celular de cada linhagem celular (HepG2 ou HUVEC) homogeneizados com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão 20%. Uma alíquota de 80 µL de cada amostra foi depositada sobre lâminas previamente revestidas com agarose normal 1,5%.

As lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas a 4°C por 40 minutos. Após esse período, as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas em solução de lise recém preparada (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO, pH 13), e mantidas por 18 horas a 4°C.

Após a lise, as lâminas foram submersas em solução alcalina (NaOH 300 mM e EDTA 1mM, pH>13) por 20 minutos a 4°C, e, posteriormente, levadas à cuba de eletroforese em banho de gelo. A eletroforese foi conduzida em solução alcalina (300 mM e EDTA 1mM, pH>13) por 20 minutos, com voltagem (0,87 V/cm) e amperagem (300 mA) constantes. Após a eletroforese, as lâminas foram imersas em solução de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) por 5 minutos. Depois de secas a temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 2 minutos.

Imediatamente antes da análise, as lâminas foram coradas com o corante GelRed™ [1:10.000 (v/v), Uniscience, São Paulo, SP, Brasil] por 3 minutos, e examinadas em microscópio de fluorescência (Zeiss - AxioStar Plus), acoplado a uma câmera usando filtro 515-560 nm e barreira de filtro de 590 nm, em objetiva de 20 x. Para cada tratamento foram analisadas 2 lâminas por experimento (n=3), e os nucleoides (50 por lâmina) foram analisadas com o software CometAssay IV™ (Perceptive Instruments©, Bury St Edmunds, Suffolk, Inglaterra). O parâmetro avaliado foi a porcentagem de DNA na cauda do cometa (*Tail intensity*) (Figura 5).

Figura 5. Imagens de nucleoides capturados com o software CometAssay IV

(A) Nucleoide com ausência de dano ao DNA e (B) nucleoide com elevado grau de dano ao DNA. Fonte: Laboratório de Nutrigenômica – FCFRP, 2015. Captura: Carla da Silva Machado.

3.5.3.2 Ensaio do cometa em cocultura

As células HepG2 foram semeadas em placas de cultura de 6 poços na densidade de 4×10^5 células por poço e as células HUVEC semeadas na densidade de 1×10^4 células por inserto na membrana porosa de $0,4 \mu\text{m}$. As placas foram incubadas em estufa a 37°C , 5 % CO_2 por 24 horas. Após o tempo de incubação, as células foram tratadas por 4 horas com a toxina nas concentrações de 0,25; 0,50; 1,00; 5,00 $\mu\text{g/mL}$, o controle negativo (PBS) e o controle positivo (MMS 300 μM). Após o tempo de tratamento, o procedimento seguiu o mesmo descrito no método do ensaio do cometa em monocultura, e as células HUVEC da cocultutura tiveram sua viabilidade celular determinada pelo método de exclusão por Azul de Tripán.

3.5.4 Determinação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ERO)

3.5.4.1 Determinação dos níveis intracelulares de ERO em monocultura

Os níveis intracelulares de ERO foram determinados por meio da marcação com H_2DCFDA , como descrito por Wang e Joseph (1999). O ensaio com H_2DCFDA é hoje um dos métodos mais utilizados mundialmente para medir o nível de formação

de ERO, pois após a penetração na membrana celular, o H₂DCFDA é desacetilado por esterases celulares no composto não fluorescente diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF), que é então oxidado por ERO no produto fluorescente dihidrofluoresceína (DCF) que pode ser quantificado (SZYCHOWSKI et al., 2016). As células HepG2 (1×10^4) foram semeadas em placas de cultura de 96 poços de fundo escuro por 24 horas e tratadas posteriormente com BjussuLAAO-II (0,25 – 5,00 µg/mL) ou PBS (controle negativo) por 4 e 24 horas. O sobrenadante foi removido, as células lavadas com PBS e incubadas por 30 minutos a 37°C com 100 µL de H₂DCFDA 5,0 mM. Após os 30 minutos o controle positivo foi tratado com 30 µL de H₂O₂ 1,0 mM e a placa incubada por mais 20 minutos. As células foram lavadas e 100 µL de PBS adicionados em cada poço para a leitura que foi feita em espectrômetro de fluorescência CaryEclipse (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), em comprimento de onda de excitação 485 nm e emissão 528 nm.

3.5.4.2 Determinação dos níveis intracelulares de ERO em cocultura

As células HepG2 foram semeadas em placas de cultura de 6 poços na densidade de 4×10^5 células por poço e as células HUVEC semeadas na densidade de 1×10^4 células por inserto na membrana porosa de 0,4 µm. As placas foram incubadas em estufa a 37°C, 5 % CO₂ por 24 horas. Foram então tratadas com BjussuLAAO-II (0,25 – 5,00 µg/mL) ou PBS (controle negativo) por 4 e 24 horas. O sobrenadante foi removido, as células lavadas com PBS e incubadas por 30 minutos a 37°C com 3 mL de H₂DCFDA 5,0 mM. Após os 30 minutos o controle positivo foi tratado com 0,9 mL de H₂O₂ 1,0 mM e a placa incubada por mais 20 minutos. As células foram lavadas e 3 mL de PBS adicionados em cada poço para a leitura que foi feita em espectrômetro de fluorescência CaryEclipse (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), em comprimento de onda de excitação 485 nm e emissão 528 nm.

3.5.5 Ensaio do micronúcleo

3.5.5.1 Ensaio do micronúcleo em monocultura

O ensaio do micronúcleo *in vitro* (MNVit) foi conduzido de acordo com as diretrizes da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD)

Guidelines for the Testing of Chemicals N°. 487: *In vitro* mammalian cell micronucleus test (2014). As células HepG2 e HUVEC foram semeadas a 2×10^5 células por poço numa placa de cultura de 6 poços e incubadas por 24 horas. Posteriormente, as células foram tratadas com BjussuLAAO-II (0,25 – 5,00 µg/mL) e MMS (300 µM como controle positivo) ou PBS (como controle negativo) durante 20 horas. No final do tratamento, as células foram lavadas com PBS e adicionado meio novo contendo citocalasina B (4 µg/mL) durante 28 horas. Após as 72 horas, as células foram colhidas com auxílio de tripsina, fixadas com metanol:ácido acético (3:1 v/v) e dispostas sobre uma lâmina de vidro previamente lavadas. Imediatamente antes da análise, foram coradas com laranja de acridina (0,1%) diluído em PBS (1/15, v/v) antes da análise microscópica (Zeiss - AxioStar Plus) (Figura 6). A citotoxicidade foi avaliada pelo índice de proliferação por bloqueio de citocinese (CBPI).

$$CBPI = \frac{[(n^{\circ} \text{ cels. mononucl.} \times 1) + (n^{\circ} \text{ cels. binucl.} \times 2) + (n^{\circ} \text{ cel.s multinucl.} \times 3)]}{\text{total células contadas}}$$

A citotoxicidade foi determinada de acordo com o protocolo estabelecido pela OECD, utilizando-se:

$$\text{Citotoxicidade} = 100 - 100 \left[\frac{(\text{CBPI tratamento} - 1)}{(\text{CBPI controle negativo} - 1)} \right]$$

As frequências de MNVits foram analisadas em 2000 células por tratamento sendo três experimentos independentes. Para a identificação de micronúcleos, os critérios de Kirsch-Volders et al. (2000) foram aplicados.

Figura 6 - Fotomicrografia obtida no teste do micronúcleo *in vitro*

Coloração com laranja de acridina e aumento original de 1.000 x. Célula binucleada com micronúcleo. Fonte: Laboratório de Nutrigenômica – FCFRP, 2016. Captura: Lívia Cristina Hernandes.

3.5.5.2 Ensaio do micronúcleo em cocultura

As células HepG2 foram semeadas em placas de cultura de 6 poços na densidade de 4×10^5 células por poço e as células HUVEC semeadas na densidade de 1×10^4 células por inserto na membrana porosa de $0,4 \mu\text{m}$. As placas foram incubadas em estufa a 37°C , 5 % CO_2 por 24 horas. Após o tempo de incubação, as células foram tratadas com a toxina nas concentrações de 0,25; 0,50; 1,00; 5,00 $\mu\text{g/mL}$, o controle negativo (PBS) e o controle positivo (MMS 300 μM). Após o tempo de tratamento, o procedimento seguiu o mesmo descrito no método do ensaio do micronúcleo em monocultura, com a verificação da viabilidade celular de células HUVEC pelo método de exclusão por Azul de Tripan.

3.6 Análise estatística

Os resultados são apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão da triplicata de três experimentos independentes. Para todos os ensaios, os dados foram verificados quanto à normalidade pelo Teste K-S (Teste Kolmogorov-Smirnov) e submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Tukey, com o auxílio do programa GraphPad Prism 5 (La Jolla – CA – USA). O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para os parâmetros avaliados.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 BjussuLAAO-II induz citotoxicidade em células HepG2 e HUVEC

4.1.1 Citotoxicidade em células HepG2 e HUVEC em monocultura

Os resultados obtidos no ensaio do MTT para determinação da citotoxicidade da BjussuLAAO-II nas concentrações de 0,25; 0,50; 1,00 e 5,00 $\mu\text{g/mL}$ de toxina, nos tempos de 24 (Figura 7A e Figura 7C) e 48 horas (Figura 7B e 7D), são apresentados na Figura 7.

Figura 7 – Efeito da BjussuLAAO-II na viabilidade de células HepG2 e HUVEC

Viabilidade Celular (%) de células HepG2 (A, B) e HUVEC (C, D) após 24 horas ou 48 horas de tratamento com BjussuLAAO-II (0,25 – 5 $\mu\text{g/mL}$). CN: controle negativo (PBS); CP: controle

positivo (MMS-300 μ M). Média $\pm$ desvio padrão (n=3), $p<0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p>0,05$).

Os resultados obtidos no ensaio do MTT mostraram que o MMS, usado como controle positivo do ensaio, foi eficiente na redução da viabilidade das células HepG2 e HUVEC, nos dois tempos de tratamento, 24 horas e 48 horas (Figura 7). É possível ainda observar na Figura 7 que a viabilidade celular é influenciada pelo tempo de tratamento com o MMS nos dois tipos celulares, haja vista que após 24 horas de tratamento a viabilidade celular é aproximadamente 72% e 67%, e após 48 horas a viabilidade celular é em torno de 32% e 11%, nas células HepG2 e HUVEC, respectivamente.

Para os tratamentos com a BjussuLAAO-II foi observada uma redução significativa da viabilidade celular, quando comparada ao controle negativo, a partir da menor concentração testada (0,25 μ g/mL). As demais concentrações da BjussuLAAO-II também reduziram significativamente a viabilidade celular, entretanto, não foi encontrado um efeito dependente de concentração. Todas as concentrações da toxina reduziram a viabilidade celular em mais de 50% (Figura 7A). Nos tratamentos de 48 horas (Figura 7B) resultados similares foram observados, sendo que a redução da viabilidade celular induzida pela toxina foi semelhante àquela verificada no tempo de 24 horas.

No ensaio do MTT com células HUVEC, todas as concentrações testadas reduziram a viabilidade celular, em comparação com o controle negativo ($p<0,05$). Também foi possível observar uma redução da viabilidade dependente de concentração da toxina no tempo de 24 horas (Figura 7C), o que não se observa no tratamento de 48 horas (Figura 7D).

Na comparação entre as duas linhagens, no tempo de 24 horas, na menor concentração testada (0,25 μ g/mL) foi possível observar que as células HepG2 são mais sensíveis aos efeitos da toxina do que as células HUVEC, o mesmo não acontece no tempo de tratamento de 48 horas (Figura 8).

Figura 8 – Comparação da viabilidade celular após o tratamento com 0,25 µg/mL de BjussuLAAO-II em células HepG2 e HUVEC em diferentes tempos de tratamento

Viabilidade Celular (%) de células HepG2 e HUVEC após 24 horas ou 48 horas de tratamento. CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 µM). Média ± desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

4.1.2 Citotoxicidade em células HepG2 cultivadas em cocultura com células HUVEC

Os possíveis efeitos citotóxicos da BjussuLAAO-II também foram investigados em linhagem celular humana HepG2 cultivadas simultaneamente em insertos com células HUVEC. A avaliação da viabilidade em células HepG2 foi feita por meio do ensaio do MTT enquanto a avaliação da viabilidade celular em células HUVEC foi feita utilizando-se o método de exclusão por Azul de Tripán, garantindo que as células estavam vivas nos insertos durante os tratamentos. Todas as culturas de HUVEC demonstraram viabilidade celular acima de 70% (dados não mostrados). Os resultados de MTT em células HepG2 em cocultura são apresentados na Figura 9.

Figura 9 - Efeito da BjussuLAAO-II em cocultura detectado por MTT

Viabilidade Celular (%) de células HepG2 em cocultura após 24 horas de tratamento com BjussuLAAO-II (0,25 – 5 µg/mL). CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 µM). Média ± desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Os resultados apresentados demonstram uma redução significativa de aproximadamente 70% da viabilidade celular no controle positivo ($p < 0,05$) e demonstram uma redução da viabilidade celular nas concentrações de 1,00 e 5,00 µg/mL de BjussuLAAO-II. Concentrações 0,25 e 0,50 µg/mL não reduziram a viabilidade celular, quando comparadas ao controle negativo ($p > 0,05$).

Comparando-se os resultados de células HepG2 no tempo de 24 horas, observa-se uma citotoxicidade mais elevada quando as células são cultivadas em monocultura em relação às células cultivadas em cocultura (Figura 7A e Figura 9). Quando cultivadas em monocultura, todas as concentrações testadas resultaram em diminuição significativa da viabilidade celular, enquanto em cocultura, somente as concentrações de 1,00 e 5,00 µg/mL foram estatisticamente diferentes do controle negativo ($p < 0,05$). A fim de verificar se este efeito é decorrente da presença de células HUVEC em cocultura ou apenas da presença do inserto, realizou-se um MTT de células HepG2 cultivadas em placas de cocultura sem a presença de células HUVEC. O resultado está apresentado no apêndice B e observa-se que os efeitos citotóxicos da BjussuLAAO-II permanecem mesmo quando cultivadas em placas com insertos em monocultura, evidenciando que a diminuição na citotoxicidade quando cultivadas com HUVEC é devido exclusivamente à presença desta linhagem celular que

compartilha o mesmo meio de cultura, excluindo qualquer possibilidade de interferência do inserto na resposta.

4.2 BjussuLAAO-II diminui a fração de sobrevivência em células HepG2 e HUVEC

4.2.1 BjussuLAAO-II diminui a fração de sobrevivência em células HepG2 e HUVEC em monocultura

A citotoxicidade em células HepG2 e HUVEC também foi avaliada pelo ensaio clonogênico após 24 horas de tratamento com BjussuLAAO-II (0,25 – 5,00 µg/mL) e o resultado está apresentado na Figura 10.

Figura 10 – Efeito citotóxico da BjussuLAAO-II em células HepG2 e HUVEC

Fração de sobrevivência (%) da BjussuLAAO-II na viabilidade de células HepG2 e HUVEC. Sobrevivência clonogênica (%) de células HepG2 (A) e HUVEC (B) após 24 horas de tratamento com BjussuLAAO-II (0,25 – 5 µg/mL) e 7 dias de observação. CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 µM). Média ± desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Neste ensaio, as colônias são contadas para determinar a morte celular após o tratamento com BjussuLAAO-II em diferentes concentrações. Os resultados obtidos demonstram que o MMS, usado como controle positivo do ensaio, foi eficiente na

redução da sobrevivência das células HepG2 e HUVEC (Figura 10). Em células HepG2, a média de sobrevivência foi de 42,31% em 24 horas de tratamento e em células HUVEC, esta foi 38,63%. Em células HepG2, de acordo com a Figura 10, todas as concentrações testadas foram citotóxicas quando comparadas ao controle negativo. A menor concentração (0,25 µg/mL) teve uma média de 0,83% de sobrevivência enquanto que na maior concentração (5,00 µg/mL), não houve nenhuma colônia formada após os 7 dias de observação.

Nas células HUVEC, todas as concentrações testadas diminuíram a viabilidade celular quando comparadas ao controle negativo de uma maneira dependente da concentração. A concentração de 0,25 µg/mL teve uma média de sobrevivência de 11,42%, enquanto que a mesma média para a concentração de 5,00 µg/mL foi de 0,04%.

Na comparação entre as duas linhagens, no tempo de 24 horas, na menor concentração testada (0,25 µg/mL), foi possível observar que as células HepG2 são mais sensíveis aos efeitos da toxina do que as células HUVEC o que também foi observado no ensaio do MTT (Figura 11).

Figura 11 – Comparação da viabilidade celular de 0,25 µg/mL de BjussuLAAO-II em células HepG2 e HUVEC

Fração de sobrevivência (%) das células HepG2 e HUVEC. CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 µM). Média ± desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

4.2.2 BjussuLAAO-II diminui a fração de sobrevivência em células HepG2 em cocultura

A citotoxicidade em células HepG2 em cocultura com células HUVEC foi avaliada pelo ensaio clonogênico após 24 horas de tratamento e 7 dias de observação com BjussuLAAO-II (0,25 – 5,00 µg/mL) e o resultado está apresentado na Figura 12.

Figura 12 - Efeito citotóxico da BjussuLAAO-II em células HepG2 em cocultura com as células HUVEC

Fração de sobrevivência (%) das células HepG2 após 24 horas de tratamento com BjussuLAAO-II (0,25 – 5 µg/mL) e 7 dias de observação. CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 µM). Média ± desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Os resultados apresentados demonstram uma redução significativa de aproximadamente 55% da fração de sobrevivência no controle positivo ($p < 0,05$). Todas as concentrações testadas de BjussuLAAO-II reduziram a fração de sobrevivência de maneira dependente da concentração quando comparadas ao controle negativo ($p < 0,05$). Comparando-se os resultados de células HepG2 em monocultura com cocultura, observa-se uma citotoxicidade mais elevada quando as células são cultivadas em monocultura (Figura 10A e Figura 12). Por exemplo, usando

a concentração de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ como referência, vemos que na monocultura a média de sobrevivência foi de 0,83% e na cocultura foi de 75,66%.

4.3 BjussuLAAO-II induz danos ao DNA em células HepG2 e HUVEC

4.3.1 BjussuLAAO-II induz danos ao DNA em células HepG2 e HUVEC em monocultura

Para a realização do ensaio do cometa é necessária a prévia avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão por Azul de Tripán. A viabilidade celular das linhagens HepG2 e HUVEC foram superiores a 70% em todos os grupos de tratamento, sendo possível prosseguir com os procedimentos do ensaio do cometa (dados não apresentados).

No ensaio do cometa, avaliou-se o parâmetro *Tail Intensity*, equivalente à porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides. Os resultados obtidos para as células HepG2 e HUVEC estão apresentados na Figura 13.

Figura 13 – Porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides avaliada pelo ensaio do cometa

Porcentagem de DNA na cauda em células HepG2 (A) e HUVEC (B) após tratamento com a BjussuLAAO-II em diferentes concentrações por 4 horas. CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 μM). Média $\pm$ desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

No tratamento de 4 horas, os resultados obtidos no ensaio do cometa nas células HepG2 e HUVEC demonstraram um aumento significativo do dano ao DNA no controle positivo ($p < 0,05$), em comparação com o controle negativo. Nas células HepG2 apenas a concentração de 5,00 $\mu\text{g/mL}$ induziu danos, enquanto na linhagem celular HUVEC as duas maiores concentrações testadas (1,00 e 5,00 $\mu\text{g/mL}$) aumentaram significativamente os danos ao DNA, quando comparadas ao controle negativo ($p < 0,05$).

4.3.2 BjussuLAAO-II induz danos ao DNA em células HepG2 cultivadas em cocultura com células HUVEC

Os resultados obtidos para as células HepG2 em cocultura estão apresentados na Figura 14.

Figura 14 – Porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides avaliada pelo ensaio do cometa

Porcentagem de DNA na cauda em células HepG2 cultivadas em cocultura com células HUVEC após tratamento com a BjussuLAAO-II em diferentes concentrações por 4 horas. CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 μM). Média $\pm$ desvio padrão ($n=3$), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

No tratamento de 4 horas, os resultados obtidos no ensaio do cometa nas células HepG2 em cocultura com células HUVEC demonstraram um aumento

significativo do dano ao DNA no controle positivo ($p < 0,05$) em comparação com o controle negativo. O tratamento de BjussuLAAO-II em células HepG2 cultivadas na presença de células HUVEC apresentou efeitos genotóxicos apenas na maior concentração testada ($5,00 \mu\text{g/mL}$). Na comparação com a cocultura, em células HepG2, o dano ao DNA produzido pela BjussuLAAO-II é mais pronunciado em monocultura (Figura 13A). Na concentração de $5,00 \mu\text{g/mL}$, as células apresentaram 32,92% de dano ao DNA na monocultura, enquanto em cocultura, as células apresentaram 14,45% de dano. Em comparação entre as duas linhagens, o dano ao DNA produzido pela concentração de $5,00 \mu\text{g/mL}$ é mais pronunciado nas células HepG2 (32,92% de dano) do que nas células HUVEC (9,17% de dano) (Figura 15).

Figura 15 – Porcentagem de DNA na cauda em células HepG2 em monocultura e cocultura e em células HUVEC em monocultura avaliada pelo ensaio do cometa

Porcentagem de DNA na cauda em células HepG2 e células HUVEC após tratamento com a BjussuLAAO-II em diferentes concentrações por 4 horas. CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS- $300 \mu\text{M}$). Média $\pm$ desvio padrão ($n=3$), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

4.4 BjussuLAAO-II induz a geração de espécies reativas de oxigênio em células HepG2 e HUVEC

4.4.1 BjussuLAAO-II induz a geração de espécies reativas de oxigênio em células HepG2 e HUVEC em monocultura

H₂DCFDA foi usado para a determinação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio nas células HepG2, tratadas com BjussuLAAO-II nas concentrações de 0,25; 0,50; 1,00 e 5,00 µg/mL. Os resultados estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 – Níveis intracelulares de ERO em células HepG2 em monocultura

Níveis intracelulares de ERO em células HepG2 em 4 horas (A) e 24 horas (B) após tratamento com a BjussuLAAO-II em diferentes concentrações. u.a.: unidades aritrárias. CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (H₂O₂ 1,0 mM). Média ± desvio padrão (n=3), p<0,05 ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si (p>0,05).

Comparado ao controle negativo, o peróxido de hidrogênio, utilizado como controle positivo, foi eficiente em aumentar as concentrações intracelulares de ERO nos tempos de 4 horas (Figura 16A) e 24 horas (Figura 16B). BjussuLAAO-II também induziu aumentos nos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio em células HepG2 nos dois tempos testados. No tempo de 4 horas, todas as concentrações avaliadas foram capazes de induzir a produção de ERO de maneira dependente da concentração (Figura 16A). No entanto, no tempo de 24 horas, apenas a concentração de 5,00 µg/mL aumentou, de maneira significativa, os níveis

intracelulares de ERO (Figura 16B). E analisando-se os dois tempos de tratamento, não há diferença na concentração de espécies reativas intracelulares.

4.4.2 BjussuLAAO-II induz a geração de espécies reativas de oxigênio em células HepG2 em cocultura com células HUVEC

Os resultados obtidos com as células HepG2 em cocultura com as células HUVEC são apresentados na Figura 17.

Figura 17 – Níveis intracelulares de ERO em células HepG2 em cocultura com células HUVEC

Níveis intracelulares de ERO em células HepG2 em 4 horas (A) e 24 horas (B) após tratamento com a BjussuLAAO-II em diferentes concentrações em cocultura com células HUVEC. u.a.: unidades arbitrárias. CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (H_2O_2 1,0 mM). Média $\pm$ desvio padrão ($n=3$), $p<0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p>0,05$).

Os tratamentos com BjussuLAAO-II nas concentrações de 1,00 e 5,00 $\mu\text{g/mL}$ em cocultura de células HepG2 com células HUVEC aumentaram significativamente as concentrações intracelulares de ERO quando comparadas ao controle negativo em ambos os tempos (4 e 24 horas).

No tempo de 4 horas, as concentrações de 1,00 e 5,00 $\mu\text{g/mL}$ de BjussuLAAO-II aumentaram em 29,87 e 61,12 vezes a concentração de ERO, respectivamente, quando comparadas ao controle negativo (Figura 17A). Em 24 horas, as

concentrações de 1,00 e 5,00 µg/mL de BjussuLAAO-II também aumentaram as concentrações de ERO nas células HepG2; a concentração de 1,00 µg/mL aumentou em 36,44 vezes e a concentração de 5,00 µg/mL em 61,40 vezes (Figura 17B).

4.5 BjussuLAAO-II não induz danos cromossômicos

Os resultados obtidos a partir da análise de MNVit, CBPI e porcentagem de citotoxicidade em células binucleadas refletem a possível atividade mutagênica de BjussuLAAO-II, estão apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3. As células HepG2 em monocultura (Tabela 1) e em cocultura (Tabela 3) e células HUVEC em monocultura (Tabela 2) foram tratadas com diferentes concentrações de BjussuLAAO-II (0,25 – 1,00 µg/mL) ou PBS (controle negativo) ou MMS 300 µM (controle positivo).

Tabela 1 – Frequência de micronúcleos (MNVit), porcentagens de células binucleadas (% BN), índice de proliferação pelo bloqueio da citocinese (CBPI) e citotoxicidade (%) em células HepG2 em monocultura tratadas com BjussuLAAO-II

Tratamento	MNVit ± DP	% BN	CBPI ± DP	% Citotoxicidade
CN	25,67 ± 3,11 ^a	64,27 ± 4,88 ^a	1,69 ± 0,06 ^a	-
CP	44,00 ± 2,67 ^b	52,07 ± 10,07 ^a	1,59 ± 0,08 ^a	9,52 ± 7,41 ^a
0,25 µg/mL	27,33 ± 2,44 ^a	59,63 ± 2,66 ^a	1,62 ± 0,03 ^a	8,37 ± 8,13 ^a
0,50 µg/mL	29,00 ± 6,00 ^a	61,33 ± 3,19 ^a	1,60 ± 0,05 ^a	13,83 ± 8,01 ^a
1,00 µg/mL	31,33 ± 2,44 ^{a,b}	54,93 ± 4,41 ^a	1,54 ± 0,15 ^a	11,90 ± 5,75 ^a

Frequência de micronúcleos (MNVit) apresentados como a média encontrada em 1.000 células binucleadas analisadas, índice de proliferação pelo bloqueio da citocinese (CBPI) e citotoxicidade em células HepG2 em monocultura (MNVit). CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 µM). Os valores obtidos estão representados pela média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. No total, foram analisadas 6000 células por tratamento. $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias representadas com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Tabela 2 – Frequência de micronúcleos (MNVit), porcentagens de células binucleadas (% BN), índice de proliferação pelo bloqueio da citocinese (CBPI) e citotoxicidade (%) em células HUVEC em monocultura tratadas com BjussuLAAO-II

Tratamento	MNVit $\pm$ DP	% BN	CBPI $\pm$ DP	% Citotoxicidade
CN	11,17 $\pm$ 1,11 ^a	50,07 $\pm$ 2,30 ^a	0,58 $\pm$ 0,01 ^a	-
CP	16,67 $\pm$ 2,44 ^b	49,47 $\pm$ 0,81 ^a	0,71 $\pm$ 0,06 ^a	4,28 $\pm$ 3,69 ^a
0,25 μg/mL	10,83 $\pm$ 1,56 ^a	56,40 $\pm$ 9,83 ^a	0,65 $\pm$ 0,05 ^a	9,11 $\pm$ 9,35 ^a
0,50 μg/mL	13,17 $\pm$ 1,11 ^{a,c}	56,27 $\pm$ 6,72 ^a	0,67 $\pm$ 0,02 ^a	1,94 $\pm$ 1,05 ^a
1,00 μg/mL	14,50 $\pm$ 2,67 ^{a,b,c}	52,80 $\pm$ 4,13 ^a	0,67 $\pm$ 0,03 ^a	5,90 $\pm$ 6,26 ^a

Frequência de micronúcleos (MNVit) apresentados como a média encontrada em 1.000 células binucleadas analisadas, índice de proliferação pelo bloqueio da citocinese (CBPI) e citotoxicidade em células HUVEC em monocultura (MNVit). CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 μ M). Os valores obtidos estão representados pela média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. No total, foram analisadas 6000 células por tratamento. $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias representadas com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Tabela 3 – Frequência de micronúcleos (MNVit), porcentagens de células binucleadas (% BN), índice de proliferação pelo bloqueio da citocinese (CBPI) e citotoxicidade (%) em células HepG2 em cocultura tratadas com BjussuLAAO-II

Tratamento	MNVit $\pm$ DP	% BN	CBPI $\pm$ DP	% Citotoxicidade
CN	23,00 $\pm$ 2,00 ^a	66,27 $\pm$ 2,53 ^a	1,57 $\pm$ 0,17 ^a	-
CP	46,67 $\pm$ 3,11 ^b	66,33 $\pm$ 2,40 ^a	1,68 $\pm$ 0,02 ^a	6,43 $\pm$ 5,51 ^a
0,25 μg/mL	26,67 $\pm$ 4,22 ^a	66,13 $\pm$ 10,51 ^a	1,66 $\pm$ 0,10 ^a	12,62 $\pm$ 5,51 ^a
0,50 μg/mL	30,67 $\pm$ 8,44 ^a	61,27 $\pm$ 3,70 ^a	1,64 $\pm$ 0,02 ^a	11,53 $\pm$ 8,91 ^a
1,00 μg/mL	30,67 $\pm$ 3,56 ^a	57,93 $\pm$ 10,90 ^a	1,61 $\pm$ 0,07 ^a	6,05 $\pm$ 4,89 ^a

Frequência de micronúcleos (MNVit) apresentados como a média encontrada em 1.000 células binucleadas analisadas, índice de proliferação pelo bloqueio da citocinese (CBPI) e citotoxicidade em células HepG2 em cocultura (MNVit). CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 μ M). Os valores obtidos estão representados pela média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. No total, foram analisadas 6000 células por tratamento. $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias representadas com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Os resultados obtidos no ensaio do micronúcleo nas células HepG2 em monocultura e cocultura com células HUVEC e nas células HUVEC em monocultura,

demonstraram um aumento significativo da frequência de MNVit no controle positivo ($p < 0,05$) em comparação com o controle negativo, validando o teste. Todas as concentrações testadas de BjuusuLAAO-II em células HepG2 em monocultura (Tabela 1), em células HepG2 em cocultura (Tabela 3) e em células HUVEC (Tabela 2) não apresentaram aumento significativo de micronúcleos quando comparadas ao controle negativo ($p > 0,05$), demonstrando assim ausência de efeito mutagênico. Não há resultados do ensaio do micronúcleo para a concentração de 5,00 µg/mL de BjuusuLAAO-II devido à sua elevada citotoxicidade, o que inviabilizou a análise das lâminas.

Com relação ao parâmetro CBPI, referente à proliferação celular, nenhuma alteração significativa foi observada em todas as culturas celulares e grupos tratados ($p > 0,05$). A porcentagem de citotoxicidade de todos os grupos foi menor do que 55%, conforme recomendado pelo OECD guideline nº 487.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A busca pelo desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos obtidos de recursos biológicos naturais é global. A biodiversidade de venenos, peçonhas e toxinas isoladas desperta interesse cada vez maior e têm potencial para tornarem-se substâncias precursoras de novos fármacos. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que toxinas animais têm efeitos inibitórios tanto na peçonha bruta quanto na forma de toxinas isoladas (CALDERON et al., 2014; LIU et al., 2014).

Os efeitos citotóxicos destas toxinas animais estão correlacionados com a espécie, gênero e tecido alvo. Assim, podem ser classificadas de acordo com suas atividades patofisiológicas em: peçonhas que levam à alterações irreversíveis às células (inclui a família Elapidae), peçonhas que causam a perda da viabilidade da célula (família Crotalidae) e peçonhas que causam alterações na agregação celular (família Viperidae, gênero *Bothrops*) (CALDERON et al., 2014)

Muitas SV-LAAOs isoladas de diferentes espécies de serpentes têm sido descritas como capazes de induzir morte celular em diferentes linhagens celulares por meio da redução da viabilidade celular obtida no ensaio do MTT. Estudos prévios demonstraram que a citotoxicidade é uma característica importante destas enzimas (COSTA et al., 2014; ABDELKAFI-KOUBAA et al., 2016).

Entre os diversos tipos de linhagens estudadas, essas enzimas afetaram a viabilidade celular de, por exemplo, células embrionárias de rim, monócitos, leucemia promielocítica (HL-60), carcinoma ovariano (A2780), câncer gástrico (CRL 5971), células de leucemia T humana e células endoteliais de rato (KN-3) (GUO et al., 2012). Stábeli et al. (2005), estudando uma LAAO obtida da peçonha de *Bothrops moojeni*, e Vieira Santos et al. (2008), estudando uma LAAO isolada da peçonha de *Bothrops jararaca*, demonstraram também efeito citotóxico em células de tumor ascítico de Erlich. Um estudo que avaliou o efeito de LmLAAO, isolada da peçonha de *Lachesis muta*, encontrou efeito citotóxico em células AGS (adenocarcinoma gástrico) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama) em um intervalo de concentrações de 1,2 µg/mL a 75 µg/mL (BREGGE-SILVA et al., 2012). Intervalo este que abrange as concentrações que foram utilizadas neste estudo.

Os resultados encontrados neste estudo com a linhagem celular HepG2, demonstram uma atividade altamente citotóxica da BjussuLAAO-II, com citotoxicidade maior que 50% já na menor concentração testada. Outro estudo utilizando CR-LAAO e células HepG2 também demonstrou citotoxicidade destas enzimas, no entanto, foi

preciso uma concentração 100% maior para atingir o mesmo efeito (COSTA et al., 2015). Da mesma forma, Akbu-LAAO (proveniente da peçonha de *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*) foi citotóxica a 50% das células HepG2 na concentração de ~ 38,83 µg/mL, ou seja, uma concentração 150 vezes maior para produzir o mesmo efeito que a BjusuLAAO-II (GUO et al., 2015). Apesar de outros estudos já demonstrarem efeito citotóxico de LAAO isolada de peçonha de serpentes em células normais (MARCUSI et al., 2013; COSTA et al., 2014; BURIN et al., 2016), esta é a primeira vez que se demonstra efeitos citotóxicos de SV-LAAO sobre a linhagem celular HUVEC, corroborando com a literatura, em que os resultados encontrados em linhagens não tumorais são dose dependente.

Os resultados do presente estudo obtidos no ensaio do MTT demonstram um aumento significativo de toxicidade em células HepG2 quando comparada com HUVEC, na menor concentração testada (0,25 µg/mL). Esta especificidade para células tumorais é bem relatada e pode ser explicada pelo possível mecanismo de ação de SV-LAAOs. Considerando-se que membranas de células cancerosas apresentam maior concentração de lipídeos do que células normais, espera-se que a peroxidação lipídica (via liberação de peróxido de hidrogênio) seja mais pronunciada em linhagens tumorais. Esta observação pode explicar a maior citotoxicidade a este tipo celular (IMLAY, 2003; LEE et al., 2011; COSTA et al., 2015; ABDELKAFI-KOUBAA et al., 2016).

O ensaio do MTT infere sobre a função mitocondrial das células e é um dos métodos mais utilizados para determinação da viabilidade celular em estudos de potenciais novos fármacos. Todavia, não distingue compostos citostáticos de citotóxicos e pode subestimar a citotoxicidade quando comparado ao ensaio clonogênico. O ensaio de sobrevivência clonogênica é baseado na habilidade de uma única célula formar clones e é utilizado em vários estudos com diversas linhagens celulares. O uso de ensaio de sobrevivência clonogênica associado a um ensaio não clonogênico (como o MTT) pode reduzir os erros. Ainda, o ensaio de sobrevivência clonogênica é amplamente utilizado para avaliar e prever a citotoxicidade de antitumorais, e é considerado como o “padrão ouro” porque avalia a soma de todas as formas de morte celular e verifica a sobrevivência das células tratadas (SUMANTRAN, 2011). Considerando os resultados de sobrevivência do ensaio clonogênico, BjusuLAAO-II apresentou citotoxicidade em células HepG2 em monocultura e cocultura e em células HUVEC.

Embora o meio de cultura indicado para o cultivo celular de células HepG2 seja o DMEM, foi necessário utilizar RPMI no cultivo de HepG2 uma vez que células HUVEC não crescem em meio DMEM e o meio e cultura é compartilhado por ambas as linhagens na cocultura celular. Estudos na literatura demonstram que a mudança para o meio RPMI não altera o crescimento, nem a resposta celular de HepG2 (BOESCH-SAADATMANDI et al., 2011; YOUSEFI et al., 2012; BANIHASHEMI et al., 2015). Ensaios realizados no laboratório de Nutrigenômica da FCFRP/USP também demonstram não haver alteração na resposta de células HepG2 em meio RPMI, quando comparados aos ensaios em meio de cultura DMEM (dados não mostrados).

SV-LAAOs podem exercer efeitos citotóxicos por meio da indução de apoptose ou mediante a inibição da agregação de plaquetas. Akbu-LAAO inibiu significativamente a proliferação celular de HepG2 e induziu apoptose *in vitro* sem demonstrar efeito sobre o ciclo celular da célula (GUO et al., 2015). A citotoxicidade está particularmente ligada à produção de peróxido de hidrogênio. Ensaios de expressão gênica e inibição da atividade de *TGF- β* (*transforming growth factor-beta*) comprovaram que a peçonha conduz à supressão tumoral em células HepG2 via *TGF- β* , sugerindo Akbu-LAAO como um potencial antitumoral e fornecendo novas pistas para o mecanismo de ação de SV-LAAOs (GUO et al., 2015).

Estresse oxidativo é um termo utilizado para denotar a falta de equilíbrio entre a concentração de espécies reativas e o sistema antioxidante do organismo (PRUCHNIAK et al., 2016). Espécies reativas de oxigênio (ERO) são consideradas desencadeadoras de várias doenças como diabetes, aterosclerose, inflamação crônica, infecção viral e câncer. Podem ainda induzir alterações moleculares nas células, acarretando mudanças fisiológicas e alterando a viabilidade das mesmas (WARIS e AHSAN, 2006).

Muitos fatores de risco associados ao câncer interagem com as células por meio de estresse oxidativo onde ERO e/ou radicais livres como superóxido (O_2^-), peróxido (HO_2^-) e hidroxila (OH^-), que são produzidos intra ou extracelularmente e induzem efeitos tóxicos nas células. Portanto, o estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogenia ou tratamento do câncer e está envolvido na iniciação, promoção e progressão da doença. Em condições fisiológicas, as células controlam a produção de ERO por meio de sistemas antioxidantes, mas a produção excessiva de ERO pode lesar proteínas, lipídeos, membranas e o DNA levando a danos

irreversíveis que podem contribuir para a carcinogênese (KARDEH et al., 2014; SAED et al., 2017).

Quimioterápicos amplamente utilizados na clínica como o cisplatina, antraciclinas e bleomicina são fármacos que aumentam o estresse oxidativo por meio da inibição do sistema de defesa antioxidante. Um exemplo é a eficácia de trióxido de arsênio (ATO) no tratamento de leucemia promielocítica aguda que, apesar do seu mecanismo de ação não estar totalmente elucidado, supõe-se que envolva a desestabilização da membrana mitocondrial por meio da geração de ERO intracelulares ou mais precisamente superóxidos (GUPTA et al., 2012; KARDEH et al., 2014).

Ribeiro et al. (2016), estudando uma SV-LAAO da peçonha de *Bothrops alternatus*, BaltLAAO-I, em células JURKAT por 1 hora verificou que há um aumento da concentração de ERO nos tratamentos de maneira dependente da concentração sugerindo que este aumento de ERO pode contribuir para o efeito antitumoral da toxina. Um outro estudo, com a LAAO OH-LAAO, proveniente da peçonha de *Ophiophagus hannah*, demonstrou uma alteração na expressão de RNAm de 178 genes relacionados ao estresse oxidativo e 27 genes relacionados à apoptose quando tratados com a toxina. Já é bem estabelecido que a apoptose induzida por SV-LAAOs é resultante da produção de peróxido de hidrogênio durante a reação de desaminação da enzima, sendo assim, conclui-se que o elevado poder de OH-LAAO em induzir apoptose é devido à produção de espécies reativas de oxigênio durante a reação enzimática bem como a oxidação de moléculas de sinalização celular (FUNG et al., 2015).

Assim como outras SV-LAAOs, BjussuLAAO-II aumentou significativamente a concentração de ERO intracelular em todas as concentrações testadas na linhagem HepG2 em monocultura em 4 horas. Apenas a concentração de 5,00 µg/mL diferiu estatisticamente do controle negativo em 24 horas. Em cocultura, as concentrações de 1,00 e 5,00 µg/mL foram eficientes no aumento de ERO tanto em 4 horas quanto 24 horas.

O mecanismo pelo qual as peçonhas de serpentes induzem genotoxicidade ainda não está totalmente elucidado, mas a produção de ERO é uma hipótese considerável e já descrita na literatura (NAUMANN et al., 2011; MARCUSSI et al., 2013). A realização de ensaio genotóxico, como o ensaio cometa por exemplo, é uma ferramenta essencial no desenvolvimento de novas moléculas e potenciais novos

fármacos por avaliar o danos de quebra de fita simples, quebra de fita dupla e sítios álcali-lábeis induzidos por agentes genotóxicos (DAVISON, 2016).

Burin et al. (2016) demonstrou que a peçonha bruta de *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO) aumenta o dano ao DNA em quatro linhagens tumorais diferentes: HL-60, HL-60 Bcr-Abl (células transfectadas com o gene *BCR-ABL 1*), K562 (leucemia crônica mieloide humana) e KCL22 (leucemia crônica blástica mieloide humana). Novak Zobiole et al. (2015), utilizando o ensaio cometa, encontraram concentração genotóxica a partir de 4,00 µg/mL em células Vero (células epiteliais de *Chlorocebus sp*), tratadas por 90 minutos com peçonha bruta de *Bothrops moojeni*.

Marcussi et al. (2013) observaram efeitos genotóxicos (por meio do ensaio do cometa) e mutagênicos (por meio do ensaio citoma) em linfócitos humanos, avaliando a peçonha bruta de espécies do gênero *Bothrops*. Das espécies avaliadas, a peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* apresentou efeito genotóxico e mutagênico nas concentrações de 15,00 µg/mL e 30,00 µg/mL. Neste mesmo estudo, BatxLAAO foi capaz de induzir genotoxicidade e mutagenicidade em todas as concentrações testadas (5 µg/mL, 15 µg/mL e 30 µg/mL).

A combinação do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo é capaz de detectar uma grande variedade de potenciais agentes genotóxicos em um sistema de triagem *in vitro*. Embora o teste do micronúcleo tenha um protocolo padronizado pela OECD para a realização do teste, o ensaio do cometa *in vitro* ainda não tem um protocolo padronizado por agências regulatórias e sua execução segue a recomendação de pesquisadores que investigam criteriosamente as limitações e aplicações do ensaio (AZQUETA e COLLINS, 2013; LANGIE et al., 2015; KOPPEN et al., 2017).

O ensaio do cometa detecta lesões primárias no DNA - como quebra de fita simples, quebra de fita dupla e sítios álcali-lábeis - e ainda passíveis de serem eliminadas pelo sistema de reparo. Essas lesões podem ou não ser fixadas no DNA (ROTHFUSS et al., 2011). A BjussuLAAO-II avaliada neste trabalho foi capaz de promover danos genotóxicos ao DNA na concentração de 1,00 e 5,00 µg/mL em células HUVEC. Em células HepG2, em monocultura ou cocultura, apenas a concentração de 5,00 µg/mL induziu danos ao DNA. O teste do micronúcleo detecta alterações cromossômicas como quebra ou perda de cromossomos inteiros clastogênese e aneugênese, respectivamente). Neste estudo, nenhuma das concentrações de BjussuLAAO-II testadas (0,25; 0,50 e 1,00 µg/mL), em ambas as

linhagens celulares, em mono ou cocultura, foi capaz de induzir o aumento na frequência de micronúcleos, quando comparado com os respectivos controles negativo.

Kimura et al. (2013) estabeleceram um protocolo combinado para os ensaios do cometa e micronúcleo, comparando a sensibilidade do cometa com o teste do micronúcleo. Os autores avaliaram cinco agentes genotóxicos (Metanosulfonato de etila, MMS, peróxido de hidrogênio, raios gama e mitomicina C) e um agente não genotóxicos (Triton X-100) nos ensaios do cometa e micronúcleo em células humanas TK6 (esferocitose linfoblástica do baço). Os autores concluíram que para os cinco agentes genotóxicos avaliados, nem todos apresentaram uma concordância de resposta positiva ou negativa em ambos os ensaios.

Neste estudo, utilizou-se o controle positivo MMS nos ensaios do cometa e micronúcleo que continua recomendado como controle positivo em artigo publicado por Kirkland et al. (2016), que sugere uma lista com os agentes mutagênicos que devem ser empregados em estudos de genotoxicidade. O MMS aumentou a % do DNA na cauda e a frequência de micronúcleos em ambas as linhagens celulares. Entretanto, nos tratamentos com a toxina, tanto em células HUVEC como em HepG2, em monocultura ou cocultura, foi observado genotoxicidade no ensaio do cometa e ausência de efeitos mutagênicos no teste do micronúcleo. Esta resposta pode estar relacionada com os tipos de danos detectados em cada ensaio. Ainda, nas células HepG2, em monocultura ou cocultura, foi observado que somente a maior concentração de 5 µg/mL da toxina induziu aumento da % DNA na cauda e esta mesma concentração não pode ser avaliada no teste do micronúcleo, pois foi muito citotóxica para as células e não foi possível encontrar células binucleadas.

Resultados positivos para a genotoxicidade e negativos para a mutagenicidade também permitem, por exemplo, inferências sobre os tipos de lesões geradas – lesões mais simples, que podem ser reparadas ou mais complexas, não passíveis de reparo e além disso, podem também infligir sobre a indução do sistema de reparo (COSTA et al., 2015).

Provavelmente, BjuusuLAAO-II, induziu efeitos genotóxicos por meio de lesões primárias de reparo menos complexo, como bases oxidadas ou quebras de fita simples, que em células proficientes de *TP53* e sistema de reparo como HepG2 e HUVEC, são rapidamente corrigidas pelo Reparo de Excisão de Base ou Nucleotídeo e Reparo Homólogos.

Apesar dos estudos na literatura demonstrem resultados promissores de toxinas animais com efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, uma nova estratégia tem sido aplicada na pesquisa de compostos potencialmente antitumorais cujo foco não é apenas identificar os componentes, mas entender o mecanismo de ação destes e identificar fatores que podem levar à redução do tumor ou à quimioresistência (CALDERON et al., 2014). A avaliação de fármacos antineoplásicos em células tumorais *in vitro* tem sido utilizada extensivamente na pesquisa de novos compostos e para a seleção de fármacos efetivos. Estudos recentes sugerem que as células estromais, localizadas na base do microambiente tumoral, afetam a sensibilidade do fármaco nas células tumorais, no entanto, a maioria dos sistemas de cultura convencionais para avaliação de medicamentos ainda não permite o estudo em células estromais (YAMAZOE et al., 2016).

Uma das maiores dificuldades é reproduzir o microambiente tumoral utilizando apenas uma linhagem celular, então, sistemas de coculturas utilizando pelo menos duas linhagens celulares estão sendo estabelecidos para elucidar as interações célula-célula e célula-microambiente tumoral (MIKI et al., 2012; DAVEREY et al., 2015). A densidade de células HepG2 e HUVEC cultivadas nos insertos foi baseada em estudos anteriores. Ding et al. (2015); Dong et al. (2015) utilizaram uma densidade de 5×10^4 células de carcinoma hepatocelular em câmaras de *Boyden* e em Transwell®. Em células HUVEC, a literatura demonstra densidades de 1×10^5 para ensaios de migração com membrana de poro de $0,8 \mu\text{m}$ (HO et al., 2014; GAO et al., 2016). Como o presente estudo não avaliou a migração celular e a membrana utilizada foi de $0,4 \mu\text{m}$, optou-se por utilizar 1×10^4 células de modo a obter-se uma boa confluência entre os tipos celulares.

Yamazoe et al. (2016) observaram sensibilidade diferenciada ao antitumoral cisplatina quando utilizaram células que simularam o microambiente tumoral; os fibroblastos utilizados para simular o microambiente tumoral induziram quimiorresistência ao fármaco em células tumorais de pulmão (WA-hT). Por outro lado, citocinas liberadas por monócitos após 72 horas de tratamento aumentaram a sensibilidade das células ao tratamento. Wang e colaboradores (2013) demonstram que substâncias secretadas por células HUVEC podem estimular a proliferação, migração e invasão do carcinoma hepatocelular *in vitro* utilizando uma linhagem tumoral de fígado (MHCC97H). Citocinas como CCL2 (citocina pertencente à família de quimiocinas CC – ligante 2) e CXCL16 (citocina pertencente à família de quimiocinas

CXC – ligante 16) parecem estar envolvidas com este processo mediante a ativação das vias de sinalização celular PI3K/Akt e NF- κ B. IL-8 pode ativar NF- κ B por meio de outras vias de sinalização celular reguladas pela expressão de MMP2 (sequência do primer de metaloproteinase 2) e MMP9 (sequência do primer de metaloproteinase 9). Estes resultados mostram claramente a importância da utilização de cocultura de células estromais no estudo de novos potenciais compostos antitumorais.

Esses fatores podem explicar, por exemplo, a grande diferença na viabilidade celular, na sobrevivência clonogênica, na indução de ERO intracelular e nos danos ao DNA de células HepG2 quando cultivadas em monocultura e quando avaliadas em cocultura com as células HUVEC.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados, nas condições experimentais descritas, podemos concluir que a BjussuLAAO-II:

- Apresentou uma redução da viabilidade celular em células HepG2 e HUVEC em monocultura em todas as concentrações e tempos de tratamentos testados;
- Quando em cocultura, a BjussuLAAO-II ainda induz danos citotóxicos às células HepG2, mas de maneira menos efetiva;
- Induziu danos genotóxicos ao DNA nas concentrações de 1,00 e 5,00 µg/mL em células HUVEC. E na concentração de 5,00 µg/mL em células HepG2 em mono e cocultura;
- Em HepG2 monocultura, todas as concentrações testadas de BjussuLAAO-II aumentaram a concentração de ERO intracelular no tempo de 4 horas e apenas a concentração de 5,00 µg/mL após 24 horas de tratamento;
- Aumenta significativamente os níveis de ERO intracelular nas concentrações de 1,00 e 5,00 µg/mL em células HepG2 em cocultura com células HUVEC;
- Não há indução de dano cromossômico em células HUVEC e HepG2 em mono e cocultura em todas as concentrações testadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, BjussuLAAO-II diminuiu significativamente a viabilidade celular e induziu danos ao DNA em células HepG2 e HUVEC em monocultura e estes efeitos podem ser correlacionados ao aumento de espécies reativas de oxigênio intracelulares. Quando em cocultura, BjussuLAAO-II ainda é citotóxica e genotóxica às células HepG2, mas há uma perda na resposta biológica devido provavelmente a liberação de substâncias que estimulam o crescimento tumoral como citocinas pelas células HUVEC, o que pode ser observado na resposta do ensaio clonogênico, após 7 dias de observação, em células HepG2 quando comparam-se os resultados de mono e cocultura.

O presente estudo sugere BjussuLAAO-II como um potencial fármaco antitumoral para o tratamento de carcinoma hepatocelular, pois mesmo em simulação de microambiente tumoral parcial, com o sistema de cocultura, as maiores concentrações (igual ou maiores que 1,00 µg/mL) demonstraram (I) efeitos citotóxicos no ensaio do MTT e no ensaio clonogênico, (II) aumento de danos ao DNA no ensaio cometa e (III) indução de efeito pró-oxidante e consequente estresse oxidativo em células HepG2, o que torna ainda mais interessante o seu possível uso como antitumoral.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABDELKAFI-KOUBAA, Z. et al. Interaction of a snake venom L-amino acid oxidase with different cell types membrane. **Int J Biol Macromol**, Guildford, v. 82, p. 757-64, Jan 2016.
- ACHARYA, S. K. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in India. **J Clin Exp Hepatol**, Gurgaon, v. 4, n. Suppl 3, p. S27-33, Aug 2014.
- ALVES, R. M. et al. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by l-amino acid oxidase isolated from Bothrops atrox snake venom. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, New York, v. 151, n. 4, p. 542-50, Dec 2008.
- AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Arch Toxicol**, Berlin, v. 87, n. 6, p. 949-68, Jun 2013.
- BAL-PRICE, A.; COECKE, S. Guidance on good cell culture practice (GCCP). In: ASCHNER, M., et al. Cell Cultures Techniques, **Neuromethods**, New York, p. 1-25, 2011.
- BANIHASHEMI, M. et al. Optimization of Three Dimensional Culturing of the HepG2 Cell Line in Fibrin Scaffold. **Hepat Mon**, Tehran, v. 15, n. 3, p. e22731, Mar 2015.
- BECHOHRA, L.; LARABA-DJEBARI, F.; HAMMOUDI-TRIKI, D. Cytotoxic activity of Androctonus australis hector venom and its toxic fractions on human lung cancer cell line. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, Botucatu, v. 22, p. 29, 2016.
- BERNHARD, D. et al. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. **Cancer Lett**, Amsterdam, v. 195, n. 2, p. 193-9, Jun 10 2003.
- BISHAYEE, A.; SETHI, G. Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: Progress and promise. **Semin Cancer Biol**, London, v. 40-41, p. 1-3, Oct 2016.
- BOELEN, M. C. et al. Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways. **Cell**, Cambridge, v. 159, n. 3, p. 499-513, Oct 23 2014.
- BOESCH-SAADATMANDI, C. et al. Comparison of tetrahydrofuran, fetal calf serum, and Tween 40 for the delivery of astaxanthin and canthaxanthin to HepG2 cells. **Cytotechnology**, Boston, v. 63, n. 1, p. 89-97, Jan 2011.

BORDON, K. C. et al. Bordonein-L, a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus terrificus* snake venom: isolation, preliminary characterization and enzyme stability. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, Botucatu, v. 21, p. 26, 2015.

BREGGE-SILVA, C. et al. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. **Toxicon**, Oxford, v. 60, n. 7, p. 1263-76, Dec 01 2012.

BURHANS, W. C. et al. Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects. **Mutat Res**, Amsterdam, v. 532, n. 1-2, p. 227-43, Nov 27 2003.

BURIN, S. M. **Efeito da L- aminoácido oxidase de *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO) na indução de apoptose e modulação de microRNAs em células Bcr-Abl positivas**. 2015. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

BURIN, S. M. et al. CR-LAAO antileukemic effect against Bcr-Abl(+) cells is mediated by apoptosis and hydrogen peroxide. **Int J Biol Macromol**, Amsterdam, v. 86, p. 309-20, May 2016.

BURNS, M. P.; DEPAOLA, N. Flow-conditioned HUVECs support clustered leukocyte adhesion by coexpressing ICAM-1 and E-selectin. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, Bethesda, v. 288, n. 1, p. H194-204, Jan 2005.

CALDERON, L. A. et al. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. **Biomed Res Int**, New York, v. 2014, p. 203639, 2014.

CÂNCER. 2017: disponível em ><http://www.nature.com/subjects/cancer><. Acesso em: 22 de novembro de 2016.

CHACKO, S.; SAMANTA, S. "Hepatocellular carcinoma: A life-threatening disease". **Biomed Pharmacother**, New York, v. 84, p. 1679-1688, Dec 2016.

CHAIKUL, J. et al. Effects of Animal Venoms and Toxins on Hallmarks of Cancer. **J Cancer**, v. 7, n. 11, p. 1571-8, 2016.

CHEN, L.; MALHOTRA, A. Combination Approach: the Future of the War Against Cancer. **Cell Biochem Biophys**, Totowa, v. 72, n. 3, p. 637-41, Jul 2015.

COSTA TORRES, A. F. et al. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, Oxford, v. 55, n. 4, p. 795-804, Apr 01 2010.

COSTA, T. R. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, Botucatu, v. 20, p. 23, 2014.

COSTA, T. R. et al. Evaluating the microbicidal, antiparasitic and antitumor effects of CR-LAAO from *Calloselasma rhodostoma* venom. **Int J Biol Macromol**, Guildford, v. 80, p. 489-97, Sep 2015.

DAVEREY, A.; BROWN, K. M.; KIDAMBI, S. Breast Cancer/Stromal Cells Coculture on Polyelectrolyte Films Emulates Tumor Stages and miRNA Profiles of Clinical Samples. **Langmuir**, Washington, v. 31, n. 36, p. 9991-10001, Sep 15 2015.

DAVISON, G. W. Exercise and Oxidative Damage in Nucleoid DNA Quantified Using Single Cell Gel Electrophoresis: Present and Future Application. **Front Physiol**, Lausanne, v. 7, p. 249, 2016.

DEHN, P. F. et al. Characterization of the human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, Columbia, v. 40, n. 5-6, p. 172-82, May-Jun 2004.

DHANANJAYA, B. L.; SIVASHANKARI, P. R. Snake venom derived molecules in tumor angiogenesis and its application in cancer therapy; an overview. **Curr Top Med Chem**, Hilversum, v. 15, n. 7, p. 649-57, 2015.

DHUNGEL, B. et al. Seek and destroy: targeted adeno-associated viruses for gene delivery to hepatocellular carcinoma. **Drug Deliv**, Valencia, v. 24, n. 1, p. 289-299, Nov 2017.

DONG, C. et al. Role of the MAPK pathway in the observed bystander effect in lymphocytes co-cultured with macrophages irradiated with gamma-rays or carbon ions. **Life Sci**, Oxford, v. 127, p. 19-25, Apr 15 2015.

DUTTA, R.; MAHATO, R. I. Recent advances in hepatocellular carcinoma therapy. **Pharmacol Ther**, Oxford, Feb 05 2017.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, Thousand Oaks, v. 35, n. 4, p. 495-516, Jun 2007.

FANG, H.; DECLERCK, Y. A. Targeting the tumor microenvironment: from understanding pathways to effective clinical trials. **Cancer Res**, Baltimore, v. 73, n. 16, p. 4965-77, Aug 15 2013.

FEDR, R. et al. Automatic cell cloning assay for determining the clonogenic capacity of cancer and cancer stem-like cells. **Cytometry A**, Hoboken, v. 83, n. 5, p. 472-82, May 2013.

FERREIRA, S. H. University discoveries and intellectual property rights: from Bothrops jararaca bradykinin potentiating peptides to angiotensin converting enzyme inhibitors. **Braz J Med Biol Res**, São Paulo, v. 27, n. 8, p. 1693-8, Aug 1994.

FITZMORRIS, P. et al. Management of hepatocellular carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol**, Berlin, v. 141, n. 5, p. 861-76, May 2015.

FLAMAND, N. et al. Development of genotoxicity test procedures with Episkin, a reconstructed human skin model: towards new tools for in vitro risk assessment of dermally applied compounds? **Mutat Res**, Amsterdam, v. 606, n. 1-2, p. 39-51, Jul 14 2006.

FRANCA, S. C. et al. Molecular approaches for structural characterization of Bothrops L-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v. 355, n. 2, p. 302-6, Apr 06 2007.

FRANKEN, N. A. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat Protoc**, London, v. 1, n. 5, p. 2315-9, 2006.

FUNG, S. Y.; LEE, M. L.; TAN, N. H. Molecular mechanism of cell death induced by king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 96, p. 38-45, Mar 2015.

GAO, Z. et al. SIRT1 mediates Sphk1/S1P-induced proliferation and migration of endothelial cells. **Int J Biochem Cell Biol**, Amsterdam, v. 74, p. 152-60, May 2016.

GOERS, L.; FREEMONT, P.; POLIZZI, K. M. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. **J R Soc Interface**, London, v. 11, n. 96, Jul 06 2014.

GUO, C. et al. Akbu-LAAO exhibits potent anti-tumor activity to HepG2 cells partially through produced H₂O₂ via TGF-beta signal pathway. **Sci Rep**, Amsterdam, v. 5, p. 18215, Dec 14 2015.

GUO, C. et al. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. **Toxicon**, Oxford, v. 60, n. 3, p. 302-11, Sep 01 2012.

GUPTA, S. C. et al. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. **Antioxid Redox Signal**, Larchmont, v. 16, n. 11, p. 1295-322, Jun 01 2012.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans**, London, v. 35, p. 1147-1150, Nov 2007.

HARVEY, A. L. Toxins and drug discovery. **Toxicon**, Oxford, v. 92, p. 193-200, Dec 15 2014.

HO, C. S. et al. MicroRNAs associated with tumour migration, invasion and angiogenic properties in A549 and SK-Lu1 human lung adenocarcinoma cells. **Lung Cancer**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 154-62, Feb 2014.

HOSHINA, M. M. et al. Cytotoxic, genotoxic/antigenotoxic and mutagenic/antimutagenic effects of the venom of the wasp *Polybia paulista*. **Toxicon**, Oxford, v. 72, p. 64-70, Sep 2013.

HSIEH, T. C. et al. Treating hepatocellular carcinoma with 90Y-bearing microspheres: a review. **Biomedicine (Taipei)**, Taipei, v. 6, n. 4, p. 19, Nov 2016.

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

INCA. Ministério da Saúde. **Estimativa 2016, incidência de câncer no Brasil**, 2015.

IZIDORO, L. F. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. **Biomed Res Int**, New York, v. 2014, p. 196754, 2014.

JAIN, D.; KUMAR, S. Snake venom: a potent anticancer agent. **Asian Pac J Cancer Prev**, Bangkok, v. 13, n. 10, p. 4855-60, 2012.

JANTZEN, K. et al. Oxidative damage to DNA by diesel exhaust particle exposure in co-cultures of human lung epithelial cells and macrophages. **Mutagenesis**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 693-701, Nov 2012.

KARDEH, S.; ASHKANI-ESFAHANI, S.; ALIZADEH, A. M. Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v. 735, p. 150-68, Jul 15 2014.

KATT, M. E. et al. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. **Front Bioeng Biotechnol**, Lausanne, v. 4, p. 12, 2016.

KIKUCHI, L. et al. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. **Antivir Ther**, London, v. 18, n. 3 Pt B, p. 445-9, 2013.

KIMURA, A.; MIYATA, A.; HONMA, M. A combination of in vitro comet assay and micronucleus test using human lymphoblastoid TK6 cells. **Mutagenesis**, Oxford, v. 28, n. 5, p. 583-90, Sep 2013.

KIRKLAND, D. et al. Updated recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, Amsterdam, v. 795, p. 7-30, Jan 01 2016.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group. **Environ Mol Mutagen**, New York, v. 35, n. 3, p. 167-72, 2000.

KNASMULLER, S. et al. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. **Toxicology**, Amsterdam, v. 198, n. 1-3, p. 315-28, May 20 2004.

KOKURA, S. et al. Molecular mechanisms of neutrophil-endothelial cell adhesion induced by redox imbalance. **Circ Res**, Baltimore, v. 84, n. 5, p. 516-24, Mar 19 1999.

KOPPEN, G. et al. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, Oxford, Mar 04 2017.

KOTOKU, N.; ARAI, M.; KOBAYASHI, M. Search for Anti-angiogenic Substances from Natural Sources. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, Tokio, v. 64, n. 2, p. 128-34, 2016.

LANGIE, S. A.; AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The comet assay: past, present, and future. **Front Genet**, Lausanne, v. 6, p. 266, 2015.

LEE, M. L. et al. Antibacterial action of a heat-stable form of L-amino acid oxidase isolated from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, New York, v. 153, n. 2, p. 237-42, Mar 2011.

LIU, C. C. et al. Biotoxins for cancer therapy. **Asian Pac J Cancer Prev**, Bangkok, v. 15, n. 12, p. 4753-8, 2014.

LLOVET, J. M. et al. Hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Dis Primers**, London, v. 2, p. 16018, Apr 14 2016.

MARCINKIEWICZ, C. Functional characteristic of snake venom disintegrins: potential therapeutic implication. **Curr Pharm Des**, Schiphol, v. 11, n. 7, p. 815-27, 2005.

MARCUSSI, S. et al. Genotoxic effect of Bothrops snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA. **Toxicon**, Oxford, v. 65, p. 9-14, Apr 2013.

MIKI, Y. et al. The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment. **J Steroid Biochem Mol Biol**, Oxford, v. 131, n. 3-5, p. 68-75, Sep 2012.

MORAES, C. et al. Organs-on-a-chip: a focus on compartmentalized microdevices. **Ann Biomed Eng**, New York, v. 40, n. 6, p. 1211-27, Jun 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

NAUMANN, G. B. et al. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from Bothrops leucurus venom. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1810, n. 7, p. 683-94, Jul 2011.

NATURAL Products. 2017: disponível em > <http://www.nature.com/subjects/natural-products><. Acesso em: 30 de março de 2017.

NEUSS, S.; MOEPPS, B.; SPEIT, G. Exposure of human nasal epithelial cells to formaldehyde does not lead to DNA damage in lymphocytes after co-cultivation. **Mutagenesis**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 359-64, Jul 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod**, Shariyah, v. 79, n. 3, p. 629-61, Mar 25 2016.

NORBURY, C. J.; HICKSON, I. D. Cellular responses to DNA damage. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, Palo Alto, v. 41, p. 367-401, 2001.

NOVAK ZOBIOLE, N. et al. In vitro and in vivo genotoxic evaluation of Bothrops moojeni snake venom. **Pharm Biol**, v. 53, n. 6, p. 930-4, Jun 2015.

PRUCHNIAK, M. P.; ARAZNA, M.; DEMKOW, U. Biochemistry of Oxidative Stress. **Adv Exp Med Biol**, New York, v. 878, p. 9-19, 2016.

QIU, G. H. et al. Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B. **Cytotechnology**, Boston, v. 67, n. 1, p. 1-12, Jan 2015.

RAFFRAY, M.; COHEN, G. M. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death? **Pharmacol Ther**, Londn, v. 75, n. 3, p. 153-77, Sep 1997.

RIBEIRO, P. H. et al. Mechanism of the cytotoxic effect of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. **Int J Biol Macromol**, Amsterdam, v. 92, p. 329-337, Nov 2016.

ROTHFUSS, A. et al. Improvement of in vivo genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. **Mutat Res**, Amsterdam, v. 723, n. 2, p. 108-20, Aug 16 2011.

SAED, G. M.; DIAMOND, M. P.; FLETCHER, N. M. Updates of the role of oxidative stress in the pathogenesis of ovarian cancer. **Gynecol Oncol**, New York, Feb 23 2017.

SCHUTTE, K.; BALBISI, F.; MALFERTHEINER, P. Prevention of Hepatocellular Carcinoma. **Gastrointest Tumors**, Basel, v. 3, n. 1, p. 37-43, Sep 2016.

SUMANTRAN, V. N. Cellular chemosensitivity assays: an overview. **Methods Mol Biol**, Totowa, v. 731, p. 219-36, 2011.

SZYCHOWSKI, K. A. et al. Tetrabromobisphenol A (TBBPA)-stimulated reactive oxygen species (ROS) production in cell-free model using the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA) assay-limitations of method. **Environ Sci Pollut Res Int**, Landsberg, v. 23, n. 12, p. 12246-52, Jun 2016.

TAVORA, B. et al. Endothelial-cell FAK targeting sensitizes tumours to DNA-damaging therapy. **Nature**, London, v. 514, n. 7520, p. 112-6, Oct 02 2014.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, New York, v. 35, n. 3, p. 206-21, 2000.

TICLI, F. K. **Caracterização funcional e estrutural de uma L-Aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops jararacussu* e avaliação da sua ação antitumoral, antiparasitária e bactericida**. 2006. (Tese (Doutorado em Toxicologia)). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

TOXINOLOGY. 2017: Disponível em ><https://link.springer.com/bookseries/13330><. Acesso em: 30 de março de 2017.

TRENDOWSKI, M. Recent Advances in the Development of Antineoplastic Agents Derived from Natural Products. **Drugs**, New York, v. 75, n. 17, p. 1993-2016, Nov 2015.

TYAKHT, A. V. et al. RNA-Seq gene expression profiling of HepG2 cells: the influence of experimental factors and comparison with liver tissue. **BMC Genomics**, London, v. 15, p. 1108, Dec 15 2014.

ULLAH, A. et al. Structural insights into selectivity and cofactor binding in snake venom L-amino acid oxidases. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v. 421, n. 1, p. 124-8, Apr 27 2012.

VAN MOORST, M.; DASS, C. R. Methods for co-culturing tumour and endothelial cells: systems and their applications. **J Pharm Pharmacol**, Los Angeles, v. 63, n. 12, p. 1513-21, Dec 2011.

VAN TONDER, A.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Res Notes**, London, v. 8, p. 47, Feb 20 2015.

VONK, F. J. et al. Snake venom: From fieldwork to the clinic: Recent insights into snake biology, together with new technology allowing high-throughput screening of venom, bring new hope for drug discovery. **Bioessays**, Cambridge, v. 33, n. 4, p. 269-79, Apr 2011.

VYAS, V. K. et al. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. **Asian Pac J Trop Biomed**, Singapore, v. 3, n. 2, p. 156-62, Feb 2013.

WANG, H.; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader, **Free Radical Bio Med**, New York, v. 27, p. 612-616, 1999.

WANG, X. et al. Comparison of MTT assay, flow cytometry, and RT-PCR in the evaluation of cytotoxicity of five prosthodontic materials. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, Hoboken, v. 95, n. 2, p. 357-64, Nov 2010.

WANG, Y. H. et al. Vascular endothelial cells facilitated HCC invasion and metastasis through the Akt and NF-kappaB pathways induced by paracrine cytokines. **J Exp Clin Cancer Res**, London, v. 32, n. 1, p. 51, Aug 13 2013.

WARIS, G.; AHSAN, H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. **J Carcinog**, Mumbai, v. 5, p. 14, May 11 2006.

XUE, X. et al. Vasohibin 2 is transcriptionally activated and promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, Basingstoke, v. 32, n. 13, p. 1724-34, Mar 28 2013.

YAMAZOE, H.; HAGIHARA, Y.; KOBAYASHI, H. Multicomponent Coculture System of Cancer Cells and Two Types of Stromal Cells for In Vitro Evaluation of Anticancer Drugs. **Tissue Eng Part C Methods**, New Rochelle, v. 22, n. 1, p. 20-9, Jan 2016.

YOUSEFI, B. et al. Inhibition of MEK/ERK1/2 Signaling Affects the Fatty Acid Composition of HepG2 Human Hepatic Cell Line. **Bioimpacts**, Tabriz, v. 2, n. 3, p. 145-50, 2012.

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**, Milton Park, v. 22, n. 6, p. 554-63, Apr 15 2008.

ZHANG, W. et al. Communication between malignant glioma cells and vascular endothelial cells through gap junctions. **J Neurosurg**, Chicago, v. 98, n. 4, p. 846-53, Apr 2003.

APÊNDICE

Apêndice A.

Cálculo da atividade de L-aminoácido oxidase de acordo com a equação:

$$y = 291,12 x - 13,71$$

y = valor encontrado de atividade em unidade em 2 µg de toxina. Assim:

$$\frac{y}{x} = \frac{2 \mu\text{g}}{1000 \mu\text{g}}$$

x = valor encontrado de atividade em unidade em 1 mg de toxina. Como o tempo de análise é 30 minutos, o valor deve ser dividido por 30 para se obter a unidade em minutos. Assim:

$$\frac{x}{30} = \text{valor de atividade em U/mg/min}$$

Tabela de acompanhamento da atividade de BjussuLAAO-II ao longo do tempo

Concentração de LAAO	Data	Atividade (U/mg/min)
471 µg/mL	30/9/2015	3223,0
	7/10/2015	2720,5
	14/10/2015	2715,0
846 µg/mL	18/11/2015	1349,0
	25/11/2015	1343,9
	2/12/2015	1164,8
1010 µg/mL	11/11/2015	5204,6
	2/12/2015	5079,9
	3/3/2016	44643,1
	9/3/2016	4194,4
1340 µg/mL	29/8/2016	2488,1
	31/10/2016	2372,0
1140 µg/mL	26/09/2016	3678,9
	31/10/2016	3081,0
	17/01/2017	1523,7

Apêndice B.

Efeito da BjussuLAAO-II em HepG2, semeadas em placas de cocultura detectada por MTT

Viabilidade Celular (%) de células HepG2 semeadas em placa de cocultura sem a presença de células HUVEC após 24 horas de tratamento com BjussuLAAO-II (0,25 – 5 µg/mL). CN: controle negativo (PBS); CP: controle positivo (MMS-300 µM). Média ± desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ ANOVA e pós teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).