Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**Análise da estrutura tridimensional da L-aminoácido oxidase de
Bothrops atrox e suas interações biológicas *in vitro* e *in vivo***

Raquel de Melo Alves Paiva

Ribeirão Preto
2011

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**Análise da estrutura tridimensional da L-aminoácido oxidase de
Bothrops atrox e suas interações biológicas *in vitro* e *in vivo***

**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.**

Área de Concentração: Toxicologia.

Aluna: Raquel de Melo Alves Paiva

Orientadora: Profa. Dra. Suely Vilela

Ribeirão Preto

2011

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

Catálogo da Publicação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP)
Universidade de São Paulo (USP)

FICHA CATALOGRÁFICA

Alves-Paiva, Raquel de Melo.

Análise da estrutura tridimensional da L-aminoácido oxidase de *Bothrops atrox* e suas interações biológicas *in vitro* e *in vivo*. Ribeirão Preto, 2011.

129 p. : il. ; 30cm

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

Orientadora: Vilela, Suely.

1. L-aminoácido oxidase. 2. Cristalografia. 3. Estrutura tridimensional. 4. Atividade citotóxica. 5. Expressão gênica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Aluno: Raquel de Melo Alves Paiva

Título do trabalho: Análise da estrutura tridimensional da L-aminoácido oxidase de *Bothrops atrox* e suas interações biológicas *in vitro* e *in vivo*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Suely Vilela

APROVADO EM:

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). _____
Instituição _____
Assinatura _____

Prof(a). Dr(a). _____
Instituição _____
Assinatura _____

Prof(a). Dr(a). _____
Instituição _____
Assinatura _____

Prof(a). Dr(a). _____
Instituição _____
Assinatura _____

Prof(a). Dr(a). _____
Instituição _____
Assinatura _____

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a três pessoas que amo muito: meu marido, meu pai e minha mãe. Vocês são os responsáveis por tudo o que sou hoje. Sem vocês, esta vitória não teria o mesmo sentido. Amo os imensamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de todas as coisas, pelas oportunidades, desafios e vitórias alcançadas. “Confia no Senhor de todo o teu coração, e não te estribes no teu próprio entendimento” (Pv. 3:5).

À minha orientadora, Dra. Suely Vilela, pela condução deste trabalho, pela oportunidade de aperfeiçoamento e maturidade profissional e pelo exemplo de profissionalismo e determinação. Obrigada, professora, pela confiança e carinho, por me deixar conhecê-la como pessoa e admirá-la cada vez mais.

Ao meu querido marido, Helder, um agradecimento especial por acreditar em mim, por me fazer sorrir, incentivando-me a lutar e ir ao encontro do meu maior sonho. Obrigada pelo amor, compreensão, carinho e apoio incansáveis, ao longo dos anos, para a elaboração desta tese, pelos gráficos, leituras de papers, noites de sono perdidas, pelo silêncio, pelo barulho, enfim, por todo incentivo. Obrigada por fazer parte dessa nova vitória. Simplesmente, AMO VOCÊ!

Ao senhor Luiz, um homem inteligente, sempre visando ao meu futuro, e à senhora Luíza, mulher sábia, cheia de emoções e sentimentos por ficarmos tão longe. Muito obrigada por seus esforços, por me apoiarem, por me ouvirem chorar, por simplesmente me abraçarem no momento certo e dizerem palavras certas, por acreditarem em mim mesmo quando eu mesma desacreditei. Vocês são meu orgulho, exemplos do verdadeiro amor, da verdadeira união. Foram os responsáveis por me guiar pelos caminhos corretos, ensinando-me a fazer as melhores escolhas, mostrando-me que a honestidade e o respeito

são essenciais à vida, e que devemos sempre lutar pelo que queremos. A eles devo a pessoa que me tornei. Sou extremamente feliz e tenho muito orgulho por chamá-los de PAI e MÃE... EU AMO VOCÊS!

Aos meus queridos que, de alguma forma, me ajudaram a chegar até este momento. Minha avó, Lourdes, mulher sábia que guarda os meus segredos e me ensina o que realmente vale a pena. Às minhas tias, Fran e Pas, pela amizade e companheirismo. Aos meus irmãos, Rafael e Ricardo, e suas respectivas esposas mais que especiais, Déa e Luca. Aos meus cunhados, Antonielle e Leandro, pelo carinho, respeito e amizade. Obrigada por me aceitarem e permitirem que eu faça parte da vida de vocês. À minha querida sogra, por nossas conversas, desabafo, nosso carinho e respeito. Você é, com certeza, uma mãe especial. São seres maravilhosos, amigos que sempre me incentivam e, acima de tudo, me amam de verdade. Obrigada, meus queridos, pelo apoio, pelos telefonemas, pelo carinho.

Aos meus príncipes, Felipe, Guilherme e Luiz Otávio e à minha princesinha Bia. Eles não são capazes de imaginar a alegria que trazem à minha vida. Amo vocês, meus pequenos!

Aos colegas e amigos do laboratório de Toxinologia: Marco Aurélio, Adélia, Thales, Luiz Fernando, Sante, Renato, meu querido amigo Franco, minha querida amiga Lanuze e meu querido “fiote”, Cássio. Obrigada pelo carinho, dedicação, respeito e confiança.

Aos professores e colaboradores de outros laboratórios e até mesmo de outras Unidades de Ensino que permitiram ampliar

meus conhecimentos científicos e ajudaram na finalização deste trabalho.

Aos funcionários da FCFRP-USP, desde porteiros aos responsáveis pela limpeza dos laboratórios.

Às fundações CAPES, CNPq e especialmente à FAPESP (Processo 07/51700-1) pelo auxílio financeiro, favorecendo o bom desempenho do projeto inicialmente proposto.

ALVES-PAIVA, R.M. **Análise da estrutura tridimensional da L-aminoácido oxidase de *Bothrops atrox* e suas interações biológicas *in vitro* e *in vivo*.** 2011. 129 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2011.

O presente trabalho apresenta a determinação da estrutura tridimensional da L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops atrox* (BatroxLAAO) e sua avaliação como potencial agente biotecnológico. Quanto à caracterização estrutural, a enzima BatroxLAAO (6 mg/mL) foi submetida à vários *screenings* e, por meio destas variações, obtivemos um resultado ideal para o crescimento dos monocristais sob a condição de 0,05 M de sulfato heptahidratado de zinco, 15% (v/v) de Polietilenoglicol monometil éter 550, controle de pH 5 com 0,1M de cacodilato de sódio. A utilização de parafina e silicone resultou na melhora dos cristais, revelando cristais únicos e de coloração amarela, o que permitiu o melhor crescimento e difração desses cristais, a 2,3 Å. Estes dados permitiram a determinação de estrutura terciária de BatroxLAAO e, portanto, melhor entendimento dos mecanismos de atuação da mesma. A proteína foi obtida, através de passos cromatográficos, com rendimento médio de 1,54% do veneno bruto. Esta apresentou acentuada inibição da proliferação celular de células tumorais HL-60, JURKAT, PC12 e B16F10, principalmente nas maiores concentrações (50 e 100 µg/mL). Ainda, o tratamento de células PBMC com BatroxLAAO, demonstrou baixa citotoxicidade em relação ao tratamento das células tumorais. A viabilidade celular da *Leishmania* sp. foi analisada após o tratamento com BatroxLAAO. A adição de BatroxLAAO diretamente às formas promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* resultou em morte dos parasitas de forma dose-dependente. As espécies *L. major* e *L. donovani* foram as mais susceptíveis ao efeito tóxico de BatroxLAAO. O efeito tóxico apresentado pela BatroxLAAO foi quase completamente abolido pela adição de catalase, sugerindo que a liberação de H₂O₂ está diretamente envolvida com o efeito da enzima. A atividade bactericida foi avaliada pela inibição do crescimento das cepas de *E. coli* e *S. aureus* após tratamento com a BatroxLAAO. A proteína (37,5 µg/mL) apresentou alta atividade fungicida contra *Candida albicans*, com 100% da inibição do crescimento das cepas. Foi avaliada a atividade tripanomicida, onde BatroxLAAO mostrou-se potencialmente ativa sobre *T. cruzi*. Foram realizados experimentos para a produção de anticorpo monoclonal (anti-BatroxLAAO). O anticorpo produzido apresentou reatividade até diluição 1:60000. No entanto, após a realização do teste de ELISA com o anticorpo produzido e outras L-aminoácidos oxidases de diferentes venenos de serpentes, averiguamos que o anti-BatroxLAAO não tem especificidade única, ocorrendo reatividade para todos os venenos e proteínas testadas. Foram realizados ensaios *in vivo* para a detecção da expressão dos genes *FAS*, *BAX* e *BCL2*. Os dados obtidos sugerem que BatroxLAAO apresenta potencial biotecnológico bastante evidente nas ações leishmanicida e fungicida, bem como na atividade antitumoral, *in vitro*, mostrando-se um composto com potencial agente terapêutico.

Palavras-chave: LAAO, *B. atrox*, cristalografia, estrutura tridimensional, atividade citotóxica, expressão gênica.

ALVES-PAIVA, R.M. **Analysis of three-dimensional structure of L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* and its biological interactions *in vitro* and *in vivo***. 2011. 129 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2011.

This work presents the determination of three-dimensional structure of L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* (BatroxLAAO) and its evaluation as a potential biotechnology agent. Regarding the structural characterization, BatroxLAAO (6 mg / mL) underwent multiple screenings, and through these variations, we got an ideal result for the single crystals growth under condition of 0.05 M zinc sulfate heptahydrate, 15 % (v / v) polyethylene glycol monomethyl ether 550, pH control: 5.0 with 0.1 M sodium cacodylate. The use of paraffin and silicone resulted in the improvement of the crystals, revealing single and yellow crystals, which allowed better growth and diffraction of these crystals, to 2.3 Å. These data allowed the determination of tertiary structure BatroxLAAO and therefore better understanding of action mechanisms of this protein. The protein was obtained using three chromatographic steps, with an average yield of 1.54% from crude venom. This showed marked inhibition of cell proliferation on tumor cells as HL-60, Jurkat, PC12 and B16F10, especially at higher concentrations (50 and 100 µg / mL). Also, treatment of PBMC cells with BatroxLAAO showed low cytotoxicity in comparison to the treatment on tumor cells. Cell viability of *Leishmania* sp. was analyzed after treatment with BatroxLAAO. The addition of BatroxLAAO directly to promastigotes forms of different species of *Leishmania* resulted in a dose-dependent death. The species *L. major* and *L. donovani* were more susceptible to the toxic effect of BatroxLAAO. The toxic effect presented by BatroxLAAO was almost completely abolished by the addition of catalase, suggesting that the release of H₂O₂ is directly involved with the effect of this enzyme. The bactericidal activity was evaluated by inhibiting the strains growth of *E. coli* and *S. aureus* after treatment with BatroxLAAO. The protein (37.5 µg / mL) showed high fungicidal activity against *Candida albicans* with 100% growth inhibition of strains. We evaluated the trypanocidal activity, where BatroxLAAO proved to be potentially active against the *T. cruzi* parasite. Experiments were carried out for production of monoclonal antibody (anti-BatroxLAAO). The antibody showed reactivity produced by dilution until 1:60000. However, after performing the ELISA assay with the antibody produced and other L-amino acid oxidases from different snake venoms, we found that anti-BatroxLAAO did not present unique specificity, BatroxLAAO reacted with all poisons and proteins tested. Experiments, *in vivo*, were performed to detect the gene expression of *FAS*, *BAX* and *BCL2*. These data suggest that BatroxLAAO presented quite evident biotechnologic potential as leishmanicidal, fungicidal and antitumoral, *in vitro*, agent. Further studies are needed to confirm the potential therapeutic use of this protein.

Keywords: LAAO, *B. atrox*, crystallography, tridimensional structure, cytotoxicity activity, gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desidrogenação de L-aminoácidos catalisada por LAAO.....	4
Figura 2. “Checkpoints” no controle do ciclo celular.....	7
Figura 3. (A) Difusão de vapor em gota suspensa (“hanging drop”). (B) Difusão de vapor em gota sentada (“sitting drop”).....	19
Figura 4. Esquema do método de difusão de vapor em gota sentada utilizando óleo.....	21
Figura 5. Procedimento para a produção de anticorpos monoclonais.....	28
Figura 6. Formação de cristais de BatroxLAAO.....	42
Figura 7. Cristais da enzima BatroxLAAO.....	42
Figura 8. Cristais de BatroxLAAO, em forma de “vassouras”, obtidos após altas concentrações de PEG MME 550.....	43
Figura 9. Monocristais da enzima BatroxLAAO.....	43
Figura 10. Representação parcial da estrutura da BatroxLAAO.....	45
Figura 11. Sequência parcial de aminoácidos de BatroxLAAO.....	48
Figura 12. Monocristais da enzima BatroxLAAO.....	50
Figura 13. Efeitos antiparasitários da LAAO de <i>Bothrops atrox</i>	52
Figura 14. Atividade bactericida de L-aminoácido oxidase da peçonha de <i>Bothrops atrox</i> sobre <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	53
Figura 15. Atividade tripanomicida de BatroxLAAO.....	54
Figura 16. Produção de soro de camundongo anti-BatroxLAAO.....	57
Figura 17. Reatividade do soro de camundongo anti-BatroxLAAO com outras substâncias.....	58
Figura 18. Detecção de anticorpo anti-BatroxLAAO.....	58
Figura 19. Viabilidade celular de BatroxLAAO avaliada por MTT.....	60
Figura 20. Análise de indução de apoptose por citometria de fluxo em células da linhagem JURKAT expostas ao tratamento com BatroxLAAO.....	62

Figura 21. Análise de indução de apoptose por citometria de fluxo em células da linhagem B16F10 expostas ao tratamento com BatroxLAAO.....	63
Figura 22. Análise de indução de apoptose por citometria de fluxo em células da linhagem PC12 expostas ao tratamento com BatroxLAAO.....	64
Figura 23. Análise de indução de apoptose por citometria de fluxo em células PBMC expostas ao tratamento com BatroxLAAO.....	65
Figura 24. Análise comparativa por microscopia de epifluorescência da morfologia celular presente em cultura de células tumorais HL-60 (A) e células PBMC (B) tratadas com BatroxLAAO.....	67
Figura 25. Análise de núcleos apoptóticos por microscopia de epifluorescência em linhagem celular HL-60.....	67
Figura 26. Inibição da progressão do ciclo celular em células HL-60 após o tratamento com BatroxLAAO.....	69
Figura 27. Gel de agarose 1% com amostras de RNA extraídas de órgãos e/ou tumores de animais inoculados com células tumorais.....	71
Figura 28. Amplificação representativa da PCR para detecção de um produto de 399 pares de base (pb) de uma porção do gene GAPDH.....	71
Figura 29. Perfil de expressão do gene <i>bcl2</i> por PCR em tempo real: células B16F10.....	73
Figura 30. Perfil de expressão do gene <i>bcl2</i> por PCR em tempo real: células PC12.....	74
Figura 31. Perfil de expressão do gene <i>bcl2</i> por PCR em tempo real: células JURKAT.....	76
Figura 32: Perfil de expressão do gene <i>bax</i> por PCR em tempo real: células B16F10.....	78
Figura 33: Perfil de expressão do gene <i>bax</i> por PCR em tempo real: células PC12.....	79
Figura 34: Perfil de expressão do gene <i>bax</i> por PCR em tempo real: células JURKAT.....	81
Figura 35. Perfil de expressão do gene <i>fas</i> por PCR em tempo real: células B16F10.....	83
Figura 36. Perfil de expressão do gene <i>fas</i> por PCR em tempo real: células PC12.....	85

Figura 37. Perfil de expressão do gene <i>fas</i> por PCR em tempo real: células JURKAT.....	86
Figura 38. Identificação da proteína pró-apoptótica: BAX.....	87
Figura 39. Vias de sinalização de p53 para atraso no ciclo celular e apoptose.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos Experimentais de tratamento com BatroxLAAO.....	34
Tabela 2. Padronização do gene constitutivo para PCR semiquantitativa.....	36
Tabela 3. Coleta de Dados e processamento estatístico.....	44
Tabela 4. Coleta de Dados e processamento estatístico.....	47
Tabela 5. Valores de referência para potencial de atividade.....	54
Tabela 6. Atividade Fungicida de BatroxLAAO em <i>Candida albicans</i>	55
Tabela 7. Purificação da L-aminoácido oxidase de <i>Bothrops atrox</i>	90
Tabela 8. Atividade L-Aminoácido Oxidase de Peçonhas de Serpentes.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpos
AMBIC	Bicarbonato de Amônio
ATCC	Coleção Americana de Cultura de Células
B.	Gênero <i>Bothrops</i>
B16F10	Melanoma murino
C.	Gênero <i>Crotalus</i>
C.	<i>Candida</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAPI	Diacetato de Iodeto de Propídeo
DMEM	Meio de cultura celular (modificação do meio basal Eagle – BME)
DMSO	Dimetilsulfóxido
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
JURKAT	Células de Leucemia T
L.	<i>Leishmania</i>
LAAOs	L-aminoácido oxidases
MPs	Metaloproteases
MTT	3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium
PBS	Tampão Salina Fosfato
PC12	Tumor de glândula adrenal
PEG	Polietilenoglicol
pI	Ponto Isoelétrico
PLA₂	Fosfolipases A ₂
RPMI	Meio de cultura celular (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	vi
Lista de Abreviaturas e siglas	vii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos Gerais sobre as serpentes no Brasil	2
1.2 Gênero <i>Bothrops</i>	3
1.3 L-AMINOÁCIDO OXIDASES	4
1.4 Efeitos biológicos das L-aminoácido oxidases	5
1.5 Estruturas tridimensionais de proteínas de serpentes	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 MATERIAL	16
3.1.1 Peçonha	16
3.1.2 Proteína	16
3.1.3 Linhagens Celulares	16
3.1.4 Outras linhagens	16
3.1.5 Reagentes	16
3.1.6 Animais	17
3.1.7 Comitê de Ética em Pesquisa	17
3.2 MÉTODOS	18
3.2.1 Isolamento de L-aminoácido oxidase da peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	18
3.2.2 Caracterização Bioquímica	18
3.2.2.1 Cristalização	18
3.2.2.1.1 Cristalização da BatroxLAAO	18
3.2.2.1.2 Cristalização de BatroxLAAO na presença de óleo	20

3.2.2.1.3 Semeadura – “Macroseeding”	21
3.2.2.1.4 Coleta e Processamento de Dados	21
3.2.2.1.5 Determinação da estrutura e refinamento	22
3.2.3 Caracterização funcional	22
3.2.3.1 Atividade Leishmanicida	22
3.2.3.1.1 Linhagem de <i>Leishmania</i> em condições de cultura	22
3.2.3.1.2 Efeito citotóxico da BatroxLAAO sobre <i>Leishmania</i>	23
3.2.3.2 Atividade Tripanomicida	23
3.2.3.2.1 Técnica de coloração pelo MTT – 3, (-4,5 – dimetiltiazol – 2 il) - 2,5 - difenil tetrazolium brometo	24
3.2.3.3 Atividade Bactericida	25
3.2.3.3.1 Manutenção de Cepas de Bactérias	25
3.2.3.3.2 Atividade Bactericida de BatroxLAAO	25
3.2.3.4 Atividade Fungicida	25
3.2.3.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	26
3.2.3.5 Produção de Anticorpos	26
3.2.3.5.1 Imunização de animais para obtenção de anticorpos anti-LAAO	26
3.2.3.5.2 Fusão celular	27
3.2.3.5.3 Detecção de anticorpos anti-LAAO em soros de camundongos imunizados com BatroxLAAO por ELISA	29
3.2.3.5.4 Detecção de anticorpos policlonais anti-LAAO em soros de camundongos imunizados com as respectivas proteínas por <i>Western Blotting</i>	30
3.2.3.6 Atividade Anti-tumoral	30
3.2.3.6.1 Manutenção da linhagem celular	30
3.2.3.6.2 Tratamento das células com a BatroxLAAO	31
3.2.3.6.3 Análise do efeito antitumoral induzido por catalase	31
3.2.3.6.4 Análise por citometria de fluxo	32
3.2.3.6.5 Determinação do índice apoptótico com diferentes corantes	33
3.2.3.6.6 Análise da cinética do ciclo celular	33
3.2.3.7 Inoculação de Tumor	34

3.2.3.7.1 Cultura Celular	34
3.2.3.7.2 Extração de RNA, síntese de cDNA, PCR semiquantitativa e PCR em tempo real	35
3.2.3.7.3. Detecção da proteína BAX por Western Blotting	36
3.2.3.8 Análise estatística	36
4 RESULTADOS	38
4.1 Cristalização	39
4.1.1 Cristalização de BatroxLAAO	39
4.1.2 Coleta de dados e determinação da estrutura cristalográfica de BatroxLAAO	46
4.2 Caracterização funcional	51
4.2.1 Atividade Leishmanicida	51
4.2.2 Atividade Bactericida	53
4.2.3 Atividade Tripanomicida	54
4.2.4 Atividade Fungicida	55
4.3 Produção de anticorpos	56
4.3.1 Produção de imunoglobulinas de camundongos anti-BatroxLAAO	56
4.4.1 Citotoxicidade	59
4.4.2 Análise do efeito da indução de apoptose e necrose em linhagens celulares	61
4.5 Análise sobre células tumorais	66
4.5.1 Análise sobre a linhagem tumoral HL-60 e células mononucleares do sangue periférico	66
4.5.2 Análise da cinética do ciclo celular	68
4.6 Inoculação de tumor	70
4.6.1 Análise da expressão diferencial dos genes <i>bax</i> , <i>fas</i> e <i>bcl2</i> por PCR em tempo real	70
4.6.2 Expressão diferencial do gene <i>bcl-2</i>	72
4.6.2.1 Células B16F10	72
4.6.2.2 Células PC12	74
4.6.2.3 Células JURKAT	75

4.6.3 Expressão diferencial do gene <i>bax</i>	77
4.6.3.1 Células B16F10	77
4.6.3.2 Células PC12	79
4.6.3.3 Células JURKAT	80
4.6.4 Expressão diferencial do gene <i>fas</i>	82
4.6.4.1 Células B16F10	82
4.6.4.2 Células PC12	84
4.6.4.3 Células JURKAT	86
4.6.5 Detecção de proteína pró-apoptótica por <i>Western Blotting</i>	87
4.6.5.1 Identificação da proteína pró-apoptótica: BAX	87
5 DISCUSSÃO	88
6 CONCLUSÃO	111
1) Quanto ao aspecto estrutural	112
2) Quanto ao potencial biotecnológico	112
3) Quanto à produção de anticorpos anti-BatroxLAAO	113
4) Quanto ao potencial antitumoral <i>in vitro</i>	114
5) Quanto ao potencial antitumoral <i>in vivo</i>	114
6) Considerações finais	114
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116

INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais sobre as serpentes no Brasil

A grande biodiversidade existente no mundo resulta em uma grande heterogeneidade de peçonhas, que contém toxinas biologicamente ativas. Essas toxinas podem ser formadas por pequenas moléculas como aminas ou proteínas grandes e complexas, podendo variar, consideravelmente, em estrutura e função entre os indivíduos, espécies, gêneros ou famílias (MEBS, 2001).

Existem aproximadamente 3.000 espécies de serpentes no mundo, sendo que apenas 410 (13,7%) são consideradas peçonhentas e classificadas, de acordo com suas características morfológicas, em 4 famílias: Viperidae, Elapidae, Hydrophyidae e Colubridae (BARRAVIEIRA, 1999).

A fauna brasileira é representada por aproximadamente 18 famílias de serpentes da ordem Squamata. Dentre elas, encontra-se a família Viperidae com os gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus* e a família Elapidae com os gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus* (MELGAREJO, 2003). No Brasil, das 256 espécies catalogadas até o momento, 69 são peçonhentas (27%) sendo 32 pertencentes ao gênero *Bothrops*, representado pelas jararacas; 29 ao gênero *Micrurus*, representado pelas corais-verdadeiras; 6 ao gênero *Crotalus*, representado pelas cascavéis e 2 ao gênero *Lachesis*, representado pelas surucucus (BARRAVIEIRA, 1994; BARRAVIEIRA, 1999).

A gravidade e a grande frequência dos acidentes ofídicos que ocorrem no país acarretam sérios problemas à saúde humana e exigem notificação obrigatória ao Ministério e às Secretarias Estaduais de Saúde.

As peçonhas de serpentes chamam a atenção quanto às inúmeras propriedades bioquímicas, funcionais e estruturais. Sob o ponto de vista químico, são constituídas, na sua grande maioria, por proteínas e peptídeos, que atuam por diferentes mecanismos na paralisia, morte e digestão da presa (MEBS, 2001). A composição das peçonhas de serpentes depende de variações associadas com as origens geográficas, habitat do animal, variação sazonal, dieta, idade e gênero (MACKESSY, 1988; CHIPPAUX et al, 1991; MACKESSY et al, 2003; GUÉRCIO et al., 2006; FURTADO et al., 2006).

1.2. Gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops* destaca-se como o responsável por cerca de 90% do total de acidentes ofídicos ocorridos no Brasil (ROSENFELD, 1971; FERREIRA et al., 1992; RIBEIRO et al., 1993; da SILVA et al., 2003; QUEIROZ et al., 2008).

A mortalidade causada pelas espécies botrópicas, foi estimada em 2,4% podendo atingir 8% quando não tratadas devidamente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1981). Nestes casos o edema, a hemorragia e a necrose muscular são as mais sérias manifestações clínicas locais, causando incapacidade prolongada ou permanente do membro atingido. Alguns componentes isolados das peçonhas do gênero *Bothrops*, enzimas que provocam distúrbios da coagulação sangüínea (ASSAKURA et al., 1985; HOFMANN; BON, 1987), e miotoxinas (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 1989; HOMSI-BRADENBURGO et al., 1988) são responsáveis pelos sintomas clínicos do envenenamento botrópico.

A peçonha botrópica possui três atividades principais: 1) *proteolítica* ou necrosante, determina edema inflamatório na região da picada; 2) *coagulante*, atua através de uma ou mais ações como *trombina símile* (semelhante à ação da trombina), ativadora de protrombina e do fator X, promovendo consumo dos fatores de coagulação com conseqüente alteração da coagulação sanguínea; 3) *hemorrágica*, que atua no endotélio vascular na região da picada e, provavelmente, também à distância. Outras atividades biológicas que podem participar da fisiopatologia do envenenamento são a fibrinogenolítica, fibrinolítica e agregadora de plaquetas (RIBEIRO, 1997).

A espécie *B. atrox* é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos na região da Amazônia Brasileira. Em humanos, o envenenamento por *B. atrox* causa efeitos locais como inchaço, hemorragia local e necrose além de efeitos sistêmicos, incluindo alterações na coagulação sanguínea e vários pontos hemorrágicos ao longo da mordida (GUÉRCIO et al., 2006).

Cerca de 90% do peso seco da peçonha é constituído por proteínas, compreendendo grande variedade de enzimas como fosfolipases A₂, proteases, L-aminoácido oxidase, hialuronidases, entre outras, toxinas não-enzimáticas e proteínas não-tóxicas (BIEBER, 1979). As frações não-protéicas são representadas por carboidratos, lipídeos, metais, aminas biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos livres, ânions e cátions (CARDOSO, 2003).

Várias substâncias presentes nas peçonhas já analisadas demonstraram efeitos biológicos diversificados. Algumas espécies do gênero *Bothrops* apresentam em sua peçonha, a atividade de Leucino-aminoácido oxidases (LAAOs) que são flavoenzimas, que catalisam a deaminação oxidativa estereoespecífica de um substrato L-aminoácido para um α -cetoácido com a produção de amônia e peróxido de hidrogênio (CURTI; RONCHI; SIMONETA et al., 1992; KOMMOJU et al., 2007).

1.3. L-AMINOÁCIDO OXIDASES

A L-aminoácido oxidase é uma oxidoreductase contendo FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo). Esta enzima catalisa a deaminação oxidativa dos substratos L-aminoácidos a α -ceto ácidos de forma estereoespecífica. O ciclo catalítico se inicia com a meia-reação redutora envolvendo a conversão do FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo) a FADH_2 e concomitante oxidação do aminácido a iminoácido. O iminoácido intermediário da via oxidativa sofre uma hidrólise não-enzimática para liberar o respectivo α -cetoácido e amônia. Uma meia-reação oxidativa completa o ciclo catalítico reoxidando FADH_2 com oxigênio molecular, produzindo peróxido de hidrogênio (CURTI; RONCHI; SIMONETA, 1992; AHN; LEE; KIM, 1997; ZHANG, et al., 2003; KOMMOJU et al., 2007; LI et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009) (Figura 1).

Figura 1. Desidrogenação de L-aminoácidos catalisada por LAAO. Os produtos desta reação, α -iminoácidos, hidrolisam espontaneamente para o α -cetoácido e amônia. A redução dos derivados equivalentes da desidrogenação é transferida para o cofator FAD, que é prontamente oxidado pelo dioxigênio para produzir peróxido de hidrogênio e reformar (oxidar) LAAO.

Proteínas do tipo L-aminoácido oxidase (LAAO) estão presentes em diferentes organismos como bactérias *Corynebacterium* (COUDERT, 1975), *Proteus* (DUERRE; CHAKRABARTY, 1975), cianobactéria (*Synococcus*) (PISTORIUS, 1980), fungos (*Neurospora crassa*) (NIEDERMANN; LERCH, 1990), algas verdes (*Chlamydomonas reinhardtii*) (VALLON et al., 1993), peixes (MURAKAWA et al., 2001), organismos marinhos (BUTZKE et al., 2005; YANG et al., 2005), caracóis (OBARA et al., 1992) e, de forma mais proeminente, em serpentes peçonhentas como crotalídeos, elapídeos e viperídeos (ZELLER, 1977).

1.4. Efeitos biológicos das L-aminoácido oxidases

Os efeitos biológicos desta enzima não foram totalmente elucidados, apesar da descrição de várias ações biológicas e farmacológicas, como indução de apoptose (SUHR; KIM, 1996; TORII et al., 1997; DU; CLEMETSON, 2002; ANDE et al., 2006; ANDE et al., 2008; ALVES et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009; MAO et al., 2010), citotoxicidade (AHN; LI; KIM, 1997; SOUZA et al., 1999; ALVES et al., 2008) agregação plaquetária (LI et al., 1994; LI et al., 2008), hemorragia (SOUZA et al., 1999), hemólise (ABE et al., 1998), atividades bactericida (STÁBELI et al., 2004; STÁBELI et al., 2007; KASAI et al., 2010; SUN et al., 2010; COSTA TORRES et al., 2010; LEE et al., 2010) e antiparasitárias (STÁBELI et al., 2007; COSTA TORRES et al., 2010). Os mecanismos pelos quais as LAAOs exercem suas atividades biológicas não estão totalmente relatados e esclarecidos. Acredita-se que os efeitos biológicos da LAAO devem-se, ao menos parcialmente, ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzido durante a reação enzimática, pois a catalase, *scavenger* de H_2O_2 (clivante de H_2O_2), inibe a ação da LAAO (DU; CLEMETSON, 2002).

Estudos com LAAO têm demonstrado suas propriedades bactericida e antiviral, inibindo o crescimento de procariotos gram-positivos e gram-negativos assim como do HIV (SKARNES, 1970; ZHANG et al., 2003, ZHANG et al., 2004; MOUSTAFA et al., 2006; KOMMOJU et al., 2007; SAMEL et al., 2008; ZHONG et al., 2009; KASAI et al., 2010; LEE et al., 2010). Os estudos de toxinas animais em relação às atividades antiparasitárias ainda são bastante limitados, no entanto, segundo Izidoro et al. (2006), BpirLAAO-I (L-aminoácido oxidase de *Bothrops pirajai*) mostrou atividade leishmanicida nas espécies: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani* e *L. major*. Da mesma forma, a LAAO de *B. moojeni* causou elevada mortalidade de formas promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania in vitro*

sugerindo uma promissora estratégia de terapia contra leishmanias e outras infecções parasitárias intracelulares (TEMPONE et al., 2001). Estudos atuais indicam a possibilidade das LAAOs inibirem o crescimento de formas promastigotas de *Leishmanias* (RODRIGUES et al., 2009; COSTA-TORRES et al., 2010).

Outros estudos relatam a indução de apoptose por LAAO de várias peçonhas de serpentes, incluindo víboras, em diferentes linhagens celulares como células embrionárias de rim humanas (293T) (TORII et al., 2000), células de leucemia humana promielocítica (HL-60) (TORII et al., 1997; SOUZA et al., 1999; ALVES et al., 2008), células de leucemia T humanas (MOLT-4) (SUHR; KIM, 1999), células mamárias humanas (SKBR3) (RODRIGUES et al., 2009), células de leucemia T aguda humana (JURKAT) (ALVES et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009), células vasculares endoteliais (VET) (ARAKI et al., 1993), células do câncer de colo retal (SW480) (MAO et al., 2010), células monocíticas humanas (MM6) com confirmação da apoptose pela fragmentação do DNA das células tratadas com LAAO (ALI et al., 2000).

Alguns estudos mostram a indução de apoptose por LAAO envolvida nas vias das caspases (ALVES et al., 2008), no entanto, muitos efeitos biológicos de LAAO são devidos ao efeito secundário de H_2O_2 que é produzido durante a reação enzimática. Durante o estresse oxidativo, H_2O_2 em níveis baixos tem uma função de ativação e transcrição de alguns genes que poderiam prevenir a morte celular. Entretanto, um aumento na concentração de H_2O_2 induz um atraso no crescimento e morte celular por apoptose (SOUZA et al., 1999, DU; CLEMETSON, 2002; ALVES et al., 2008; ZHANG; WU, 2008). Araki e colaboradores (1993) mostraram que substâncias citotóxicas em peçonhas de *Crotalus atrox*, *Trimeresurus flavoviridis*, *Gloydus halys blomhoffii*, *Vipera ammodytes* e *Bitis arietnas* causam apoptose em célula endotelial vascular de pulmão humano, mas não em ratos ou células de músculo liso de bovinos, ou fibroblastos embrionários de humanos (ARAKI et al., 1993).

A influência de agentes tóxicos pode ser estudada na análise do ciclo celular. Este se refere ao crescimento e à divisão da célula, de forma contínua e repetitiva. No ciclo celular, existem diversos pontos de checagem do material genético no momento da divisão celular, nos quais estão presentes várias proteínas de reparo de danos no DNA. A coordenação dos mecanismos de reparo do DNA e do ciclo celular é controlada por meio de diferentes vias, como a das quinases dependentes de

ciclina (CDKs). As células apresentando danos podem disparar os processos de reparo do DNA e apoptose, dependendo da intensidade deste dano. Esta rede de resposta ao DNA danificado é reconhecida por proteínas denominadas “checkpoints”.

Os “checkpoints” são mecanismos de sinalização que coordenam o reparo do DNA com o metabolismo cromossômico e transições no ciclo celular. As proteínas dos “checkpoints” são geralmente requeridas nas lesões de DNA por complexos de reparo que geram estruturas de DNA intermediárias que funcionam como sinais para ativar as respostas ao dano. Depois da ativação, os transdutores de “checkpoint” transmitem e amplificam o sinal para reduzir os aparatos de reparo do DNA e a maquinaria do ciclo celular. A transmissão do sinal ou ativação desses alvos é geralmente alcançada por eventos distintos de fosforilação que afetam o nível de transcrição ou a atividade de reparo dos genes. As transições do ciclo celular são moduladas influenciando a estabilidade ou atividade de outras proteínas que estão presentes na manutenção do “checkpoint” ou na progressão do ciclo celular (BRANZEI; FOIANI, 2008) (Figura 2).

Figura 2. “Checkpoints” no controle do ciclo celular. (Adaptado de Alberts et al., 2002).

As células na fase G1 do ciclo celular são responsáveis pelo reparo de danos acidentais, como os causados por espécies reativas de oxigênio endógenas ou por agentes químicos, raios ultravioletas ou radiação ionizante. Este dano deve ser reparado preferencialmente antes do início da replicação, quando as lesões primárias de DNA podem bloquear a replicação ou podem ser convertidas em outros tipos de danos no DNA, com consequências perigosas para a célula. Já durante a fase S, a síntese de DNA é frequentemente associada com falta da incorporação de um nucleotídeo, acúmulo de quebras e “gaps”, colapso de forquilhas em quebras de DNA e transições aberrantes em forquilhas colapsadas que causam reversão e/ou interrupções. Estas transições de replicação de forquilhas aberrantes podem danificar a estabilidade dos cromossomos se não são prontamente reparados (BRANZEI; FOIANI, 2008). Na fase G2 e M do ciclo celular, “gaps” e quebra na cadeia dupla que ocorrem durante a replicação, quando não reparadas no final da fase S, precisam ser reparadas antes da mitose (BRANZEI; FOIANI, 2008).

Atualmente existe um grande interesse no uso de compostos de origem animal ou vegetal que tenham ação em diferentes mecanismos como alteração no metabolismo carcinogênico, indução de sistemas de reparo ao DNA, ativação imune e supressão da indução ou progressão do ciclo celular de apoptose. Apoptose ou morte celular programada é um fenômeno de regulação gênica que é importante em condições fisiológicas e patológicas. Os mecanismos regulatórios importantes da apoptose incluem receptores de morte, caspases, mitocôndria e proteínas da família BCL-2 (ASHKENAZI; DIXIT, 1998; GREEN et al., 1998; SCORRANO et al., 2003).

O fenômeno de apoptose celular pode ser disparado por uma variedade de estímulos fisiológicos, patológicos ou citotóxicos. Quando iniciada, a apoptose, promove a ativação de eventos moleculares que culminam com a ativação de proteases, denominadas caspases (*cysteine aspartate-requiring proteinases*) (JIN; EL-DEIRY, 2005; SHI et al., 2002).

A família das caspases em mamíferos é composta por 14 proteínas, dentre as quais estão as caspases envolvidas no processo de apoptose, a saber, caspases iniciadoras (caspases -8 e -10), caspases ativadoras (caspases -9, -2) que ativam as caspases executoras (caspases -3, -6 e -7) responsáveis pelo desmantelamento celular (JIN; EL-DEIRY, 2005). Para que ocorra ativação dessas proteínas, são necessários estímulos que resultem em sua clivagem e dimerização,

desencadeando cascatas de eventos que contribuem para a indução de apoptose (JIN; EL-DEIRY, 2005; GASPAROTTO, 2009).

Em células de mamíferos, a apoptose ocorre principalmente por meio da ativação de duas vias de sinalização: a extrínseca, mediada pelos receptores de morte e a intrínseca, mitocondrial, que são desencadeadas, respectivamente, por estímulos provenientes dos meios extracelulares e intracelulares (JIN; EL-DEIRY, 2005; GASPAROTTO, 2009).

A via extrínseca é iniciada pela ativação dos receptores de morte FAS (FAS/CD95), TNF-R1 e R2 (*tumor necrosis death receptor*), TRAIL (TNF *related apoptosis-inducing ligand receptors*) R1 (DR4) e R2 (DR5), uma família de proteínas transmembrânicas, que apresentam um domínio extracelular rico em cisteína e um domínio intracelular denominado DD (*death domain*), responsável pela transdução do sinal apoptótico. A interação destes receptores com seus respectivos ligantes induzem trimerização dos receptores levando ao recrutamento de proteínas adaptadoras, como FAS associada com DD (FADD) e TNFR1 associada com DD (TRADD), e proteínas que interagem com receptor (RIP, *Receptor-Interacting Protein*), que se ligam aos receptores de DD. A proteína FADD contém um domínio efetor de morte (DED, *Death Effector Domain*) com homologia ao domínio DED da pró-caspase-8 ou -10, formando um complexo chamado DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*), que promove a auto-ativação da caspase-8 que, por sua vez, atua na ativação da caspase 3, 6, e 7, desencadeando eventos apoptóticos seguidos pela formação de corpos apoptóticos (morte celular) e fagocitose por macrófagos (JIN; EL-DEIRY, 2005; YAN; SHI, 2005).

A via intrínseca é desencadeada pela ação de diferentes sinais de estresse intracelular, como irradiações, agentes quimioterápicos, vírus, bactérias e ausência de fatores de crescimento celular, que convergem para a mitocôndria, induzindo a liberação para o citosol de citocromo c, AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*) e SMAC (*Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases*), Endonucleases, dentre outros. A liberação desses fatores resultam na ativação de APAF-1 (*Apoptosis Protease-Activator Factor 1*) que, na presença de ATP/dATP, induz a formação do complexo multimérico chamado “apoptosomo”. Este medeia a ativação da caspase iniciadora, caspase-9, que subsequentemente ativa as caspases executoras, caspases -3, -6 e -7, responsáveis pelo desmantelamento celular característico da apoptose (YAN; SHI, 2005).

As vias extrínseca e intrínseca convergem para a ativação da caspase 3, 6 e 7 e subsequentemente, de outras proteases e nucleases que comandam os eventos terminais da apoptose (JIN; EL-DEIRY, 2005).

A regulação deste processo é realizada por fatores inibidores e ativadores da cascata apoptótica, destacando-se os receptores de morte (*death receptors*) pertencentes à família do receptor de TNF, as proteínas pertencentes às famílias BCL-2, IAPs, FLIPs, caspases, fatores de supressão de tumores como p53 (NOXA e PUMA), ativação de genes responsáveis pelo atraso no ciclo celular, que são mediadas por p53 (p21 e CDK9), dentre outros (ESKES et al., 1998; ASHKENAZI; DIXIT, 1998; SCORRANO et al., 2003). O equilíbrio das interações entre as proteínas pró- e anti-apoptóticas definem a ocorrência de morte celular (JIN; EL-DEIRY, 2005; GASPAROTTO, 2009).

Os membros da família *BCL-2* dividem-se em três categorias: a) os capazes de integrar sinais de sobrevivência pelas moléculas anti-apoptóticas (*BCL-2*, *BCL-xl*, *BCL-w*, *MCL-1* e *A1*); b) os capazes de integrar sinais de morte celular, pelas moléculas pró-apoptóticas multidomínio BH (BAK, BAX, BCL-xs, BIK, BIMEL, BMF, BOK e BOO) que compartilham os domínios BH1, BH2 e BH3; c) moléculas pró-apoptóticas *BH3-only* (BAD, BID e BIM) que compartilham apenas o domínio BH3 (BORNBERG, 2003).

As proteínas anti-apoptóticas da família *BCL-2* ligam-se e estabilizam a membrana externa da mitocôndria impedindo a liberação do seu conteúdo, evitando assim os eventos desencadeadores do desmantelamento celular. As proteínas pró-apoptóticas BAX e BAK ativam-se quando interagem com a molécula BID truncada, liberadas pela clivagem da proteína BID pela caspase-8, inibindo as proteínas anti-apoptóticas. Esta ligação desestabiliza a membrana mitocondrial liberando fatores apoptogênicos como citocromo c, AIF, dentre outros que iniciam a morte celular programada.

A apoptose pode ser ainda resultante da ativação do gene supressor de tumor p53 na qual participam ativamente as moléculas reguladoras (JIN, EL-DEIRY, 2005).

A proteína Bax promove apoptose em diferentes proporções em variadas linhagens celulares como HL-60 (leucemia), PC12 (feocromocitoma de glândula adrenal de rato), B16F10 (melanoma murino), JURKAT (leucemia), dentre outras (ALVES et al., 2008).

Processos apoptóticos e danos celulares são os mecanismos propostos de ação de algumas toxinas e vários estudos demonstram potencial aplicação dessas substâncias como modelos para o desenvolvimento de quimioterápicos e agentes antitumorais. Assim, a identificação de marcadores de ativação de danos celulares ativados, em especial pela BatroxLAO, poderá fornecer subsídios importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas de ação mais direcionada, como quimioterápicos e antitumorais mais eficazes.

1.5. Estruturas tridimensionais de proteínas de serpentes

Os estudos de biologia estrutural são capazes de associar à relação estrutura e função de uma proteína, visto que a elucidação da estrutura permite prever funções importantes relacionadas à proteína estudada. São exemplos de métodos utilizados para a elucidação estrutural: a cristalografia com raios-X, espectrometria com ressonância nuclear magnética (RMN), bem outras técnicas biofísicas e bioquímicas. Os processos cristalográficos nos permitem uma melhor compreensão do mecanismo de ação das proteínas, pois os resultados visam à obtenção de dados sobre o sítio ativo da proteína e possíveis locais de ação, além de fornecer a relação dos aminoácidos responsáveis pela ação da mesma.

A elaboração da molécula de um dos medicamentos mais vendidos para controle da pressão arterial, o Captopril, é um exemplo clássico da aplicação da biologia estrutural. Este medicamento foi obtido a partir de um peptídeo isolado da peçonha da serpente *Bothrops jararaca* por Rocha e Silva e colaboradores (1949). Esse estudo demonstrou a eficiência do peptídeo em inibir a conversão de angiotensina (FERREIRA, 1992). Outro exemplo foi a descoberta da α -bungarotoxina, uma neurotoxina pós-sináptica da peçonha de *Bungarus multicinctus* que permite a identificação de receptores nicotínicos colinérgicos. Trata-se de um peptídeo que se liga de forma permanente aos receptores colinérgicos pós-sinápticos, o que impede a abertura dos canais iônicos da placa-motora pela acetilcolina, paralisando o alvo (ROY et al., 2010).

Estudos que empregam a biologia estrutural têm sido desenvolvidos na tentativa de se descobrir novas moléculas capazes de propiciar a elucidação de seus efeitos e de novas ferramentas terapêuticas. As metaloproteinases e fosfolipases de peçonhas de serpentes apresentam grande espaço na biologia estrutural. Sanchez et al. (2010) caracterizaram uma nova metaloproteinase

(atroxlisina I), da peçonha de *Bothrops atrox* (peruana), detalhando mecanisticamente, através da biologia estrutural, a atividade hemorrágica apresentada pela mesma. Já a estrutura cristalográfica de uma fosfolipase A2, de *Bothrops pirajai*, complexada com *p*-bromofenacil revelou importantes alterações estruturais associadas com a inibição da miotoxicidade apresentada pela proteína (MARCHI-SALVADOR et al., 2009). A estrutura cristalográfica da LAAO de *Vipera ammodytes ammodytes* foi determinada e refinada a 2,6 Å e os detalhes da transformação catalítica de substratos aminoácidos foram mencionados como a conservação do aminoácido Lys326, responsável pelo sítio catalítico desta proteína (GEORGIEVA et al., 2010).

Existem poucos relatos das L-aminoácido oxidases quanto a estudos relacionados à biologia estrutural. De forma geral, apenas a LAAO da peçonha de *Calosellasma rodhostoma* foi amplamente caracterizada e sua estrutura tridimensional determinada, bem como a LAAO de *Agkistrodon h. pallas* (PAWELEK et al., 2000; ZHANG et al., 2004; MOUSTAFA et al., 2006). Desta forma, observa-se que estudos de caracterização estrutural desta classe de enzimas são importantes para compreensão do seu mecanismo de ação e de sua aplicação biotecnológica na clínica farmacêutica (KOMMOJU, MACHEROUX, GHISLA, 2007; ZHANG et al., 2004; TEMPONE et al., 2001).

Neste sentido, é de fundamental importância o estudo estrutural da BatroxLAAO visando a obtenção de novos dados e perspectivas para o desenho racional de drogas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Determinar a estrutura tridimensional o potencial biotecnológico da L-aminoácido oxidase de *Bothrops atrox* (BatroxLAAO) e avaliar sua interação em processos biológicos *in vitro* e *in vivo*.

2.2. Específicos

O presente projeto tem por objetivos avaliar:

2.2.1. a estrutura tridimensional da BatroxLAAO por técnicas de difração de raios-X em monocristais afim de permitir a realização dos estudos de correlação entre estrutura e função;

2.2.2. o potencial biotecnológico da BatroxLAAO por meio das atividades leishmanicida, tripanomicida, bactericida e fungicida;

2.2.3. a reatividade do anticorpo anti-BatroxLAAO frente a outras L-aminoácidos provenientes de outras peçonhas de serpentes;

2.2.4. a citotoxicidade, apoptose e necrose da BatroxLAAO, *in vitro*, por MTT e citometria de fluxo, nas linhagens JURKAT, B16F10, PC12, HL-60 e células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis;

2.2.5. o efeito da da BatroxLAAO no ciclo celular em células tumorais humanas HL-60;

2.2.6. as ações da BatroxLAAO *in vivo* em camundongos Balb/C inoculados com a linhagem tumoral B16F10, PC12 e JURKAT verificando-se a expressão dos genes *bcl-2*, *bax*, *fas* por meio da metodologia de PCR em tempo real e confirmação da proteína BAX por Western Blotting.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Peçonha

A peçonha bruta de *B. atrox* foi adquirida do Serpentário SANMARU, Taquaral, SP e do Instituto Butantã de São Paulo, SP.

3.1.2. Proteína

BatroxLAAO isolada, purificada e caracterizada segundo Alves et al. (2008).

3.1.3. Linhagens Celulares

As linhagens celulares descritas abaixo e empregadas neste estudo foram obtidas da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC, “American Type Culture Collection”, Rockville, MD, USA).

- B16F10 de melanoma murino
- PC12 de glândula adrenal de ratos.
- HL-60 de leucemia promielocítica aguda
- JURKAT de leucemia T aguda humana.
- Células humanas (não tumorais): Foram utilizadas células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) de indivíduos saudáveis.
- Além disso, foram empregadas nessa investigação células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) de indivíduos saudáveis

3.1.4. Outras linhagens

- Cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) e *Escherichia coli* (ATCC 25922);
- *Cândida albicans* (ATCC24433).

3.1.5. Reagentes

- Catalase (from Bovine Liver – 1345-10g – Sigma)
- Sondas Applied Biosystems: BAX (Mm00432051_m1), BCL2 (Mm00477631_m1), FAS (Mm00433237_m1).

- Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems – 4305719)
- *High Capacity* (Invitrogen – 4368813)
- Trizol (Invitrogen – 15596026)
- Foram utilizados reagentes de grau analítico

3.1.6. Animais

O uso de animais, no atual trabalho, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em 10.09.2007, protocolo nº 07.1.473.53.5.

3.1.7. Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

O presente trabalho foi aprovado no CEP (Protocolo CEP/FCFRP nº100) em 04.07.2007 para fins de utilização de sangue periférico de indivíduos saudáveis.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Isolamento de L-aminoácido oxidase da peçonha de *Bothrops atrox*

A BatroxLAAO foi isolada através da metodologia implementada ao longo do desenvolvimento deste projeto e cujos resultados foram compilados e publicados na forma de um manuscrito (ALVES et al., 2008). O protocolo de purificação da BatroxLAAO consistiu inicialmente de filtração molecular em gel de Sephadex G-75 em AMBIC 0,05M, pH 8,0. Os picos que apresentaram atividade para L-aminoácido foram concentrados e submetidos à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com gradiente de concentração de AMBIC 0,05 – 0,5M, pH 8,0 em coluna de troca iônica, seguida de cromatografia de afinidade em Lentil Lectina, inicialmente equilibrada em tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,4, 0,5M de NaCl, seguida de um gradiente de glicose de 0,1 – 0,5M. A pureza da proteína foi confirmada em eletroforese SDS-PAGE segundo Laemmli (1970) em gel de poliacrilamida 12%, corado com Comassie Brilliant Blue e descorado com Ácido Acético Glacial 7%.

3.2.2. Caracterização Bioquímica

3.2.2.1. Cristalização

3.2.2.1.1. Cristalização da BatroxLAAO

Existem várias técnicas utilizadas para a cristalização de proteínas como diálise, difusão líquido-líquido e difusão de vapor. Dois métodos mais comuns para cristalização utilizam a técnica por difusão de vapor. Estes são conhecidos como método da gota suspensa (“hanging drop”) e gota sentada (“sitting drop”) (MCPHERSON, 1982; 2003). Em ambos, uma gota contendo a solução de cristalização (tampão, precipitantes e aditivos, também chamada de líquido-mãe) é misturada à solução de proteína e equilibrada contra um reservatório (poço) contendo a mesma solução de cristalização (Figura 3). Este sistema é selado e o equilíbrio é alcançado por meio da difusão das espécies voláteis (água e solventes orgânicos) até que a pressão de vapor na gota se iguale àquela do reservatório (poço). A concentração dos precipitantes na gota aumenta, diminuindo assim a solubilidade da solução de proteína e permitindo, em condições específicas, a formação de cristais.

Os métodos de gota suspensa e sentada diferem somente na posição em que a gota é colocada no experimento em relação à solução do poço. A Figura 3 mostra uma representação esquemática de ambos os experimentos. A técnica de difusão de vapor em gota sentada foi escolhida para os ensaios de cristalização realizados neste estudo.

Figura 3. (A) Difusão de vapor em gota suspensa ("hanging drop"). (B) Difusão de vapor em gota sentada ("sitting drop"). A solução está representada em azul e a gota em amarelo (Adaptado de PINHEIRO, 2007).

Os experimentos de cristalização foram realizados no laboratório de Cristalografia e propriedades estruturais de macromoléculas sob supervisão da Profa. Dra. Maria Cristina Nonato. A proteína foi inicialmente dialisada e concentrada a 6 mg/mL. Foram testadas inicialmente 98 condições disponíveis nos kits de cristalização Crystal ScreenTM. As composições destas soluções utilizam o método de matriz esparsa e são baseadas em soluções de cristalização conhecidas para macromoléculas biológicas. Neste experimento foram testados um grande intervalo de pHs, sais, precipitantes e aditivos (JANCARIK; KIM, 1991).

Nos primeiros experimentos de cristalização utilizando o método de difusão de vapor em gota sentada utilizou-se 500 µL das soluções de cristalização no reservatório. As gotas consistiam de 2 µL da solução do reservatório e 2 µL de proteína (6 mg/mL) (volume total da gota igual a 4 µL). Uma análise criteriosa com relação à característica das gotas indicou a formação de precipitados que sugeriam

cristalinidade na condição 27 do Crystal Screen 2TM (0,01 M de sulfato heptahidratado de zinco, 0,1 M de tampão MES monohidratado pH 6,5, 25% (v/v) polietilenoglicol monometil éter 550 (PEG 550) para o ensaio realizado a 22°C, após 30 dias de observação.

Baseado nesta informação prévia, foi realizado um “screening” (varredura) em torno das condições iniciais de cristalização, variando-se a concentração de sulfato de zinco (0 a 20 mM), polietilenoglicol (1 a 35% v/v), diferentes tampões de forma a permitir uma varredura em diferentes pHs (4,5 a 8,5) e concentração da proteína (6 a 8 mg/mL). Foram testadas aproximadamente 50 condições de cristalização.

3.2.2.1.2. Cristalização de BatroxLAO na presença de óleo

A metodologia da técnica utilizando óleo consiste em aplicar uma camada deste sobre a solução do poço (Figura 4) (PINHEIRO, 2007). O óleo age como uma barreira para a difusão de vapor entre o reservatório e a gota. Utilizando, por exemplo, 100% de óleo de parafina, a difusão a vapor é praticamente impedida, enquanto que utilizando 100% de óleo de silicone, os resultados são semelhantes aos resultados de quando nenhum óleo é utilizado. Quando é utilizada a mistura dos dois óleos (1:1), a taxa de difusão de vapor entre a gota e o reservatório, pode ser controlada (CHAYEN, 1997). A taxa de difusão de vapor também depende da espessura da camada de óleo utilizada (PINHEIRO, 2007).

Uma abordagem utilizada na tentativa de aumentar a ordem cristalina foi a de aumentar o tempo necessário para o aparecimento dos cristais por meio da diminuição da taxa de difusão a vapor. Além da realização de ensaios de cristalização realizados a 4 e 22°C, utilizamos também a técnica de cristalização na presença de óleo.

Após serem completadas as soluções do reservatório e da gota, foram adicionados 100 µL de óleo (1:1), que consistiam em: Silicone (200 Fluido 100 CS/ Polidimetil Siloxano – Dow Corning) e Parafina (gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho, área de concentração Medicamentos e Cosméticos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – FCFRP-USP). As condições de silicone e parafina foram testadas nas proporções: 0:100; 5:95; 10:90; 15:85; 20:80; 25:75; 30:70; 35:65; 40:60; 45:55; 50:50; 55:45; 60:40; 65:35; 70:30; 75:25; 80:20; 85:15; 90:10; 95:5; 100:0, respectivamente.

Figura 4. Esquema do método de difusão de vapor em gota sentada utilizando óleo.

3.2.2.1.3. Semeadura – “Macroseeding”

A técnica de semeadura (“seeding”) consiste na utilização de cristais de proteína (micro cristais ou macro cristais) como sementes para a obtenção de cristais maiores e melhor organizados. Nesta técnica, uma semente é utilizada como modelo para o agrupamento de moléculas na forma cristalina. No caso específico de macrosemeadura, a semente utilizada é um cristal, obtido previamente, que é adicionado diretamente na gota de cristalização, normalmente sob condições de mais baixa supersaturação que a necessária, para que ocorra nucleação espontânea.

Desta forma, visando o aumento do tamanho dos cristais de BatroxLAAO, foram realizados experimentos de macrosemeadura, nos quais os “clusters” obtidos nas condições originais de cristalização, acrescidas das condições de óleo, foram transferidos para uma nova gota previamente equilibrada contra a solução do poço, juntamente com diferentes concentrações de óleo (parafina e silicone) e, em seguida, o poço foi selado para o melhor desenvolvimento dos cristais.

3.2.2.1.4. Coleta e Processamento de Dados

Os experimentos de difração de raios-X foram realizados em fonte de radiação síncrotron da linha de cristalografia de proteínas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Mx2. As coletas foram realizadas com comprimento de onda, λ , igual a 1.427Å e os dados registrados em um detector CCD (MarResearch). Os dados foram processados usando MOSFLM (LESLIE, 2006) e dimensionados com SCALA (EVANS, 2006).

Os experimentos de difração de raios-X são realizados em temperatura criogênica (100 K). Foram realizados experimentos de difração com cristais congelados em nitrogênio líquido logo após aproximadamente 15 dias do crescimento do cristal. Durante as coletas de dados foi utilizado agente crioprotetor composto por 0,1 M de cacodilato de sódio, pH 5,0; 17% (v/v) de polietilenoglicol monometil éter 550; 20% de glicerol e 0,04 M de sulfato heptahidratado de zinco.

3.2.2.1.5 Determinação da estrutura e refinamento

Fases iniciais da determinação da estrutura foram obtidas por substituição molecular (MCCOY et al., 2007). Funções de rotação e translação iniciais foram calculados utilizando as coordenadas de uma LAAO de *Agkistrodon halys pallas* (PDB code 1REO (ZHANG et al, 2004)) como modelo de pesquisa. O modelo foi inicialmente refinado por refinamento de corpo rígido, seguido de anelamentos simulados e refinamento individual do factor-B utilizando o programa cristalográfico PHENIX (ADAMS et al., 2010), que resultou no Rfactor = 24,8% e Rfree = 29,9%. O refinamento estrutural ainda está em andamento.

3.2.3. Caracterização funcional

3.2.3.1. Detecção da Atividade Leishmanicida

3.2.3.1.1. Linhagem de *Leishmania* em condições de cultura

A atividade leishmanicida foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, no laboratório de Parasitologia na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

As espécies de *Leishmania* utilizadas neste estudo foram *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904), *L. major* (LV-39, clone 5-Rho-SU/59/P) e *L. donovani* (clone LV9-3 de MHOM/ET /67/HU3). Formas promastigotas de todas as espécies de *Leishmania* foram cultivadas em meio M199 (Gibco) suplementado com Hepes (LGCBio) 40 mM (pH 7.4), adenina 0,1 mM, haemina 7,7 mM, 10% (v/v) soro fetal bovino inativado, penicilina 50U/mL e estreptomicina 50 µg/mL. As culturas foram incubadas a 26°C e as células foram utilizadas nas concentrações entre 5×10^5 e 3×10^7 parasitas/mL (KAPLER et al., 1990). A viabilidade foi evoluída e avaliada pela motilidade e a densidade celular foi determinada utilizando um hemocítômetro.

3.2.3.1.2. Efeito citotóxico da BatroxLAAO sobre *Leishmania*

O efeito citotóxico direto da BatroxLAAO sobre as espécies de *Leishmania* foi medido da seguinte forma: parasitas ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram incubados em meio M199 suplementado com 10% de soro bovino fetal na presença ou ausência de BatroxLAAO ($0,2 - 5 \mu\text{g/mL}$) por 4h. Formas promastigotas de todas as espécies de *Leishmania* utilizadas foram incubadas com BatroxLAAO e catalase ($0,5 \text{ mg/mL}$) por 12h a 25°C em uma microplaca de 96 poços, no intuito de inibir a ação de H_2O_2 . Grupos controle sem BatroxLAAO, com ou sem catalase e com ou sem peróxido de hidrogênio 6 mM (SIGMA) também foram testados. Promastigotas foram incubadas com BatroxLAAO em solução salina balanceada sem aminoácidos, para supressão de substrato. A Concentração Efetiva 50% (CE_{50}) foi obtida para concentrações da enzima BatroxLAAO ($0,2 - 5 \mu\text{g/mL}$). A CE_{50} foi calculada e plotada em um gráfico dose-resposta utilizando o software GraphPad Prism.

3.2.3.2. Atividade Tripanomicida

A atividade tripanomicida foi realizada em colaboração com o professor Dr. Sérgio de Albuquerque, no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Para esse ensaio foram necessários o preparo de duas soluções mãe (1 e 2), onde na solução 1 foi determinada a massa da substância a ser testada por meio da seguinte fórmula:

$$m = \text{P.M.} \times 2,0 \times 0,001$$

onde:

m= massa da substância a ser testada (em mg);

P.M.= peso molecular da substância;

2,0= concentração molar inicial da solução a ser preparada (2,0 mM);

0,001= volume da solução a ser preparada (em litros – 1,0 mL);

A massa obtida foi dissolvida em 1,0 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO). Para o preparo das soluções testes foram utilizados microtubos estéreis onde foram colocados 800 μL de meio de cultivo em cada um, contendo a concentração de 1×10^6 parasitas/células por mL. As concentrações utilizadas foram de 0,5; 2; 8 e 32 μM . Para a concentração de 32 μM foram adicionados 12,8 μL da solução mãe 1 e adicionados a um dos microtubos. Em seguida, após agitação, foram distribuídos 200 μL da suspensão em cada poço da placa. Para a concentração de 8 μM foram

pipetados 3,18 µL da solução mãe 1 e da mesma forma adicionados ao microtubo juntamente com 9,62 µL de DMSO. Após agitação foram distribuídos 200 µL da suspensão em cada poço da placa. Para as soluções de 2 e 0,5 µM foi preparada uma diluição prévia da solução mãe, denominada solução mãe 2:

Em um tubo de 1,5 mL estéril foram pipetados 150 µL da solução mãe 1 e acrescentados 250 µL de DMSO. Agitou-se bem e foram realizados procedimentos para preparação das soluções testes. Para a solução teste de 2,0 µM foram pipetados 12,8 µL da solução mãe 2 e adicionados a um microtubo e, após agitação, foram distribuídos 200 µL da suspensão em cada poço da placa. Para o preparo da solução teste de 0,5 µM foram pipetados 3,18 µL da solução mãe 2 e adicionados em um microtubo. Em seguida, foram adicionados 9,62 µL de DMSO, agitados e 200 µL dessa suspensão foram distribuídos em cada poço da placa.

Para a realização do ensaio axênico as amostras foram incubadas à temperatura de 35,5°C por um período de 24 horas. Após o término desse período foi realizado o procedimento de coloração por MTT. Os ensaios foram todos realizados em triplicata. O controle negativo foi realizado com a adição de 10 µL do solvente utilizado para a solubilização da substância e 630 µL de meio infectado com o parasito. O controle positivo foi preparado da mesma maneira que as substâncias.

3.2.3.2.1. Técnica de coloração pelo MTT – 3, (-4,5 – dimetiltiazol – 2 il) - 2,5 - difenil tetrazolium brometo

Inicialmente o MTT foi dissolvido em PBS na concentração de 5 mg / mL e filtrado em filtro estéril. No momento do uso, foram adicionados 10 µL em cada poço de análise e, após agitação, foram retirados 100 µL do material em análise. As placas foram incubadas a uma temperatura de 37°C, por 4 horas. Após esse período, foi adicionado isopropanol ácido (100 µL de HCl 0,04 N em isopropanol) em cada poço para dissolução dos cristais e posterior leitura em espectrofotômetro a 570 nm. Os resultados foram obtidos por meio da aplicação de uma fórmula para o cálculo de porcentagem de lise:

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

A_c = Média dos valores de absorbância obtidos para o controle negativo;

A_a = valores individuais de absorbância obtidos das amostras.

3.2.3.3. Atividade Bactericida

A atividade bactericida foi realizada no laboratório de Biotecnologia Farmacêutica, sob supervisão da Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

3.2.3.3.1. Manutenção de Cepas de Bactérias

As cepas de bactérias, mantidas em estoque por congelamento a -70°C em glicerol 70% / LB (Amp+), foram cultivadas e mantidas em meio de Müller-Hinton (BIOBRAS) a 37°C durante 24 horas e, quando necessário, incubadas em meio líquido de BHI a 37°C durante 24 horas.

3.2.3.3.2. Atividade Bactericida de BatroxLAAO

As bactérias foram separadamente diluídas em tubos a partir de $1000\mu\text{L}$ de uma suspensão de bactérias na escala de 0,5 Mc Farland, correspondendo a 4×10^6 Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)/mL, como previamente descrito (Páramo et al., 1998). Cerca de $100\mu\text{L}$, contendo 4×10^5 UFC, foram incubadas por vários tempos (0,5; 1,0 e 24 horas) a 37°C em diferentes concentrações de LAAO dissolvidas em PBS (Phosphate Buffer Saline – 3,2 mM Na_2HPO_4 ; 0,5 mM KH_2PO_4 ; 1,3 mM KCl; 135 mM NaCl) pH 7,4 contendo peptona a 1%. A enzima BatroxLAAO foi avaliada nas concentrações de 24 e 48 μg , sendo que os testes foram realizados em triplicata. As amostras contendo as soluções com o inóculo de bactéria e as diferentes concentrações da enzima foram incubadas pelo período de 30, 60 minutos e 24 horas, sendo então recolhidos $10\mu\text{L}$ que foram estriadas em placa contendo o meio Müller-Hinton para determinação da concentração bactericida mínima (CBM) cuja leitura e contagem de colônias foi feita após 24 horas de incubação a 37°C . Foram utilizados controles de crescimento bacteriano, do meio e das amostras para a não interferência de possíveis microorganismos contaminantes.

3.2.3.4. Atividade Fungicida

A atividade fungicida foi realizada no laboratório de Microbiologia com ênfase a leveduras de interesse clínico, fatores de virulência e sensibilidade a antifúngicos, sob supervisão da Profa. Dra. Regina Célia Cândido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP.

3.2.3.4.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra *C. albicans* foi realizada utilizando diluição em microplaca, com modificações, segundo a Norma M27-A2 de 2002 (NCCLS, 2002 – National Committee for Clinical Laboratory Standards - Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts). O inóculo foi obtido segundo a turvação na escala 0,5 de Mc Farland em salina. Foi utilizado meio RPMI-1640 com glutamina (20 mM de L-glutamina) e ausente de bicarbonato de sódio pH 7,0 (GIBCO). Às placas de microtitulação foram adicionados o meio RPMI e o inóculo da levedura a ser testada, em seguida foi adicionada a proteína BatroxLAAO submetida a uma diluição seriada e foram levadas à incubação a 37°C durante 24 e 48 horas. A determinação da CIM foi realizada através da leitura visual da inibição do crescimento das leveduras em cada poço da placa de microtitulação, após o período de 24 e 48 horas de incubação conforme preconizado pelo NCCLS-M27A2 (NCCLS, 2002). A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada por subcultura de cada microplaca, utilizando meio ágar-Sabouraud e incubando as placas por 24 – 48 h a 37 °C. A concentração fungicida mínima foi então observada pela ausência ou presença de crescimento da levedura.

3.2.3.5. Produção de Anticorpos

3.2.3.5.1. Imunização de animais para obtenção de anticorpos anti-LAAO

Dez camundongos C75/BL6, machos, pesando entre 18 a 20 g, foram submetidos a 4 procedimentos de imunização com 100 µg da enzima L-aminoácido oxidase purificada por animal. Inicialmente, as preparações de LAAO foram diluídas em PBS estéril e emulsificadas com adjuvante completo de *Freund* – ACF (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA) e, em seguida injetadas por via intraperitoneal. O volume final por animal partiu de 150 µL de ACF com 150 µL de PBS estéril contendo 100 µg de proteína. Após quinze dias, foi realizada uma segunda imunização com 100 µg da LAAO emulsificada com adjuvante incompleto de *Freund* (AIF), por via intraperitoneal. Em cada etapa, antes de cada imunização, o sangue total foi colhido por punção intraorbital, para obtenção de soro pré-imune (anterior à primeira imunização) e soros imunes, a fim de testar a eficiência da imunização por

ELISA. Posteriormente, foram realizadas outras duas imunizações intraperitonealmente a cada 15 dias.

Passados 7 dias após a última imunização, os camundongos foram anestesiados (**ketamina** 0,1 mg/mL + **xilazina** 20 mg/mL – na proporção de 10:1) para coleta total de sangue por punção cardíaca. O soro foi separado do coágulo por centrifugação a 1500 x g, por 10 minutos, aliquoteado e armazenado a –20°C para posterior análise.

Após a constatação da eficiência dos procedimentos de hiperimunização um animal foi sacrificado e seu baço removido para que as células desse órgão fossem utilizadas na produção de hibridomas secretores de imunoglobulinas específicas para a LAAO, conforme o item descrito abaixo.

3.2.3.5.2. Fusão celular

As células do baço do animal utilizado na produção de anticorpo policlonal anti-LAAO, foram coletadas sob condições assépticas, lavadas e ressuspendidas em meio RPMI 1640 incompleto (Gibco). Em seguida, o número de células viáveis foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer na presença do corante vital azul de Tripan 0,1%. As células de mieloma utilizadas na fusão foram da linhagem SP2/0 (gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi, laboratório de Glicoimunologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP), as quais foram descongeladas e mantidas em cultura em 5% de CO₂ e 37°C por duas semanas em meio RPMI completo (Gibco) (suplementado com HEPES (25mmol/L - Sigma), Bicarbonato de Sódio (24mmol/L – Sigma), L-glutamina (2mmol/l - Invitrogen), antibiótico, antimicótico (1% - Sigma) e 20% de soro bovino fetal - FBS (Invitrogen - inativado por 30 minutos a 56 °C) e submetidas a repiques a cada três dias.

A fusão celular foi baseada em metodologias descritas por Kohler e Milstein (1975), Harlow e Lane (1988) e Dunbar e Skinner (1990). Esplenócitos e células de mieloma foram misturadas na proporção de 4:1, respectivamente. A mistura celular foi lavada uma vez em meio RPMI-1640, o sobrenadante desprezado e ao sedimento celular foi adicionado 1 mL de polietilenoglicol (PEG, massa molecular aproximada de 1,5 kDa - Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) diluído em RPMI incompleto (Gibco Laboratories, Grand Island, New York, USA) para possibilitar a fusão celular (Figura 5).

Figura 5. Procedimento para a produção de anticorpos monoclonais. (http://pwp.netcabo.pt/sistema.imune/Biotecnologia_no_diagnostico_terapeutica.htm - Adaptado).

Após a fusão celular entre o mieloma e os esplenócitos com a ajuda do polietilenoglicol (PEG), iniciou-se a etapa de seleção capaz de separar as células fusionadas híbridas das células não fusionadas, separando os hibridomas dos mielomas e dos linfócitos B, as células de mieloma frequentemente dividem-se mais rapidamente que células do hibridoma que logo seriam excluídas do meio de cultura por competição. Para a produção de anticorpos monoclonais partimos do princípio que existem duas vias para síntese de purinas, uma clássica e uma alternativa biossintética. A aminopterina bloqueia a via clássica e a via alternativa ocorre por catálise da hipoxantina pela enzima HPRT. Os mielomas não expressam a enzima hipoxantina fosforribosil transferase (HPRT), que catalisa esta via biossintética alternativa de síntese de purina, necessária para replicação de DNA.

De acordo com este fato, cultivou-se a mistura de fusão em um meio contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (HAT). A aminopterina bloqueia a principal via de síntese de purinas e pirimidinas, restando a via alternativa que vai utilizar a hipoxantina do meio HAT como substrato para replicação, assim células de mieloma, que não expressam a enzima HPRT, em um meio HAT, não podem se multiplicar. As células do hibridoma se dividem normalmente, uma vez que apresentam atividade da HPRT herdada do linfócito B esplênico parental, podendo

assim, usar a hipoxantina como substrato para síntese de DNA. Os linfócitos B não crescem em cultura por mais de alguns dias e somente as células de hibridoma persistem quando cultivadas continuamente em um meio de seleção HAT.

Após 15 dias de cultivo com meio HAT e mais 15 dias de cultivo com meio HT (sem a aminopterina, pois neste período todos os mielomas já estavam mortos e forneceram substrato para replicação pela via alternativa), os hibridomas foram selecionados para identificação e isolamento de clones que secretam anticorpos que interagem com o antígeno desejado. Isto foi feito a partir de uma diluição seriada, obtendo-se então os clones que secretam determinado anticorpo monoclonal por técnicas imunoquímicas. Após a fusão, de um total de $10,7 \times 10^7$ células por mL, foram colocadas 1×10^5 células por poço em placa de 96 poços contendo meio de cultura seletivo (HAT), obtendo um total de 10 placas. Os poços com crescimento celular, tiveram seu sobrenadante retirado para determinação por ELISA da presença de anticorpos anti – LAAO e os poços com positividade de seleção foram submetidos a diluição seriada em placa de 96 poços, com a intenção de obter no final da placa um único clone de hibridoma anti-LAAO.

3.2.3.5.3. Detecção de anticorpos anti-LAAO em soros de camundongos imunizados com BatroxLAAO por ELISA

Placas de microtitulação, com 96 poços de polipropileno (Corning Incorporated, COSTAR® - 3590 - USA), foram sensibilizadas com LAAO, 1 µg por poço em 50 µL de PBS em cada poço, permanecendo por 30 minutos 37°C e, em seguida, overnight a 4°C. Seqüencialmente, os poços foram lavados com PBS Tween 20 (0,05%) 3 vezes por 10 minutos cada, para retirada do excesso de proteína. Posteriormente a placa foi incubada com PBS/Gelatina 3% por 2h em repouso a 37°C para bloqueio total da placa (nos lugares onde a proteína não aderiu, para evitar aderência dos anticorpos adicionados nas próximas etapas). Foram, então, repetidas as etapas de lavagem conforme mencionado anteriormente. Os poços experimentais foram incubados por 1 hora a 37°C com 50 µL de soro sanguíneo de cada animal, em duplicata e, como calibração, foi utilizada uma curva com concentração decrescente de BatroxLAAO partindo de 5 µg para determinar sensibilidade de detecção da proteína.

Foi utilizado como anticorpo secundário, anticorpo de coelho, anti IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina diluído em PBS BSA 1% e incubado

por 1 hora. A solução reveladora para fosfatase alcalina foi o pNPP (p-Nitrofenil Fosfato, Sigma Diagnostic INC, Sta Louis, MO, USA). Foram feitas leituras em 405 nm em espectrofotômetro (Spectramax Plus – Molecular Devices) após 10 minutos.

3.2.3.5.4. Detecção de anticorpos policlonais anti-LAAO em soros de camundongos imunizados com as respectivas proteínas por *Western Blotting*

Cerca de 5 µg da BatroxLAAO foram submetidos à SDS-PAGE, em condições redutoras. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida em concentração de 12% usando tampões convencionais contendo Tris-Glicina 0,1% de SDS (Sigma Chemical Co, USA). As proteínas foram, então, eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (0,22 µm; Hybond – Amersham Biosciences, Alemanha) por 1,5 h a 150 V constantes em tampão Tris-Glicina 10% metanol e bloqueadas com PBS contendo 5% de leite bovino desnatado, de 12 a 14 horas.

Sequencialmente, as membranas foram incubadas com o *pool* do soro total dos camundongos contendo anticorpos policlonais (previamente detectados por ELISA) anti-BatroxLAAO, em PBS BSA 1% Tween 20 (0,05%), por 1 hora à temperatura ambiente, como controle de reação inespecífica devido à presença de outros anticorpos contidos no soro, foi realizado teste com o *pool* de soro pré-imune. Em seguida, as membranas foram submetidas a três lavagens com PBS Tween 20 (0,05%) de 10 minutos cada, sob agitação constante. Após as etapas de lavagem, as membranas foram incubadas por uma hora, com 40 ng/mL de IgG de coelho, anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, HRPO Horseradish Peroxidase Conjugated (Jackson ImmunoResearch). Três etapas de lavagens foram repetidas conforme o procedimento anterior. A imunorreatividade foi detectada usando o kit ECL Western Blotting (Amersham Biosciences, Alemanha), filme fotográfico (Hyperfilm™ ECL™ – Amersham Biosciences, Alemanha) e kit CN/DAB Substrate (Pierce).

3.2.3.6. Atividade Anti-tumoral

3.2.3.6.1. Manutenção da linhagem celular

As linhagens celulares foram estocadas em nitrogênio líquido (-195 °C) em alíquotas de 1×10^6 células/mL em uma solução de congelamento (10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) + 90% de soro bovino fetal). Para a realização dos

experimentos, as células HL-60, PC12, B16F10 e Jurkat foram descongeladas e cultivadas em monocamada, em frascos de 25 cm³ com 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementados com 10% de soro bovino fetal (HL-60 e Jurkat), RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e 10% de soro equino (PC12) e meio DMEM suplementado com 20% de soro bovino fetal (B16F10). As células foram incubadas em estufa incubadora umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C, até atingirem o estado de confluência (~ 5x10⁶ células) quando necessitaram de subcultivo. As células mononucleares dos linfócitos do sangue periférico humano foram separadas por gradiente de Ficoll-*Histopaque* (Sigma, St. Louis, MO) seguindo o protocolo do fabricante. Após este procedimento, foram cultivadas em meio de cultura RPMI contendo 20% de soro bovino fetal e 2% de fitohemaglutinina por 24 horas.

3.2.3.6.2. Tratamento das células com a BatroxLAAO

A proteína foi diluída nas concentrações 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL a fim de se estabelecer a curva de DL₅₀ (Dose Letal Média) nas culturas das linhagens JURKAT, B16F10, PC12 e PBMC. Para a linhagem HL-60 a proteína foi utilizada na concentração de 50 µg/mL. As amostras foram diluídas em PBS estéril, filtradas em filtro de 0,22 µm e colocadas em cultura e assim permanecendo por 24 horas até análise.

3.2.3.6.3. Análise do efeito antitumoral induzido por catalase

Para o ensaio da atividade citotóxica, as linhagens tumorais JURKAT, B16F10 e PC12 foram removidas dos frascos de cultura celular em meio RPMI ou DMEM. As células foram transferidas para tubos plásticos de 50 mL, lavadas três vezes em meio completo, centrifugadas a 4800 x g/10 minutos, contadas em Câmara de Neubauer sob microscopia óptica 400X (Nikon Instruments Inc.) e ressuspensas para obtenção da concentração final de 1x10⁶ células / mL em meio RPMI ou DMEM completo. As células foram então plaqueadas em placas de 96 poços nas concentrações apropriadas (1x10⁵ células/poço) e mantidas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar por 24 horas. Após este período, as células tumorais e normais (PBMC) foram incubadas na presença de concentrações diferentes de BatroxLAAO por 24 e, como experimento paralelo, após a incubação com BatroxLAAO, foi adicionado ao meio a catalase (150 U/mL).

Para avaliar a atividade citotóxica da LAAO, foi utilizado o método colorimétrico de citotoxicidade (MOSMANN, 1983). Este método consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Em células vivas, as desidrogenases mitocondriais são capazes de agir sobre substratos como o 3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT) levando a redução desta molécula formando assim o Azul de Formazan. O Azul de Formazan foi então solubilizado com dodecilsulfato de sódio em meio ácido. A leitura foi medida através do espectrofotômetro em 540nm.

Deste modo, após a incubação de 24h das linhagens tumorais com as diferentes concentrações de LAAO e catalase, foram adicionados aos poços de cultivo celular, 10µL de MTT na concentração de 5mg/mL. A placa foi então incubada por mais 3 horas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂ à 37°C. Após este período, foram acrescentados 100µL de solução a 10% de dodecil sulfato de sódio/HCL 0,01N, para dissolver os sais de formazan. As placas de cultivo celular foram mantidas por uma noite à 37°C. A avaliação de sais de formazan nas amostras foi feita em espectrofotômetro a 540nm. Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata para cada concentração. A citotoxicidade sobre a linhagem tumoral foi calculada conforme a seguinte fórmula:

$$(A) \% \text{ de Crescimento} = \frac{[(D.O \text{ Tumor} + \text{subst teste}) - (D.O \text{ Basal MTT/SDS})] \times 100}{[(D.O \text{ Tumor} + \text{meio de cultura}) - D.O \text{ Basal MTT/SDS}]}$$

$$\% \text{ citotoxicidade da substância teste} = 100 - \% \text{ de crescimento celular (A)}$$

3.2.3.6.4. Análise por citometria de fluxo

Aproximadamente 1x10⁶ células das linhagens testadas (JURKAT, B16F10, PC12 e PBMC) após tratamento com BatroxLAAO foram lavadas com PBS e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, sendo posteriormente ressuspensas em 800 µL de etanol 70%. Após este procedimento, o material foi centrifugado novamente a 1000 rpm por 5 minutos e ressuspendido em 700 µL de etanol 30% e mantido a 4 °C por 2 minutos. Novamente, o material foi centrifugado e as células foram ressuspensas em 700 µL da solução de PBS + BSA 0,05% (Albumina de soro bovino, Sigma) e mantida a 4 °C por 2 minutos e novamente centrifugado. Em seguida, o *pellet* foi ressuspendido em 500 µL da solução de coloração (50 µg/mL de

iodeto de propídeo (PI) e 40 µg/mL de RNase A diluídos em PBS + BSA 0,05%). O material foi transferido para tubo de citômetro e mantido em gelo até a leitura. Foram analisadas 10.000 células em citômetro FacScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) utilizando-se os *software* Cell Quest, para apoptose, da Verity Software House Inc., Sunnyvale, CA, USA.

3.2.3.6.5. Determinação do índice apoptótico com diferentes corantes

Uma quantidade de 2 µL da mistura de corantes, contendo iodeto de propídeo (5 µg/mL - Sigma Co. – 25mg - P4170), diacetato de fluoresceína (15 µg/mL - Sigma Co. 100mg - F7376) em DMSO e Hoescht 33342 (2 µg/mL - Sigma Co. 100mg - B2261) foram adicionadas a 1×10^6 células da linhagem HL-60, tratadas com BatroxLAAO em 100 µL de meio RPMI e, incubando-se à 37°C por 5 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para as culturas de células mononucleares. Gotejou-se cerca de 15 µL desta mistura em lâmina e cobriu-se com lamínula. As lâminas foram analisadas a fresco e imediatamente, utilizando-se microscópio de fluorescência com filtro triplo (DAPI, propídeo e FITC). Para a linhagem HL-60, foram realizados 3 experimentos independentes, sendo analisadas 500 células em cada experimento, já em PBMC, foram analisadas 200 células por experimento. O índice de células apoptóticas foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células apoptóticas} = \frac{\text{número de células em apoptose} \times 100}{\text{número de células contadas}}$$

3.2.3.6.6. Análise da cinética do ciclo celular

A cinética do ciclo celular foi avaliada após tratamento com BatroxLAAO na concentração de 5, 10, 25 e 50 µg/mL. Cerca de 5×10^5 células foram semeadas para estes experimentos e o tempo de coleta foi de 24 horas após o tratamento. As células foram processadas de acordo com o protocolo do fabricante (Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit, Becton Dickson, San Jose, CA). O material foi transferido para tubo de citômetro e mantido em gelo até a leitura. Foram analisadas 10.000 células em citômetro FACSCanto (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)

utilizando-se o *software* ModFit LT 2.0, 1995-6, da Verity Software House Inc., Sunnyvale, CA, USA.

3.2.3.7. Inoculação de Tumor

3.2.3.7.1. Cultura Celular

Linhagens tumorais B16F10, PC12 e JURKAT foram cultivadas em meio DMEM e RPMI 1640, respectivamente, suplementados com soro bovino fetal 10%, 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina G, e 100 µL/mL de estreptomicina. As células em crescimento subconfluentes foram tratadas com tripsina 0,5% em RPMI e ressuspensas na concentração de 5×10^6 células/mL em PBS. 200 µL da suspensão celular (4×10^6) foram inoculados por via intraperitoneal de camundongos (18 a 20 g) e os animais foram divididos em grupos de tratamento (Tabela1). Dezenove dias após a inoculação, os tumores formados nos camundongos foram retirados e o RNA total foi imediatamente preparado por RNazol B (Biotex Laboratory, Houston, TX).

A concentração de BatroxLAAO utilizada em cada animal foi de 100 µg. A aplicação da proteína foi realizada de duas formas: 1) simultaneamente à inoculação das células tumorais e 2) três dias após a inoculação das células tumorais. Os grupos que sofreram aplicações da proteína simultaneamente ou após 3 dias eram grupos distintos.

Tabela 1 - Grupos Experimentais de Animais Controles e tratados com BatroxLAAO

Grupos	Quantidade de animais*	Descrição dos tratamentos
1	5	Animais controle
2	5	Tratamento com BatroxLAAO**
3	5	Tratamento com células tumorais
4	5	Tratamento com células tumorais e BatroxLAAO** (simultaneamente à inoculação das células tumorais)
5	5	Tratamento com células tumorais e BatroxLAAO** (3 dias após inoculação das células tumorais)

*(Os experimentos foram realizados em triplicata/ **(A concentração de proteína utilizada foi de 100 µg/animal).

3.2.3.7.2. Extração de RNA, síntese de cDNA, PCR semiquantitativa e PCR em tempo real

Para a padronização da extração do RNA total, os tumores desenvolvidos das linhagens tumorais animais PC12, B16F10 e JURKAT e os órgãos como fígado e baço foram retirados, triturados e congelados em nitrogênio líquido e o RNA total foi obtido com o uso de uma mistura de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol, Invitrogen, Life Technologies) de acordo com protocolo do fabricante. Após incubação em gelo por aproximadamente 7 minutos, foi adicionado 200 µL de clorofórmio para ocorrer a separação dos ácidos nucleicos e proteínas do material de interesse (RNA). Após agitação e centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e a ela foi adicionado 500 µL de álcool isopropílico. O frasco foi incubado “overnight” para precipitação do RNA.

Após incubação e centrifugação, o precipitado foi lavado com etanol 75% e ressuspendido em 20 - 30µL de água livre de RNases (GIBCO, Life Technologies). A concentração e pureza do RNA total foram detectadas por meio da leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 260 e 280 nm e calculadas pelo software adequado. A qualidade, pureza e integridade do RNA foram também verificadas em gel de agarose 1% (Invitrogen).

Posteriormente, para obtenção do cDNA, 1 µg de RNA foi incubado com os reagentes do *kit High Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) contendo *random primers*, transcriptase reversa e deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP).

A mistura acima foi colocada a 25 °C por 10 minutos e na sequência incubada por mais 2 horas na temperatura de 37 °C para que ocorresse a polimerização das novas fitas de cDNA. Ao fim da reação as fitas foram desnaturadas por aquecimento a 70°C e o RNA restante degradado pela ação de RNase H.

Os cDNAs dos tumores e/ou órgãos obtidos dos animais com ou sem tratamento com a BatroxLAO utilizados nos ensaios de PCR em tempo real para quantificação da expressão do gene GAPDH no aparelho ABIPrism 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os programas utilizados no processo de amplificação das amostras estão descritos na Tabela 2. Foram empregados como controle da qualidade do cDNA e *housekeeping gene* dos cDNAs obtido o gene da GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), o qual é expresso constitutivamente nas células. Primeiramente para a PCR semiquantitativa as reações de PCR foram

feitas com 1 µL do cDNA. Quando estas reações eram positivas para as amostras não diluídas, o cDNA era diluído a partir de 1:2 (1:2, 1:4, 1:16, 1:32 e 1:64), ou seja, quando a amplificação ocorria até a última diluição, significava que o gene era hiperexpresso. Realizamos a quantificação da banda, utilizando o equipamento de fotodocumentação de géis em eletroforese, ImageQuant 300[®], onde a referência era fornecida ao equipamento no padrão de peso molecular e a banda era quantificada em relação a esse padrão.

Tabela 2 – Padronização do gene constitutivo para PCR semiquantitativa

Gene	Ciclo no aparelho
<i>Gapdh</i>	94°C-4 min/ 35x: 94°C 15 seg, 60°C 45 seg, 72°C 45 seg/72°C-6min/4°C [∞]

3.2.3.7.3. Detecção da proteína BAX por Western Blotting

Extrato de proteína extraída dos tumores dos camundongos, foi ressuspensa em 200µL (m(g)/v(L) 1:1) de tampão 100mM Tris-HCl, pH 6, contendo 5% de mercaptoetanol, 4% de SDS e 20% de glicerol e submetidas a corrida eletroforética e eletrotransferência para membranas de PVDF. As membranas foram bloqueadas em tampão de lavagem (PBS Tween20 0,05% (Acros, Bélgica) contendo 5% de leite desnatado, lavadas e subsequentemente incubadas com anticorpos para detecção da proteína BAX, diluídos em diferentes concentrações (conforme protocolo do fabricante) em tampão PBS com BSA (Albumina de soro bovino) 1% por um período de 18h a 4°C. Após três lavagens de 10 minutos, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase por uma hora a TA. A detecção da marcação foi realizada pelo método de quimioluminescência por meio do kit ECL Western Blotting (Amersham Biosciences, Alemanha), filme fotográfico (Hyperfilm[™] ECL[™] – Amersham Biosciences, Alemanha) e kit CN/DAB Substrate (Pierce).

3.3. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade. Para comparação entre vários tratamentos, nos casos de dados com distribuição normal foi empregado o teste paramétrico de análise de variância *one way* ANOVA com repetição, para testar a variância entre as médias. Para selecionar os grupos que apresentaram respostas diferentes, foi empregado o teste de comparação

multiparamétrica pelo teste de Student-Newman-Keuls. A probabilidade de erro para a conclusão dos testes foi $\leq 0,05$.

Para a análise estatística dos experimentos de expressão gênica foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Comparação Múltipla de Dunn.

As análises foram realizadas através do programa GraphPad Prism (versão 4.0 Prism, GraphPad, USA).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Cristalização

4.1.1. Cristalização de BatroxLAAO

Os ensaios iniciais de cristalização foram realizados com a proteína purificada utilizando as três etapas de purificação que consiste em cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75), cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade (Lentil Lectina) (ALVES et al., 2008). Embora nenhuma das condições testadas apresentou formação de cristal, as gotas foram inspecionadas e muito cuidadosamente foram visualizados agregados cristalinos que apresentavam-se sob a seguinte condição de cristalização: 0,01 M de sulfato heptahidratado de zinco, 0,1 M MES monohidratado pH 6,5 e 25% v/v de polietilenoglicol monometil éter 550 (Figura 6). Os ensaios iniciais foram realizados à 4 °C e 22 °C. Estes agregados cristalinos somente apareceram no ensaio realizado a 22°C.

Na tentativa de otimizar os experimentos de cristalização foi realizado um *screening* (varredura) completo, através da variação da concentração de sulfato de zinco, polietilenoglicol, diferentes tampões de forma a permitir uma varredura em diferentes pHs e a concentração da proteína.

A variação dos parâmetros testados nos permitiu estabelecer uma importante correlação entre as condições testadas e a formação dos cristais. Inicialmente, pudemos observar que a presença do sulfato de zinco é essencial para a formação dos cristais. Quando a proteína foi submetida à condição de cristalização sem zinco, os cristais formados apresentaram baixa qualidade e pequena dimensão (Figura 7) e a solubilidade da gota era favorecida em determinadas condições de baixa concentração de zinco, não ocorrendo a formação dos cristais. A concentração estimada de zinco foi de 0,05 M, uma vez que o aumento da concentração leva à maior quantidade de núcleos e precipitação.

Diferentes tampões foram testados e o pH ideal para o crescimento do cristal foi obtido com de 0,1 M cacodilato de sódio pH 5. A redução do pH não favorece a nucleação e o aumento do mesmo leva à precipitação, desnaturação da proteína e aparecimento de filamentos.

De todos os PEGs testados, as melhores concentrações foram estimadas em 12 - 15% (v/v) de PEG monometil éter 550 uma vez que a diminuição da

concentração de PEG leva ao aparecimento de poucos núcleos e o aumento da concentração de PEG favorece a supersaturação e o aparecimento de cristais denominados “vassouras” (Figura 8). A formação desses cristais denominados “vassouras” é comumente encontrada em amostras heterogêneas como, por exemplo, a presença de diferentes isoformas pode levar a uma alta taxa de nucleação. Devido à complexidade das peçonhas de serpentes, a presença de isoformas de proteínas como a L-aminoácido oxidase pode explicar a alta taxa de nucleação, o que poderia, em certos casos, inviabilizar a realização de experimentos de difração de raios-X.

Na tentativa de reduzir a nucleação testamos a hipótese da correlação da alta nucleação com a taxa de difusão. Para isto, além de realizarmos os experimentos à temperatura de 4°C sem sucesso, pois essa temperatura não permitiu a ocorrência de nucleação, também testamos a presença de uma camada de óleo a 22°C (50 µL de parafina e 50 µL de silicone - totalizando 100 µL/poço) para propiciar um crescimento mais lento e conseqüentemente mais organizado dos cristais de BatroxLAAO. Os melhores “clusters” formados foram observados após 4 (quatro) meses da realização dos experimentos e consistem da solução de cristalização composta de 12% (v/v) de polietilenoglicol monometil éter 550, 0,03 M de sulfato heptahidratado de zinco, controle de pH 5 com 0,1 M de cacodilato de sódio. A técnica de utilização de parafina e silicone resultou na melhora dos cristais, revelando a presença de “clusters” (monocristais sobrepostos) e de coloração amarela, característicos da cor da proteína (Figuras 9A e B). Os primeiros dados de difração foram originados a partir desses “clusters” após isolamento de um monocristal através de “microcirurgia” dos mesmos, que foi realizada pela professora Dra Maria Cristina Nonato (Tabela 3).

Com a tentativa de melhorar os monocristais obtidos e com o intuito de encontrar a solução adequada para a formação de cristais únicos de BatroxLAAO, sem sobreposição, foram variadas as concentrações de sulfato heptahidratado de zinco (0,01 a 0,06 M), polietilenoglicol monometil éter 550 (9, 12, 15 e 18%), 0,1 M de cacodilato de sódio, pH 5,0 e proteína BatroxLAAO na concentração de 6 mg/mL. Com essa variação foram realizados experimentos de macrosemeadura para a obtenção de cristais maiores e de melhor qualidade para a difração. Para tanto, cristais obtidos sob a condição 12% (v/v) de polietilenoglicol monometil éter 550, 0,03 M de sulfato heptahidratado de zinco, controle de pH 5 com 0,1 M de cacodilato

de sódio, e a concentração de proteína a 6 mg/mL (Figura 9B) foram submetidos a novas condições de concentração e pH (“macrosseding”). A solução de cristalização ideal para a formação de cristais de BatroxLAAO, após macrosemeadura, consistiu de 15% (v/v) de polietilenoglicol monometil éter 550, 0,05 M de sulfato heptahidratado de zinco, 0,1 M de cacodilato de sódio, pH 5,0 e a barreira de óleo (1:1) de silicone e parafina. O aparecimento desses cristais únicos foi observado após duas semanas após a realização do experimento e a máxima dimensão obtida foi de 0,4x0,1x0,1 mm após 23 dias (Figuras 10 A, B e C).

Figura 6. Formação de cristais de BatroxLAO. Cristais de pequena dimensão formados sob a condição de 0,01 M de sulfato heptahidratado de zinco, 0,1 M MES monohidratado pH 6,5 e 25% v/v de Polietilenoglicol monometil éter 550, na temperatura de 22°C. Condição 27 do “Crystal Screen 2, Hampton Research”.

Figura 7. Cristais da enzima BatroxLAO. Cristais obtidos na condição 0,1 M de acetato de sódio pH 5,5 e 25% (v/v) de polietilenoglicol monometil éter 550, na temperatura de 22°C.

Figura 8. Cristais de BatroxLAAO, em forma de “vassouras”, obtidos após altas concentrações de PEG MME 550.

Figura 9. Monocristais da enzima BatroxLAAO. (A) Cristais únicos de BatroxLAAO em forma de “clusters” (B) cristais únicos, sobrepostos de coloração amarela, característicos da proteína. Cristais formados sob a condição de 12% (v/v) de PEG MME 550, 0,03 M de sulfato heptahidratado de zinco, 0,1 M de cacodilato de sódio, pH 5 e concentração da proteína a 6 mg/mL.

Tabela 3. Coleta de Dados e processamento estatístico

Temperatura de coleta	100K
Comprimento de onda (Å)	1.45860
Grupo especial	P2 ₁
Parâmetros de rede	a = 59.6700 Å b = 121.7700 Å c = 66.7900 Å β = 109.3400°
Faixa de resolução (Å)	51.23 – 3. 2
Reflexões únicas	14912
Redundância ou multiplicidade (%)	3.8 (3.8)
Completeza dos dados (%)	99.9 (99.9)
Intensidade da reflexão [I/sigma (I)]	8.5 (2.4)
Erro de simetria (%) (^a R _{sym})	17.8 (62.1)
Moléculas por unidade assimétrica	2
Volume protéico [^b V _m (Å ³ /Da)]	2,04
Quantidade de solvente (%)	39,6
Tempo de exposição	60s
Grau de oscilação	1°

Valores entre parênteses são para resoluções externas

^a R_{sym} = $\sum |I_{\text{obs}} - \langle I \rangle| / \sum I_{\text{obs}}$ onde $\langle I \rangle$ significa a intensidade obtida de observações múltiplas da simetria de reflexões relatadas.

Figura 10. Monocristais da enzima BatroxLAO (A, B e C). Formação de cristais únicos, de coloração amarela sob a condição de 0,05 M de sulfato heptahidratado de zinco, 15% (v/v) de Polietilenoglicol monometil éter 550, controle de pH 5 com 0,1M de cacodilato de sódio e proteína BatroxLAO a 6 mg/mL.

4.1.2. Coleta de dados e determinação da estrutura cristalográfica de BatroxLAAO

Para a coleta e processamento de dados, os cristais foram transferidos para uma solução crioprotetora, contendo 0,1 M cacodilato de sódio, pH 5,0, 4 mM de sulfato heptahidratado de zinco, 17% de polietilenoglicol 550 (PEG MME 550) e glicerol 20%. Os cristais coletados foram mantidos em nitrogênio líquido até o dia da coleta de dados. Os dados de difração foram coletados de um único cristal (Figura 10 A, B e C) em linha de luz D03BMX02 do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS), usando um detector marCCD165 com organização rotacional de 1° por estrutura. Um total de 108 imagens de difração foi coletado abrangendo a primeira rotação do cristal. Os dados foram processados usando MOSFLM (LESLIE, 2006) e dimensionados com SCALA (EVANS, 2006). A coleta de dados e o processamento estatístico estão apresentados na tabela 4. Cristais da BatroxLAAO pertenceram ao grupo espacial $P2_1$. Os parâmetros de células unitárias foram a) 73,64 Å; b) 123,92 Å; c) 105,08 Å, β) 96,03° e os cristais foram difratados a 2,3 Å.

Esses dados nos permitiram resolver a estrutura da BatroxLAAO (Figura 11 A) que apresenta três domínios em sua estrutura (Figura 11 B): 1) **domínio helicoidal**: que é um dos responsáveis pela formação do dímero; 2) **domínio ligante de FAD**: que permite as interações deste cofator com os átomos da proteína e com moléculas de água conservadas. O FAD está localizado dentro da proteína e não é acessível ao solvente e 3) **domínio ligante de substrato**: que favorece a propriedade de catálise da proteína. Com a estrutura da BatroxLAAO resolvida, foi possível observar regiões de *loops*, estimar 18 α -hélices e 23 folhas β -pregueadas (Figura 11 C e 12). A localização do FAD na estrutura da BatroxLAAO revelou-se próxima aos aminoácidos Asn85, Leu86 e His463 (Figura 11 D). Os dados estruturais obtidos foram baseados no modelo da LAAO de *Agkistrodon halys pallas* (PDB core 1REO (ZHANG et al., 2004)), visto a alta similaridade estrutural destas L-aminoácidos. O modelo da BatroxLAAO obtido foi inicialmente refinado usando o programa PHENIX (ADAMS et al., 2010). O refinamento estrutural da BatroxLAAO ainda está em andamento.

Tabela 4. Coleta de Dados e processamento estatístico

Temperatura de coleta	100K
Comprimento de onda (Å)	1,45860
Grupo especial	P2 ₁
Parâmetros de rede	a = 73,64 Å b = 123,92 Å c = 105,08 Å $\beta = 96,03^\circ$
Faixa de resolução (Å)	34,84 – 2,3
Reflexões únicas	80024
Redundância ou multiplicidade (%)	2,1 (2,1)
Completeza dos dados (%)	96,5 (93,4)
Intensidade da reflexão [I/sigma (I)]	6,4 (1,7)
Erro de simetria (%) (^a R _{sym})	14,6 (55,7)
Moléculas por unidade assimétrica	4
Volume protéico [^b V _m (Å ³ /Da)]	2,12
Quantidade de solvente (%)	42
Tempo de exposição	60s
Grau de oscilação	1°

Valores entre parênteses são para resoluções externas

^a R_{sym} = $\sum |I_{\text{obs}} - \langle I \rangle| / \sum I_{\text{obs}}$ onde $\langle I \rangle$ significa a intensidade obtida de observações múltiplas da simetria de reflexões relatadas.

A)

B)

C)

D)

Figura 11. Representação parcial da estrutura da BatroxLAAO. **(A)** Representação da BatroxLAAO como homodímero; **(B)** domínios presentes na estrutura da proteína: domínio helicoidal, domínio ligante de FAD e domínio ligante de substrato; **(C)** localização dos *loops*, α -hélices e folhas β -pregueadas na estrutura; **(D)** possível localização do FAD na estrutura da BatroxLAAO. Figura construída utilizando o programa Pymol (DELANO, 2002).

Figura 12. Sequência parcial de aminoácidos de BatroxLAAO e alinhamento da sequência baseada na estrutura de AHP-LAAO. A sequência apresentada é a estrutura primária parcial de BatroxLAAO revelada após comparação da sequência de nucleotídeos de AHP-LAAO. α – (alfa-hélice); η – folha simples curta na estrutura; β – (folhas β pregueadas); 1 e 2 – pontes dissulfeto na estrutura.

4.2. Caracterização funcional

4.2.1. Atividade Leishmanicida

Após a purificação da enzima BatroxLAAO, foram realizados experimentos para a avaliação do potencial biotecnológico frente as atividades leishmanicida, bactericida, tripanomicida e fungicida. Para a atividade leishmanicida foram usadas as seguintes espécies de *Leishmania*: *L. braziliensis*, *L. major* e *L. donovani*.

A viabilidade celular da *Leishmania sp.* foi analisada após o tratamento com LAAO. A adição de BatroxLAAO diretamente às formas tripomastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* resultou em morte dos parasitas de forma dose-dependente (Figura 13). As espécies *L. major* e *L. donovani* foram as mais susceptíveis ao efeito tóxico de BatroxLAAO. A enzima purificada apresentou uma EC₅₀ de 23,34 µg/mL contra *L. braziliensis*, 4,3 µg/mL contra *L. donovani* e 4,5 µg/mL contra *L. major*.

É sabido que outras LAAOs de outras peçonhas de serpentes exibem tais atividades devido à produção de H₂O₂ (DU; CLEMETSON, 2002). O efeito tóxico apresentado pela BatroxLAAO foi praticamente abolido pela adição de catalase, sugerindo que a liberação de H₂O₂ está diretamente envolvida com o efeito da enzima (Figura 13). Na ausência de catalase, com 32 µg/mL de BatroxLAAO todas as espécies foram quase que completamente eliminadas (Figura 13), sugerindo novamente, o envolvimento da produção de H₂O₂ no mecanismo de morte.

Figura 13. Efeitos antiparasitários da LAAO de *Bothrops atrox*: Efeito dose-dependente induzido pela enzima BatroxLAAO em diferentes espécies de *Leishmania*. Diferenças estatísticas são representadas por * $p < 0,001$ sobre o efeito leishmanicida após o tratamento com BatroxLAAO. Não houve diferença estatística significativa (** $p > 0,05$) entre os tratamentos realizados com BatroxLAAO e catalase (0,5 $\mu\text{g/mL}$). Os controles foram cultivados com meio na presença e ausência de DMSO 1%. Os dados são expressos pela média e desvio padrão ($n=3$).

4.2.2. Atividade Bactericida

Para a atividade bactericida foram usadas cepas de *S. aureus* e *E. coli* (4×10^5 UFC). O tratamento com 24 μg de BatroxLAAO, após 60 minutos de incubação, foi capaz de inibir o crescimento bacteriano em $56,54 \pm 2\%$ e $35,58 \pm 3\%$ de *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. Em concentração mais elevada, de 48 μg , após 60 minutos de tratamento, foi observada uma inibição de $49,6 \pm 3\%$ em *E. coli* e $54,03 \pm 2\%$ em *S. aureus* (valores estatisticamente significativos em relação ao controle negativo, sem tratamento com BatroxLAAO, Figura 14).

Figura 14. Atividade bactericida de L-aminoácido oxidase da peçonha de *Bothrops atrox* sobre *E. coli* e *S. aureus*. Diferentes concentrações da proteína (24 e 48 μg) foram incubadas com 4×10^5 UFC por 30 minutos ($p > 0,05$ comparado ao grupo controle (não tratado) de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente) e 60 minutos (* $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (não tratado) de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente). Cada valor representa a média de três experimentos independentes ($n=3$), $\pm$ desvio padrão.

4.2.3. Atividade Tripanomicida

A atividade tripanomicida de BatroxLAAO sobre *Trypanossoma cruzi* mostrou ser dose-dependente nas concentrações de 0,5; 2; 8 e 32 μM , sendo que na maior concentração foi observado morte de $41,7 \pm 2\%$ do parasita (Figura 15). A BatroxLAAO apresentou IC_{50} de 53,31 $\mu\text{g/mL}$, revelando ser uma proteína potencialmente ativa contra *Trypanossoma cruzi* (Tabela 5).

Figura 15. Atividade tripanomicida de BatroxLAAO. Efeito dose-dependente induzido por BatroxLAAO sobre *Trypanosoma cruzi*. $\text{IC}_{50} = 53,31 \mu\text{g/mL}$. Controle negativo: 10 μL do solvente utilizado (solução mãe e DMSO) para a solubilização da substância e 630 μL do meio infectado com o parasito. Os dados são expressos por média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Valores com diferenças estatisticamente significativas entre si (*, **, ***, **** $p < 0,05$).

Tabela 5. Valores de referência para potencial de atividade

Valores de referência de IC_{50}	Potencial de atividade
$\text{IC}_{50} < 1$	Extremamente ativa
$1 \leq \text{IC}_{50} \leq 16$	Ativa
$16 \leq \text{IC}_{50} \leq 64$	Potencialmente ativa
$\text{IC}_{50} \geq 64$	Baixa atividade

4.2.4. Atividade Fungicida

Quanto à atividade fungicida, concentrações de 37,5 e 75 µg/mL de BatroxLAAO foram capazes de inibir 100% o crescimento de cultura de *Candida albicans*, sendo que a concentração de 37,5 µg/mL foi inibitória mínima para *Candida albicans* (MIC), já que nas concentrações de 18,75; 9,37 e 4,68 µg/mL não foi observada qualquer inibição do crescimento da levedura (Tabela 6). Todos os experimentos foram feitos em três replicatas e acompanhados de controles positivos de crescimento, sem tratamento, e negativos, ausência de inóculo.

Tabela 6. Atividade Fungicida de BatroxLAAO em *Candida albicans*

Amostras	Concentração (µg/mL)	Inibição do crescimento de <i>Candida albicans</i>
BatroxLAAO	75	100%
BatroxLAAO	37,5	100%
BatroxLAAO	18,75	0%*
BatroxLAAO	9,37	0%*
BatroxLAAO	4,68	0%*

(*) Não ocorreu inibição do crescimento de *Candida albicans*

4.3. Produção de anticorpos

4.3.1. Produção de imunoglobulinas de camundongos anti-BatroxLAAO

O procedimento de imunização de camundongos com BatroxLAAO promoveu a geração de anticorpos policlonais para L-aminoácidos oxidases. Este procedimento foi monitorado pela reação de ELISA e os resultados indicaram a eficiência do procedimento de hiperimunização, pois ocorreu uma elevada imunodetecção de anticorpos anti-BatroxLAAO em relação aos soros controles pré-ímmes em todos os soros dos 10 animais imunizados. Como indicado na Figura 16, os soros ímmes obtidos, derivados dos 10 animais imunizados, mostraram reatividade até a diluição de 1:60000. Além disso, a ímmunorreatividade desse *pool* mostrou estar ímmintamente correlacionada ao procedimento de imunização com essa proteína, pois o *pool* de soros pré-ímmes apresentou baixa absorbância mesmo nas menores diluições.

Com o objetivo de testar a especificidade da BatroxLAAO nos soros obtidos, analisamos o anticorpo anti-BatroxLAAO com diferentes peçonhas do mesmo gênero: *Bothrops atrox*, *B. jararaca*, *B. moojeni* e *B. jararacussu* (obtidos em nosso laboratório) e monitoramos a imunização com outras L-aminoácidos de peçonhas de serpentes: LAAO de *B. jararaca*, LAAO de *B. jararacussu* (previamente purificadas e padronizadas em nosso laboratório) e LAAO de *B. moojeni* (purificada segundo Stábeli et al., 2005) (Figura 17). A realização do ensaio de *Western blot* com o anticorpo anti-BatroxLAAO revelou uma banda característica da enzima L-aminoácido oxidase de *Bothrops atrox*. A revelação com soro ímmune e anticorpo secundário não indicou qualquer alteração após a revelação por quimioluminescência (Figuras 18 A, B e C).

Figura 16. Produção de soro de camundongo anti-BatroxLAAO. Camundongos machos da linhagem C57/BL6 foram imunizados com 100 μ g de BatroxLAAO em quatro imunizações. Os soros dos animais foram coletados antes (soro pré-imune) e após o procedimento de cada imunização (soro imune). A detecção de anticorpos anti-BatroxLAAO nesses soros foi determinada pela reação de ELISA. Os resultados foram expressos em média das absorbâncias (450nm) $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM). Valores apresentam diferenças estatísticas quando comparados ao soro pré-imune (* $p < 0,05$). Valores das diluições de 1:30000 e 1:60000 apresentam diferenças estatísticas significativas quando comparados às diluições de 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:15000 e ao soro pré-imune (** $p < 0,05$). Análise da reatividade dos soros anti-BatroxLAAO dos animais em diferentes diluições foi positiva até diluição de 1:60000.

Figura 17. Reatividade do soro de camundongo anti-BatroxLAAO com outras substâncias. Camundongos machos da linhagem Balb/C foram imunizados com 100 µg de BatroxLAAO em quatro imunizações. Os soros dos animais foram coletados antes (soro pré-imune) e após o procedimento de cada imunização (soro imune). A detecção de anticorpos anti-BatroxLAAO nesses soros foi determinada pela reação de ELISA. Índice da reatividade das peçonhas brutas de *Bothrops jararacussu*, *B. jararaca* e *Bothrops atrox* e análise da reatividade de proteínas purificadas: L-aminoácido oxidase da peçonha de *Bothrops atrox*, *B. jararaca*, *B. moojeni* e *B. jararacussu*. Os resultados foram expressos em média das absorbâncias (450nm) ± Erro Padrão da Média (EPM), sendo que não houve variação significativa de DP (desvio padrão) para análise de diferença estatística.

Figura 18. Detecção de anticorpo anti-BatroxLAAO. Foram realizadas reações na presença de anticorpo primário (A), na presença do anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugada a peroxidase, controle do secundário) (B) e na presença do anticorpo anti-BatroxLAAO (C). A banda de 67 kDa referente a BatroxLAAO foi a única detectada após eletroforese e transferência do antígeno para a membrana de nitrocelulose (PVDF). A membrana com o antígeno foi bloqueada e incubada como Ac primário específico e, em seguida, com anticorpo secundário conjugado a enzima peroxidase (horseradish peroxidase - HRP). A revelação da imunoreatividade foi realizada por quimiluminescência com tempo de exposição de 1 minuto.

4.4.1. Citotoxicidade

A atividade antitumoral foi avaliada por meio do tratamento de linhagens celulares com LAAO em diferentes concentrações (5; 10; 25; 50 e 100 µg/mL). As culturas de JURKAT, B16F10, PC12 e células mononucleares de sangue periférico de pacientes normais não tratadas foram utilizadas como controle negativo e, como controle positivo, foram utilizadas culturas tratadas com 200 µg/mL de ciclofosfamida (Cyclophosphamide Monohydrate – Lab. SIGMA Chem. Co. - USA).

Nas linhagens PC12 e JURKAT os resultados foram semelhantes em todas as concentrações, sendo que a viabilidade celular submetida a 10 µg/mL de BatroxLAAO foi de $45,14 \pm 0,07\%$ e $43,86 \pm 0,09\%$ respectivamente. Já para a linhagem B16F10, em uma maior concentração (50 µg/mL), a viabilidade celular foi avaliada em $28,32 \pm 0,15\%$. Para PBMC, nas menores concentrações (5 e 10 µg/mL) a viabilidade apresentada foi de $80,65 \pm 0,10\%$ e $68,37 \pm 0,02\%$ e, na maior concentração (100 µg/mL), permaneceu em $60,39 \pm 0,01\%$ (Figura 19). Quando as células foram tratadas com BatroxLAAO seguida de catalase (150 U/mL), uma interrupção na atividade da enzima foi observada, permanecendo viáveis quase todas as células. Na linhagem B16F10, a viabilidade celular submetida a 50 µg/mL de BatroxLAAO seguida de catalase foi de $86,88 \pm 0,02\%$ e para PBMC, nas menores concentrações (5 e 10 µg/mL), a viabilidade manteve-se em $95,77 \pm 0,04\%$ e $93,57 \pm 0,48\%$ (Figura 19).

Figura 19: Viabilidade celular de BatroxLAAO avaliada por MTT. Linhagens testadas: JURKAT, B16F10, PC12 e PBMC. Os tratamentos realizados somente com a proteína BatroxLAAO não apresentaram valores estatisticamente significativos entre si (* $p > 0,05$). Tratamentos com BatroxLAAO e catalase não apresentaram valores estatisticamente significativos entre si (** $p > 0,05$). Valores estatisticamente significativos (*** $p < 0,05$) entre os tratamentos de BatroxLAAO e BatroxLAAO e catalase. Os resultados representam o valor da média $\pm$ desvio padrão para três experimentos independentes.

4.4.2. Análise do efeito da indução de apoptose e necrose em linhagens celulares

Para a análise do efeito apoptótico, por citometria de fluxo, foram utilizadas as linhagens celulares JURKAT, B16F10, PC12 e mononucleares do sangue periférico. As concentrações de BatroxLAAO utilizadas foram 5; 10; 25 e 50 µg/mL. Foram utilizadas como controle negativo culturas não tratadas com LAAO e, como controle positivo, culturas tratadas com 200 µg/mL de ciclofosfamida.

O tratamento de JURKAT com 50µg/mL de BatroxLAAO demonstrou toxicidade induzida por necrose ($27,93 \pm 3,37\%$) quando comparada às células sem tratamento, controle negativo, sendo que apenas 0,5% das mortes celulares observadas foram realizadas por apoptose (Figura 20). Os tratamentos com 25 µg/mL e 50 µg/mL de BatroxLAAO em células B16F10 revelou um valor significativo de 53,4% e 61,2% respectivamente, de morte por apoptose (Figura 21).

Células PC12 tratadas com BatroxLAAO a 5, 10, 25 e 50 µg/mL revelaram aumento da morte celular quando comparada ao controle negativo, sendo que índice apoptótico para as concentrações de 5 µg/mL e 10 µg/mL foi de $25,8 \pm 2,4\%$ e $16,4 \pm 1,2\%$, respectivamente e para 25µg/mL e 50 µg/mL de BatroxLAAO o índice apoptótico foi de 21,2% e 30,5%, respectivamente (Figura 22). O índice de células necróticas após tratamento com 5 µg/mL e 10 µg/mL de BatroxLAAO foi de $10,9 \pm 1,3\%$ e $11,4 \pm 1,0\%$ (Figura 22).

Já o tratamento de células PBMC com BatroxLAAO não demonstrou atividade apoptótica expressiva sendo que com 25 µg/mL de BatroxLAAO, o índice apoptótico apresentado foi de 0,2%. No tratamento com menores concentrações, 5 µg/mL e 10 µg/mL não foi observado morte por apoptose, apenas morte celular por necrose. Com o aumento da concentração, a toxicidade celular tornou-se mais evidente com morte celular por necrose. Os valores apresentados nesse tratamento não possuem diferenças estatísticas entre as doses ($p > 0,05$), (Figura 23).

Figura 20. Análise de indução de apoptose por citometria de fluxo em células da linhagem JURKAT expostas ao tratamento com BatroxLAAO em diferentes concentrações (0; 5; 10; 25 e 50 µg/mL). A ciclofosfamida (CFA-200 µg/mL) foi utilizada como referência para indução de apoptose (controle positivo) e as células não-tratadas como controle negativo. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo e os quadrantes são indicados por: Q1 – anexina-V negativa e IP (iodeto de propídeo) positivo; Q2 – anexina-V positiva e IP positivo; Q3 – anexina-V negativa e IP negativo; Q4 – anexina-V e IP negativo. A porcentagem de células em apoptose está indicada no quadrante 4.

Figura 21. Análise de indução de apoptose por citometria de fluxo em células da linhagem B16F10 expostas ao tratamento com BatroxLAO em diferentes concentrações (0; 5; 10; 25 e 50 µg/mL). A ciclofosfamida (CFA-200 µg/mL) foi utilizada como referência para indução de apoptose (controle positivo) e as células não-tratadas como controle negativo. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo e os quadrantes são indicados por: Q1 – anexina-V negativa e IP (iodeto de propídeo) positivo; Q2 – anexina-V positiva e IP positivo; Q3 – anexina-V negativa e IP negativo; Q4 – anexina-V e IP negativo. A porcentagem de células em apoptose está indicada no quadrante 4.

Figura 22. Análise de indução de apoptose por citometria de fluxo em células da linhagem PC12 expostas ao tratamento com BatroxLAAO em diferentes concentrações (0; 5; 10; 25 e 50 µg/mL). A ciclofosfamida (CFA-200 µg/mL) foi utilizada como referência para indução de apoptose (controle positivo) e as células não-tratadas como controle negativo. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo e os quadrantes são indicados por: Q1 – anexina-V negativa e IP (iodeto de propídeo) positivo; Q2 – anexina-V positiva e IP positivo; Q3 – anexina-V negativa e IP negativo; Q4 – anexina-V e IP negativo. A porcentagem de células em apoptose está indicada no quadrante 4.

Figura 23. Análise de indução de apoptose por citometria de fluxo em células da linhagem de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) expostas ao tratamento com BatroxLAAO em diferentes concentrações (0; 5; 10; 25 e 50 µg/mL). A ciclofosfamida (CFA-200 µg/mL) foi utilizada como referência para indução de apoptose (controle positivo) e as células não-tratadas como controle negativo. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo e os quadrantes são indicados por: Q1 – anexina-V negativa e IP (iodeto de propídeo) positivo; Q2 – anexina-V positiva e IP positivo; Q3 – anexina-V negativa e IP negativo; Q4 – anexina-V e IP negativo. A porcentagem de células em apoptose está indicada no quadrante 4.

4.5. Análise sobre células tumorais

4.5.1. Análise sobre a linhagem tumoral HL-60 e células mononucleares do sangue periférico

As Figuras 24 A e B referem-se à resposta das células tumorais HL-60 (células humanas de leucemia pró-mielocíticas) e células mononucleares do sangue periférico (PBMC) frente ao tratamento com BatroxLAAO nas concentrações de 5, 25 e 50 µg/mL. A análise foi realizada por microscopia de epifluorescência por meio de diferentes corantes. A Figura 25 refere-se à análise morfológica das células da linhagem HL-60 tratada com BatroxLAAO (50 µg/mL) e verificada por microscopia de epifluorescência. A porcentagem de cada tipo celular nas linhagens PBMC e HL-60 tratadas com BatroxLAAO foi analisada a partir destas morfologias.

Para o tratamento das células PBMC, na concentração de 50 µg/mL foi possível observar um valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) para as células viáveis, mas ao compará-las com as outras morfologias neste mesmo tratamento, observou-se que o número de células viáveis é maior que o das células apoptóticas e necróticas (Figura 24 B).

As células tumorais HL-60 quando tratadas com BatroxLAAO a 50 µg/mL apresentaram maior número de células mortas por apoptose em relação ao número de células mortas por necrose e em relação ao controle negativo (cultura de células não tratadas com LAAO) (Figuras 24 A).

Figura 24. Análise comparativa por microscopia de epifluorescência da morfologia celular presente em cultura de células tumorais HL-60 **(A)** e células PBMC **(B)** tratadas com BatroxLAO (5, 25 e 50µg/mL). Para letras diferentes $p < 0,001$, comparadas ao controle negativo (CN) do experimento; para letras iguais $p > 0,05$, comparadas ao controle negativo (CN) do experimento.

Figura 25. Análise de núcleos apoptóticos por microscopia de epifluorescência em linhagem celular HL-60. As células normais são visualizadas com núcleo azul ou verde, esférico e íntegro (seta 1), as apoptóticas com núcleo azul com corpúsculos (seta 2) e as necróticas com núcleo vermelho, esférico (seta 3).

4.5.2. Análise da cinética do ciclo celular

Após a realização da microscopia de epifluorescência, foram realizados experimentos para análise do ciclo celular, a fim de localizar a atuação dessa enzima (BatroxLAAO) no processo apoptótico.

A análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo revelou um acúmulo de células HL-60 na fase G0/G1 após o tratamento com BatroxLAAO. Quando as células foram tratadas com a maior concentração (50 µg/mL) por 24 horas, a porcentagem de células em atraso na fase G0/G1 aumentou de 43 para 68% em relação ao controle negativo (Figura 26). O aumento das células em G1 pareceu estar associado com a diminuição concomitante da porcentagem de células em S, que reduziu de 53 para 22% em relação ao controle negativo. A fase G2/M obteve valores estatisticamente menores, em relação a G0/G1 em todas as concentrações, da mesma forma, o acúmulo de células na fase S foi estatisticamente menor ($p < 0,05$) em relação a G0/G1 nas concentrações mais altas (25 e 50 µg/mL) (Figura 26).

Nos ensaios realizados, foi possível observar que mesmo em concentrações menores (5 µg/mL), há maior porcentagem de células em G0/G1 em relação à fase S com diferença de 10%. Nas concentrações intermediárias, essa diferença aumenta para 24% (25 µg/mL) e na maior concentração (50 µg/mL), chega a 46%, sendo ambos os valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação à fase G0/G1 (Figura 26).

Figura 26. Inibição da progressão do ciclo celular em células HL-60 após o tratamento com BatroxLAAO. Atraso na fase G0/G1 após o tratamento com BatroxLAAO (25 and 50 µg/mL). Controle: G0/G1 43,08%, S 53,3%, G2/M 3,61%. 5 µg/mL BatroxLAAO: G0/G1 52,5%, S 42,78%, G2/M 4,72%. 10 µg/mL BatroxLAAO: G0/G1 52,71%, S 44,56%, G2/M 2,71%. 25 µg/mL BatroxLAAO: G0/G1 58,49%, S 34,91%, G2/M 6,56%. 50 µg/mL BatroxLAAO: G0/G1 68,12%, S 22,45%, G2/M 9,42%. As células foram fixadas com etanol e coradas com iodeto de Propídeo, e então, a distribuição do ciclo celular foi analisada por citometria de fluxo. ^{d,e} $p < 0.05$ comparado com as células em G0/G1 após o tratamento com 25µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente.

4.6. Inoculação de tumor

4.6.1. Análise da expressão diferencial dos genes *bax*, *fas* e *bcl2* por PCR em tempo real

A modulação da expressão dos genes *bax*, *fas* e *bcl-2* foi investigada pela metodologia de PCR em tempo real. Camundongos da linhagem Balb/c receberam injeção intraperitoneal de aproximadamente 5×10^6 células das linhagens PC12, B16F10 e JURKAT e receberam 100 µg/mL de BatroxLAAO simultaneamente ao tratamento com as linhagens tumorais. Outro grupo de animais foi submetido ao tratamento com BatroxLAAO (100 µg/mL) após 3 dias da injeção de células tumorais. Os tratamentos incluíam também animais tratados somente com LAAO e animais que não receberam nenhum tipo de tratamento. Após 19 dias os animais foram eutanasiados para retirada do fígado, baço e tumor (se presente no animal).

Após este procedimento, este material foi utilizado para extração de RNA, síntese de cDNA e as análises de expressão dos genes *bax*, *fas* e *bcl-2*. Na Figura 27 podemos observar a qualidade, pureza e integridade do RNA em gel de agarose.

Inicialmente realizamos a síntese do cDNA a partir de 1 µg da amostra de RNA, em seguida as amostras de cDNA foram submetidas a análise da PCR quantitativa. Para a realização da PCR quantitativa, utilizamos 1 µL do cDNA e como gene *housekeeping* GAPDH ou β-actina afim de averiguarmos sua expressão e a integridade das amostras obtidas (Figura 28).

Figura 27. Gel de agarose 1% com amostras de RNA extraídas de órgãos e/ou tumores de animais inoculados com células tumorais: 1) BatroxLAAO (fígado); 2) PC12+BatroxLAAO tardia (tumor); 3) BatroxLAAO (fígado); 4) PC12+BatroxLAAO tardia (tumor); 5) BatroxLAAO (baço); 6) PC12+BatroxLAAO (tumor); 7) PC12+BatroxLAAO (tumor); 8) Controle (fígado); 9) Controle (fígado); 10) BatroxLAAO (fígado); 11) B16F10+BatroxLAAO (tumor); 12) B16F10+BatroxLAAO (tumor); 13) Controle (baço); 14) Controle (baço); 15) B16F10+BatroxLAAO tardia (tumor); 16) B16F10+BatroxLAAO tardia (tumor); 17) BatroxLAAO (baço); 18) PC12+BatroxLAAO tardia (tumor); 19) B16F10+BatroxLAAO tardia (tumor); 20) B16F10+BatroxLAAO (tumor). Observe-se as bandas 28S, 18S do RNA.

Figura 28. Amplificação representativa da PCR para detecção de um produto de 399 pares de base (pb) de uma porção do gene GAPDH, para comprovação da presença de DNA amplificável (1): Marcador de peso molecular 100 pb; (2): Controle positivo de DNA amplificável - GAPDH.

4.6.2. Expressão diferencial do gene *bcl-2*

4.6.2.1. Células B16F10

A Figura 29 refere-se ao perfil de expressão do gene *bcl2* nas amostras estudadas segundo tratamentos descritos no item 4.6.1.

Os animais que foram submetidos ao tratamento com células tumorais B16F10 (melanoma murino), apresentaram formação tumoral de forma bastante visível e, em alguns casos, o tumor ocupava toda região abdominal, não sendo possível, nestes casos, a retirada de órgãos ou até mesmo do tumor. Na Figura 29 A, observamos a expressão do gene *bcl2* em baços de animais submetidos aos tratamentos previamente citados. Verificamos que BatroxLAAO não apresentou efeito significativo sobre a expressão do gene ($p>0,05$) quando comparamos os tratamentos com as células tumorais e o tratamento com a proteína. A Figura 29 B, indica que a BatroxLAAO não demonstrou efeito anti-apoptótico aparente após todos os tratamentos. Não houve alteração estatística de expressão gênica em nenhum dos tratamentos realizados ($p>0,05$). Já a Figura 29 C, demonstra a ação de BatroxLAAO sobre tumores induzidos nos animais. Novamente, não verificamos qualquer alteração estatística nos tumores de animais inoculados com células tumorais B16F10 seguidos do tratamento com a proteína BatroxLAAO. A comparação é realizada em relação ao tumor de animais sem qualquer tratamento com BatroxLAAO, equivalente ao número 1.

Figura 29. Perfil de expressão do gene *bcl2* por PCR em tempo real para amostras de tecido/tumor de camundongos tratados com células tumorais B16F10 seguidas do tratamento com BatroxLAAO. As amostras controle (A e B: animais sem quaisquer tratamentos; C: animais inoculados com células tumorais sem tratamento com a proteína). Foram utilizadas como calibradores do experimento. O gene constitutivo utilizado foi o β -actina. O limiar basal do número de ciclos foi determinado pelo software iCycler versão 2.3. Os dados representam a média e desvio padrão da análise da expressão em tempo real de três experimentos independentes. Os dados são mostrados em U.R.E (Unidade Relativa de Expressão) $\pm$ desvio-padrão; $p > 0,05$ em todos os tratamentos.

4.6.2.2. Células PC12

A figura 30 demonstra a resposta dos animais aos tratamentos com células tumorais PC12 seguido do tratamento com BatroxLAAO. Na Figura 30 A, observamos que BatroxLAAO não apresentou potencial anti-apoptótico pois não foi capaz de expressar o gene *bcl2* após os tratamentos efetuados. Da mesma forma, a Figura 30 B, não demonstrou alteração estatística significativa ($p>0,05$) no tratamento dos animais com as células tumorais PC12 e BatroxLAAO.

Figura 30. Perfil de expressão do gene *bcl2* por PCR em tempo real para amostras de tecido de camundongos tratados com células tumorais PC12 seguidas do tratamento com BatroxLAAO. As amostras controle (animais sem quaisquer tratamentos) foram utilizadas como calibradores do experimento. O gene constitutivo utilizado foi o β -actina. O limiar basal do número de ciclos foi determinado pelo software iCycler versão 2.3. Os dados representam a média e desvio padrão da análise da expressão em tempo real de três experimentos independentes. Os dados são mostrados em U.R.E (Unidade Relativa de Expressão) $\pm$ desvio-padrão; $p>0,05$ para todos os tratamentos realizados.

4.6.2.3. Células JURKAT

A Figura 31 demonstra o perfil da atividade da BatroxLAAO em órgãos (fígado e baço) de animais inoculados com células tumorais JURKAT seguidos do tratamento com BatroxLAAO. Na Figura 31 A, observamos que BatroxLAAO apresentou um leve aumento na expressão do gene *Bcl2* quando comparado ao controle negativo do experimento, no entanto, esse leve aumento do gene anti-apoptótico não apresentou diferença estatística ($p>0,05$) quando comparado ao controle negativo. Já a Figura 31 B, relata a baixa expressão do gene anti-apoptótico *bcl2* no fígado dos animais submetidos aos tratamentos com células JURKAT e BatroxLAAO.

Figura 31. Perfil de expressão do gene *bcl-2* por PCR em tempo real para amostras de tecido de camundongos tratados com células tumorais JURKAT seguidas do tratamento com BatroxLAAO. As amostras controle (animais sem quaisquer tratamentos) foram utilizadas como calibradores do experimento. O gene constitutivo utilizado foi o β -actina. O limiar basal do número de ciclos foi determinado pelo software iCycler versão 2.3. Os dados representam a média e desvio padrão da análise da expressão em tempo real de três experimentos independentes. Os dados são mostrados em U.R.E (Unidade Relativa de Expressão) $\pm$ desvio-padrão; $p > 0,05$ para todos os tratamentos realizados.

4.6.3. Expressão diferencial do gene *bax*

4.6.3.1. Células B16F10

A Figura 32 refere-se ao perfil de expressão do gene *bax* nas amostras estudadas segundo tratamentos descritos no item 4.6.1.

Na Figura 32 A observamos a expressão do gene *bax* em baços de animais submetidos aos tratamentos previamente citados. Verificamos que os baços de animais tratados somente com BatroxLAAO apresentaram baixa expressão do gene *bax* e, em animais inoculados com as células tumorais B16F10, seguidos do tratamento com BatroxLAAO, observamos um leve aumento, estatisticamente significativo ($p < 0,05$), na expressão do gene *bax*, possivelmente pela ação da proteína BatroxLAAO. A Figura 32 B, demonstra um leve aumento da expressão do gene *bax* somente no tratamento tardio com a proteína, no entanto, essa alteração apresentada não foi considerada estatisticamente significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle negativo do experimento. A Figura 32 C indica que a BatroxLAAO não promoveu o aumento da expressão gênica (*bax*) em tumores inoculados em animais.

Figura 32: Perfil de expressão do gene *bax* por PCR em tempo real para amostras de tecido/tumor de camundongos tratados com células tumorais B16F10 seguidas do tratamento com BatroxLAAO. As amostras controle (A e B: animais sem quaisquer tratamentos; C: animais inoculados com células tumorais sem tratamento com a proteína foram utilizados como calibradores do experimento). O gene constitutivo utilizado foi o β -actina. O limiar basal do número de ciclos foi determinado pelo software iCycler versão 2.3. Os dados representam a média e desvio padrão da análise da expressão em tempo real de três experimentos independentes. Os dados são mostrados em U.R.E (Unidade Relativa de Expressão) $\pm$ desvio-padrão; $p > 0,05$ nos tratamentos B e C; $p < 0,05$ nos tratamentos apresentados em A.

4.6.3.2. Células PC12

A Figura 33 demonstra os resultados obtidos de baço e fígado de animais tratados com células tumorais PC12, seguidos do tratamento com a proteína BatroxLAAO. A Figura 33 A, indica que a BatroxLAAO apresentou baixa expressão do gene *bax* em baços de animais submetidos aos tratamentos citados anteriormente. Na Figura 33 B, observamos uma grande variação de resposta dos animais, onde os mesmos responderam de forma bastante heterogênea aos tratamentos realizados. A BatroxLAAO não foi capaz de promover um aumento na expressão do gene *bax* nas circunstâncias testadas.

Figura 33. Perfil de expressão do gene *bax* por PCR em tempo real para amostras de tecido de camundongos tratados com células tumorais PC12 seguidas do tratamento com BatroxLAAO. As amostras controle (animais sem quaisquer tratamentos) foram utilizadas como calibradores do experimento. O gene constitutivo utilizado foi o β -actina. O limiar basal do número de ciclos foi determinado pelo software iCycler versão 2.3. Os dados representam a média e desvio padrão da análise da expressão em tempo real de três experimentos independentes. Os dados são mostrados em U.R.E (Unidade Relativa de Expressão) $\pm$ desvio-padrão; $p > 0,05$ para os tratamentos realizados.

4.6.3.3. Células JURKAT

A Figura 34 apresenta a expressão do gene *bax* em baço e fígado de animais inoculados com células tumorais JURKAT, seguidos do tratamento com BatroxLAAO. Na Figura 34 A, observamos um leve aumento da expressão gênica, possivelmente ocorrido pelo tratamento com BatroxLAAO. Este aumento de expressão do gene *bax*, no entanto, não foi estatisticamente significativo quando comparado com controle negativo do experimento. Da mesma forma, na Figura 34 B, observamos um aumento na expressão do gene *bax* após o tratamento tardio com a proteína BatroxLAAO, demonstrando, neste caso, esta ser uma proteína levemente apoptótica. Mesmo com a percepção de aumento visual na expressão gênica, não foi possível identificar o aumento estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo.

Figura 34. Perfil de expressão do gene *bax* por PCR em tempo real para amostras de tecido de camundongos tratados com células tumorais JURKAT e BatroxLAAO (100 $\mu\text{g/mL}$). As amostras controle (animais sem quaisquer tratamentos) foram utilizadas como calibradores do experimento. O gene constitutivo utilizado foi o β -actina. O limiar basal do número de ciclos foi determinado pelo software iCycler versão 2.3. Os dados representam a média e desvio padrão da análise da expressão em tempo real de dois experimentos independentes. Os dados são mostrados em U.R.E $\pm$ desvio-padrão; $p > 0,05$ em todos os tratamentos testados.

4.6.4. Expressão diferencial do gene *fas*

4.6.4.1. Células B16F10

A Figura 35 revela a ação da proteína BatroxLAAO em baço e fígado de animais inoculados com células tumorais B16F10 seguidas do tratamento com BatroxLAAO. Na Figura 35 A, observamos que o tratamento com as células B16F10 aumentou a expressão do gene FAS, no entanto, a inoculação do tumor, seguido do tratamento com BatroxLAAO não apresentou aumento evidente na expressão do gene *fas*. Diferentemente, a Figura 35 B demonstra a baixa expressão do gene *fas* mesmo após o tratamento tardio com BatroxLAAO, ou seja, esta proteína não apresentou qualquer alteração estatisticamente significativa no fígado dos animais submetidos aos tratamentos previamente citados. Na Figura 35 C, verificamos que o tratamento tardio de BatroxLAAO apresentou um aumento na expressão do gene *fas*.

Figura 35. Perfil de expressão do gene *fas* por PCR em tempo real para amostras de tecido/tumor de camundongos tratados com células tumorais B16F10 e BatroxLAAO (100 µg/mL). As amostras controle (A e B: animais sem quaisquer tratamentos; C: animais inoculados com células tumorais sem tratamento com a proteína) foram utilizadas como calibradores do experimento. O gene constitutivo utilizado foi o β -actina. O limiar basal do número de ciclos foi determinado pelo software iCycler versão 2.3. Os dados representam a média e desvio padrão da análise da expressão em tempo real de dois experimentos independentes. Os dados são mostrados em U.R.E $\pm$ desvio-padrão; $p > 0,05$ em todos os tratamentos testados.

4.6.4.2. Células PC12

A Figura 36 demonstra a ação da proteína BatroxLAAO em fígado e baço de animais tratados com células tumorais PC12, seguidos do tratamento com a proteína BatroxLAAO. Na Figura 36 A, observamos alta expressão do gene *fas* após tratamento somente com BatroxLAAO. O tratamento com as células tumorais PC12 apresentaram baixa expressão do gene *FAS* e os tratamentos simultâneos e tardios com as células tumorais e BatroxLAAO apresentaram um leve aumento, sem diferença estatística significativa, na expressão do gene *fas*, quando comparados ao controle negativo do experimento. A Figura 36 B, apresenta a expressão do gene *fas* no fígado de animais inoculados com células tumorais PC12 e BatroxLAAO. Neste caso, observamos que não houve alteração na expressão do gene em questão, sendo que todos os tratamentos revelaram expressão abaixo do controle do experimento.

Figura 36. Perfil de expressão do gene *fas* por PCR em tempo real para amostras de tecido de camundongos tratados com células tumorais PC12 e BatroxLAAO (100 µg/mL). As amostras controle (animais sem quaisquer tratamentos) foram utilizadas como calibradores do experimento. O gene constitutivo utilizado foi o β -actina. O limiar basal do número de ciclos foi determinado pelo software iCycler versão 2.3. Os dados representam a média e desvio padrão da análise da expressão em tempo real de dois experimentos independentes. Os dados são mostrados em U.R.E $\pm$ desvio-padrão; $p > 0,05$ para todos os tratamentos testados.

4.6.4.3. Células JURKAT

A Figura 37 revela a alteração na expressão do gene *FAS* nos órgãos fígado e baço de animais inoculados com células tumorais JURKAT seguidos do tratamento com a proteína BatroxLAAO. A Figura 37 A, demonstra a ação da proteína no baço dos animais, sendo que o tratamento dos animais com BatroxLAAO (simultânea e tardia) indicou um leve aumento na expressão do gene *FAS*, no entanto, esse aumento não apresentou atividade estatística significativa quando comparado ao controle negativo. A Figura 37 B, revela baixa expressão do gene *FAS* mesmo após o tratamento com as células tumorais e proteína BatroxLAAO.

Figura 37. Perfil de expressão do gene *fas* por PCR em tempo real para amostras de tecido de camundongos tratados com células tumorais JURKAT e BatroxLAAO (100 µg/mL). As amostras controle (animais sem quaisquer tratamentos) foram utilizadas como calibradores do experimento. O gene constitutivo utilizado foi o β -actina. O limiar basal do número de ciclos foi determinado pelo software iCycler versão 2.3. Os dados representam a média e desvio padrão da análise da expressão em tempo real de dois experimentos independentes. Os dados são mostrados em U.R.E $\pm$ desvio-padrão; $p > 0,05$ para todos os tratamentos testados.

4.6.5. Detecção de proteína pró-apoptótica por Western Blotting

A fim de confirmar a possível ação apoptótica da proteína BatroxLAAO, foram realizados experimentos para identificação de proteínas pró e anti-apoptóticas pela metodologia de Western Blotting.

4.6.5.1 Identificação da proteína pró-apoptótica: BAX

Figura 38. Identificação da proteína pró-apoptótica, BAX, em amostras de tecidos provenientes de animais submetidos à inoculação tumoral seguido do tratamento com a proteína BatroxLAAO. (1) Controle baço; (2) Controle fígado; (3) LAAO / baço; (4) LAAO / fígado; (5) PC12 / baço; (6) PC12 / fígado; (7) PC12+LAAO / baço; (8) PC12+LAAO / fígado; (9) PC12+LAAO* / baço; (10) PC12+LAAO*/fígado; (11) JURKAT/baço; (12) JURKAT/fígado; (13) JURKAT+LAAO/baço; (14) JURKAT+LAAO/fígado; (15) JURKAT+LAAO* / baço; (16) JURKAT+LAAO*/fígado; (17) B16F10/baço; (18) B16F10 / fígado; (19) B16F10+LAAO / baço; (20) B16F10+LAAO / fígado; (21) B16F10+LAAO* / baço; (22) B16F10+LAAO* / fígado; (23) B16F10 / tumor; (24) B16F10+LAAO / tumor; (25) B16F10+LAAO* / tumor. (* Representação do tratamento tardio com a proteína BatroxLAAO). A membrana com o antígeno foi bloqueada e incubada com o Ac primário específico (anti-BAX) e, em seguida, com anticorpo secundário conjugado à enzima peroxidase (horseradish peroxidase - HRP). A revelação da imunoreatividade foi realizada por quimiluminescência com tempo de exposição de 1 minuto.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à própria civilização humana e, por um longo tempo, minerais, produtos de plantas e animais, foram as principais origens de medicamentos (DE PASQUALE, 1984).

Toxinas isoladas de peçonhas têm sido usadas como ferramentas moleculares na compreensão de diversos eventos fisiológicos e fisiopatológicos o que pode ser comprovado por vários trabalhos na literatura. O homem aprendeu, com a evolução da ciência, que a diferença entre um medicamento e a peçonha está na administração correta da dose, portanto, os estudos químicos, bioquímicos, farmacológicos, fisiológicos e tóxicos de determinados compostos como proteínas, enzimas e peptídeos estão sendo realizados de forma cada vez mais específica, a fim de se encontrar nas próprias toxinas animais, substâncias que possam agir de forma benéfica ao homem.

No presente trabalho, estudamos o aspecto cristalográfico da BatroxLAAO, bem como evidenciamos a estrutura tridimensional desta proteína. O potencial biotecnológico da BatroxLAAO foi avaliado por meio das atividades leishmanicida, bactericida, fungicida e tripanomicida. Além disso, a atuação da BatroxLAAO como agente antitumoral foi avaliada *in vitro* e *in vivo*, revelando ser uma proteína com moderado potencial apoptótico mediado pela via mitocondrial.

O processo de purificação da BatroxLAAO foi desenvolvido segundo Alves et al. (2008). Este método consiste de 3 etapas cromatográficas. Brevemente, utilizamos cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75, eluída em AMBIC 0,05M pH 8,0. Obtivemos com essa etapa 5 frações protéicas, sendo que o primeiro pico, com atividade L-aminoácido, foi submetido ao segundo passo cromatográfico com eluição em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em coluna de troca aniônica (DEAE) com gradiente AMBIC 0,05 a 0,5 M, pH 8,0. Das três frações obtidas nesse processo a terceira fração apresentou atividade sobre L-Leucina. A última etapa de purificação foi realizada em cromatografia de afinidade em Lentil Lectina para obtenção da proteína pura (ALVES et al., 2008).

Os passos cromatográficos para a purificação da proteína são indispensáveis para obtenção de um bom resultado. No entanto, a quantidade de L-aminoácido oxidase na peçonha de *Bothrops atrox*, é baixa, sendo que a recuperação da proteína pura nessa peçonha é de 1,54% (Tabela 7). Embora a quantidade total da

L-aminoácido oxidase na peçonha de *B. atrox* seja baixa, podemos considerar que o processo de purificação da mesma foi bastante eficiente, não apresentado perdas substanciais da proteína (Tabela 7). A peçonha da serpente *Bothrops atrox* é a segunda peçonha botrópica com maior atividade de L-aminoácido oxidase, superado somente pela peçonha de *Bothrops moojeni* (TEMPONE et al., 2001) (Tabela 8).

Tabela 7. Purificação da L-aminoácido oxidase de *Bothrops atrox*

	Peçonha bruta	Sephadex G-75	(CLAE)	Lentil Lectina
Proteína (mg)	260	13,36	5,28	4,00
Proteína (%)	100	5,14	2,03	1,54
Atividade Específica (U/mg)	1,63	31,60	75,37	87,5
Recuperação da atividade (%)	100	98,1	93,8	82,5
Fator de Purificação	1	19	46	54

Fonte: Alves et al., 2008.

Tabela 8. Atividade L-Aminoácido Oxidase de Peçonhas de Serpentes

Serpentes	U/MG
Gênero: <i>Crotalus</i>	
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	85,2
<i>Crotalus durissus terrificus</i> (região ibitiuva)	-----
<i>Crotalus durissus collilineatus</i>	52,0
<i>Crotalus durissus cascavella</i>	28,2
Gênero: <i>Bothrops</i>	
<i>Bothrops alternatus</i>	94,7
<i>Bothrops moojeni</i>	235,3
<i>Bothrops atrox</i> (região Pará)	165,7
<i>Bothrops atrox</i> (região Macapá)	38,7
<i>Bothrops atrox</i> (região Belém)	11,38
<i>Bothrops jararacussu</i>	66,76
<i>Bothrops jararaca</i>	71,20
<i>Bothrops pirajai</i>	113,50

Fonte: Raquel de Melo Alves (2007). Dissertação de Mestrado.

A baixa recuperação para a obtenção da proteína (BatroxLAAO) pura dificulta os procedimentos para a cristalização, pois são necessárias elevadas concentrações para obtenção de um cristal límpido e satisfatório para a difração. Em geral, as LAAOs obtidas de peçonhas apresentam de 1 a 9% de recuperação de proteínas

totais (TAN; PONNUDURAI, 1991; ALI et al., 2000) exceto para a peçonha de *Calosellasma rhodostoma* que é de 30% (PONNUDURAI; CHUNG; TAN, 1994).

Para a formação de um cristal, a solução de proteína deve ser levada a um estado de supersaturação, estado termodinamicamente instável, onde as moléculas de proteína são agrupadas de forma organizada. Diversos fatores podem ser combinados de forma a levar a solução de proteína para o estado de supersaturação e conseqüentemente formação do cristal. Os mais comumente utilizados são: temperatura, concentração do agente precipitante, pH, concentração de proteína, aumento e diminuição da concentração salina (“salting out” e “salting in”) dentre inúmeros outros (PINHEIRO, 2007).

A estrutura da L-aminoácido oxidase de *Bothrops atrox* (BatroxLAAO) foi determinada com resolução de 2,3 Å (Tabela 4). As condições de cristalização para a enzima nativa foram realizadas pela técnica de difusão de vapor em gota sentada. Agregados cristalinos foram obtidos na condição: polietilenoglicol (PEG) monometil éter 550, MES monohidratado em pH 6,5 e sulfato heptahidratado de zinco (Figura 6). Durante o refinamento das condições foram verificados que alguns compostos, em determinadas concentrações, desfavoreciam a formação de cristais de alta qualidade. Dentre esses compostos podemos citar a importância do zinco na formação do cristal de BatroxLAAO, pois a ausência do mesmo favorecia a formação de cristal com baixa qualidade (Figura 7). O aumento de PEG promovia a formação de cristais em forma de vassouras, desfavoráveis para a difração (Figura 8). Após o refinamento das condições iniciais, os cristais tornaram-se únicos, no entanto sobrepostos (“clusters”), a partir de 12% de PEG MME 550, 0,05 M de sulfato de zinco, 100 mM de cacodilato de sódio pH 5 e 100 µL de óleo silicone de parafina (1:1). Estes “clusters” apareceram após 4 meses de incubação e foram usados para macrosemeadura (Figuras 9 A e B) pela transferência a uma solução contendo uma mistura de igual volume da proteína pura e recém purificada e dissolvidos na solução mãe consistindo de 15% de PEG MME 550, 0,05 M de sulfato de zinco, 100 mM de cacodilato de sódio pH 5 e 100 µL de óleo silicone de parafina (1:1). Após 15 dias de equilíbrio contra a solução precipitante inicial foram observados cristais grandes e de coloração amarela, característicos da proteína (Figuras 10 A, B e C).

A estrutura cristalográfica da BatroxLAAO foi determinada (Figura 11) revelando uma relação de alta similaridade entre essa estrutura e a estrutura da L-aminoácido oxidase de *Agkistrodon halys pallas* (AHP-LAAO) (Figuras 12). Essa

relação apóia a noção de que as LAAOs de peçonhas de serpentes podem submeter-se a semelhantes mecanismos catalíticos apesar de suas distintas estereoespecificidade (PAWELEK et al., 2000).

Da mesma forma que AHP-LAAO e LAAO de *Calloselasma rhodostoma*, a BatroxLAAO apresenta a conservação do resíduo de aminoácido Arg322, que pode produzir interações hidrofóbicas favoráveis entre porções alifáticas e o respectivo substrato (ZHANG et al., 2004; MOUSTAFA et al., 2006). Diferentemente da LAAO de *Vipera ammodytes ammodytes*, que apresenta em seu sítio catalítico a conservação do aminoácido Lys326 (GEORGIEVA et al., 2010).

A estrutura cristalográfica da BatroxLAAO revelou a localização do cofator FAD, que é responsável pela atividade catalítica da proteína. Este está localizado em duas regiões descontínuadas da estrutura, próximo aos aminoácidos Asn85 e Leu86 e His463 (Figura 11 D). Além desses dados, foi possível localizar o aminoácido que faz interação com a porção glicosilada da proteína (Asn172), presente também na estrutura da LAAO de *Calloselasma rhodostoma* (PAWELEK et al., 2000). Com os dados estruturais, ainda foi possível localizar o resíduo (G212) por onde é liberado o H_2O_2 , que é um dos responsáveis pela atividade tóxica da proteína.

A estrutura cristalográfica da enzima L-aminoácido oxidase de *Calloselasma rhodostoma* com o substrato L-fenilalanina foi resolvida por Moustafa et al. (2006). Os dados estruturais discutidos para BatroxLAAO foram baseados principalmente na estrutura bem detalhada da L-aminoácido oxidase de *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO). A estrutura cristalográfica desta LAAO revelou alterações conformacionais significantes para os resíduos principais: His223 e Arg322, enfatizando a natureza dinâmica do sítio ativo da enzima. Esses movimentos podem ser correlacionados com a ligação e liberação dos ligantes. Os ligantes do substrato inicial obrigatório podem induzir a His223 a adotar uma conformação que bloqueia o acesso do oxigênio para o sítio ativo para permitir a entrada do substrato (L-fenilalanina) e desprotonação do “zwitterion” (íon dipolar). Após a entrada do substrato no sítio ativo, o canal de acesso do oxigênio é aberto devido às interações favoráveis entre a estrutura dos anéis imidazol e fenil (MOUSTAFA et al., 2006). Esta estrutura vinculada ao substrato L-fenilalanina destaca importantes recursos desta flavoenzima e fornece um profundo entendimento do mecanismo catalítico. A

identificação da natureza química dos ligantes, bem como o estado de oxidação do cofator flavina é crucial para a análise e interpretação estrutural.

A estrutura de LGOX, uma L-Glutamato oxidase de *Streptomyces* sp.X-119-6, foi resolvida a 2,8 Å. Apesar de várias diferenças estruturais, tanto LGOX quanto as LAAOs em geral, compartilham resíduos idênticos que compõem o sítio ativo: Ile374, Gly212 e Glu219, sugerindo que o arranjo dos resíduos do sítio ativo são responsáveis pela estrita enantioseletividade das LAAOs, visto que estas podem oxidar uma gama de aminoácidos hidrofóbicos (MASSEY; CURTI, 1967; ARIMA et al., 2006; 2009).

O potencial biotecnológico da enzima BatroxLAAO foi avaliado por meio das atividades leishmanicida, tripanomicida, bactericida e fungicida.

Os estudos de toxinas animais em atividades antiparasitárias ainda são bastante limitados. Segundo Izidoro et al. (2006), a LAAO-I de *Bothrops pirajai* mostrou atividade leishmanicida em *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani* e *L. major*. Esses autores demonstraram que a BpirLAAO-I foi capaz de induzir mortalidade dose-dependente das formas tripomastigotas em diferentes espécies de *Leishmania*, sendo a espécie *L. braziliensis* a mais susceptível aos efeitos tóxicos dessa proteína (BpirLAAO-I). Na presença de catalase, a espécie *L. donovani* mostrou uma sobrevivência de 100%, sugerindo novamente o envolvimento do H₂O₂ no mecanismo de morte. Da mesma forma, a LAAO de *B. moojeni* causou elevada mortalidade de formas promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania in vitro* sugerindo uma promissora estratégia de terapia contra leishmanias e outras infecções parasitárias intracelulares (TEMPONE et al., 2001).

Bp-LAAO, uma L-aminoácido oxidase purificada de *Bothrops pauloensis* apresentou atividade leishmanicida. A proteína apresentou EC₅₀ de 1,48 µg/mL contra *L. amazonensis*, 1,59 µg/mL contra *L. donovani*, 1,03 µg/mL contra *L. braziliensis* e 1,29 µg/mL contra *L. major*. Bp-LAAO induziu mortalidade dose-dependente de formas tripomastigotas nas diferentes espécies de *Leishmania* testadas. *L. braziliensis* foi a espécie mais sensível aos efeitos tóxicos de Bp-LAAO. Na presença de catalase, *L. major* apresentou aproximadamente 70% de sobrevivência celular. As formas promastigotas apresentaram susceptibilidade ao H₂O₂ (RODRIGUES et al., 2009).

Em nosso estudo, a ação leishmanicida apresentada pela BatroxLAAO demonstra que a enzima atuou sobre todas as espécies de *Leishmania*: *L.*

braziliensis, *L. donovani* e *L. major*. As espécies *L. donovani* e *L. major* foram as mais susceptíveis ao efeito tóxico de BatroxLAAO (Figura 13). De forma diferente, os dados de Rodrigues et al. (2009) indicaram que a espécie *L. braziliensis* foi a mais susceptível à ação de Bp-LAAO. BatroxLAAO apresentou mortalidade dose-dependente das formas tripomastigotas e apresentou uma EC₅₀ de 23,34 µg/mL contra *L. braziliensis*, 4,3 µg/mL contra *L. donovani* e 4,5 µg/mL contra *L. major*.

A ação leishmanicida da BatroxLAAO sobre as espécies *L. braziliensis* e *L. major*, na maior concentração (32,0 µg/mL), foi de 98,0±0,8% e 100% dos parasitas, respectivamente. Em geral, todas as espécies responderam de forma considerável ao tratamento com BatroxLAAO (Figura 13). Esta diferente susceptibilidade de BatroxLAAO sobre os parasitas, como observado pelas EC₅₀, pode ser explicada pelos diferentes padrões em cada cepa ou espécie testadas (MEHLOTRA, 1996).

Já está bem estabelecido que as atividades das LAAOs de peçonhas de serpentes podem ser devido à produção de peróxido de hidrogênio (DU; CLEMETSON, 2002). Ciscotto et al. (2008) mostraram que a peçonha de *Bothrops jararaca* e HTP1 (LAAO purificada de *Bothrops jararaca*) apresentaram atividade leishmanicida contra *L. amazonensis*. Após incubação com a peçonha de *B. jararaca*, 69% da viabilidade celular foi observada, entretanto, após incubação com HTP1, a viabilidade caiu para 47,5%. Quando a catalase foi adicionada, o efeito da atividade leishmanicida provocado pela peçonha bruta e pela HTP1, foi abolido (CISCOTTO et al., 2008).

O efeito tóxico produzido pela BatroxLAAO foi praticamente abolido pela adição da catalase, sugerindo que a liberação de H₂O₂ está diretamente envolvida nos efeitos anti-parasitários promovidos pela enzima (Figura 13). Após o tratamento das espécies de *Leishmania* testadas com BatroxLAAO e catalase (0,5 µg/mL), observamos a sobrevivência das formas parasitárias.

Algumas LAAOs têm se mostrado bastante eficientes na ação bactericida frente às diversas bactérias existentes. A LAAO isolada do muco epidérmico de *Platichthys stellatus* foi altamente bactericida contra *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistentes à metaciclina (KASAI et al., 2010).

Da mesma forma que LAAO de outras serpentes, como *Crotalus durissus cascavella* (TOYAMA et al., 2006), *Bothrops alternatus* (STÁBELI et al., 2004), *B. pirajai* (IZIDORO et al., 2006), *B. moojeni* (STÁBELI et al., 2007), *Agkistrodon halys*

(ZHANG et al., 2004), *Vipera lebetina* (TONISMÄGI et al., 2006), *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES et al., 2009) e *Naja naja oxiana* (SAMEL et al., 2008), a BatroxLAAO apresentou atividade bactericida em bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) e Gram-negativas (*E. coli*). A LAAO de *Bothrops alternatus* apresentou efeito bactericida sobre as bactérias *E. coli* e *S. aureus* (STÁBELI et al., 2004). BatroxLAAO, nas mesmas concentrações e condições da LAAO de *Bothrops alternatus*, apresentou efeito em *S. aureus* mais eficiente nos primeiros 30 minutos na concentração de 24 µg, apresentando uma viabilidade de $60,22 \pm 1,89\%$ e, em uma hora de $43,46 \pm 2,21\%$ (Figura 14), enquanto que para a bactéria *E. coli* o resultado foi de forma dose-dependente, onde 24 µg de BatroxLAAO foi capaz de extinguir apenas 16,14% das bactérias e, após uma hora nessa mesma concentração, a viabilidade bacteriana foi de $64,42 \pm 3,07\%$ (Figura 14). Na concentração de 48 µg, a BatroxLAAO apresentou uma viabilidade bacteriana de 74,42% e 45,97% para *E. coli* e *S. aureus*, em 30 e 60 minutos, respectivamente (Figura 14).

A BatroxLAAO mostrou-se potencialmente ativa (Tabela 5) contra cepas de *Trypanosoma cruzi*, com uma EC_{50} de 53,31 µg/mL (Figura 15). As concentrações de BatroxLAAO foram consideradas estatisticamente significativas quando comparadas ao controle negativo e estatisticamente significativas quando comparadas entre as diferentes concentrações ($p < 0,05$).

Na literatura, são encontrados poucos estudos com o parasita *T. cruzi* e LAAOs de peçonhas de serpentes. As LAAOs de *B. moojeni* (BmooLAAO) e *B. jararacussu* (Bjussu LAAO) induziram morte do parasita de forma dose-dependente, sendo que este efeito foi inibido com a adição de catalase (França et al., 2007). Em geral, as LAAOs de peçonhas de serpentes compartilham regiões de alta homologia seqüencial, o que implica na semelhança de resultados obtidos por essas diferentes LAAOs frente à atividade tripanomicida.

A ação das enzimas L-aminoácido oxidase em processos com fungos e leveduras foi relatada por Ande e colaboradores (2008) com a L-aminoácido oxidase de *Calloselasma rhodostoma* que possui atividade em cepas isogênicas de *S. cerevisiae*. Yang e colaboradores (2005) relataram atividades de *escapin*, LAAO de anêmona marinha (*Aplysia californica*) em leveduras *Candida krusei* e *Saccharomyces cerevisiae* BY4761 em concentração inibitória mínima de $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e em fungo *Cladosporium sphaerospermum*, em meio SD com $0,8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de lisina

e em meio com $4,9 \text{ mmol.L}^{-1}$ de lisina, apresentou um MIC de 62 e $15 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. BatroxLAAO apresentou MIC de $37,5 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ em experimentos com *Candida albicans*, inibindo 100% do crescimento da levedura (Tabela 6).

A iniciativa da produção de anticorpos monoclonais anti-BatroxLAAO para a verificação da possibilidade de um receptor ligante e local da ligação, foi de difícil finalização devido à alta reatividade imunológica apresentada pelas diversas LAAOs de serpentes.

A reatividade cruzada imunológica das peçonhas de serpentes é mediada por anticorpos que reconhecem essas peçonhas em suas seqüências homólogas de aminoácidos ou pela similaridade das funções biológicas. Entretanto, o anti-soro poliespecífico do gênero *Bothrops* é uma fonte de anticorpos com reatividade cruzada que interagem com proteínas de peçonhas de estruturas primárias e funções biológicas distintas (STÁBELI et al., 2005).

A especificidade de determinados anticorpos isolados de anti-peçonhas comerciais indica que a reatividade cruzada das peçonhas de serpentes é mediada, pelo menos em parte, por anticorpos capazes de reconhecer estrutural e funcionalmente proteínas não relatadas (STÁBELI et al., 2005)

Em geral, as peçonhas de serpentes, já relatadas, tendem a ter antígenos comuns (BERGER; BHATTI, 1989; MENEZ, 1991; MINTON, 1979) e esta é a base da atividade de neutralização cruzada de alguns anti-soros, bem como fontes de ambiguidade no imunodiagnóstico das mordidas de serpentes (TAN; PONNUDURAI, 1994). Este fato torna-se interessante para a investigação da relação antigênica das proteínas das peçonhas de serpentes. Estas informações podem contribuir para o tratamento do envenenamento bem como fornecer informações de diferenças e similaridades entre as estruturas das proteínas das peçonhas de serpentes (TAN; PONNUDURAI, 1994).

As propriedades imunológicas e a reatividade cruzada da L-aminoácido oxidase da peçonha de *Ophiophagus hannah* (OH-LAAO) foram analisadas por Tan et al. (1993). Os anticorpos anti-OH-LAAO demonstraram reatividade cruzada com várias outras peçonhas de outras espécies: *B. candidus*, *B. fasciatus*, *N. kaouthia*, *T. purpureomaculatus* e *H. stephensii*. Foi, também, notável o dado que anti-OH-LAAO demonstrou de 5 a 10% de rendimento na reatividade cruzada realizada pelo método indireto de ELISA com outros componentes da peçonha de *O. hannah* como

a neurotoxina (OH-NTX), a fosfolipase A₂ (OH-PLA₂) e a hemorragina (OH-HMG) (TAN et al., 1993).

A reatividade cruzada antigênica da L-aminoácido oxidase da peçonha de *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO), determinada pelo método indireto de ELISA, foi demonstrada contra as peçonhas das famílias Crotalidae e Elapidae. Este fato pode ocorrer devido a todas essas peçonhas exibirem considerável atividade L-aminoácido oxidase (TAN, 1992) e as L-aminoácido oxidases de diferentes peçonhas de serpentes podem, presumidamente, exibir características antigênicas similares. Entretanto, algumas dessas reações cruzadas também podem derivar de reações entre o anti-CR-LAAO e proteínas não relatadas que compartilham epítomos comuns com *C. rhodostoma* (TAN; PONNUDURAI, 1994).

Estas investigações de reatividade cruzada de componentes purificados das peçonhas de *O. hannah* e *C. rhodostoma* usando anticorpos toxina-específicos claramente demonstram que as proteínas funcionalmente independentes compartilham epítomos comuns (TAN et al., 1993; TAN; PONNUDURAI, 1994; STÁBELI et al., 2005).

A reatividade cruzada, também observada em anticorpos monoclonais, representa um problema fundamental de numerosas investigações com o objetivo de melhorar a produção de anticorpos e outros reagentes para o tratamento de acidentes ofídicos (MINTON, 1979; CHINONAVANIG et al., 1988). Os anticorpos monoclonais são imunoglobulinas homogêneas com especificidade definida, possíveis de produzir em largas quantidades. Podem ser obtidas por imortalização de linfócitos B, clonados e expandidos em culturas celulares contínuas (ABBAS; LICHTMAN, 2005). A existência de anticorpos diferentes para um mesmo agente patogênico torna a resposta pouco eficiente, sendo os anticorpos monoclonais os mais eficientes. Devido a isto, na pesquisa de diagnósticos e terapêuticas eficazes contra certas doenças, utilizam-se preferencialmente anticorpos monoclonais.

O procedimento de hiperimunização de camundongos com BatroxLAAO promoveu a produção de soros-ímmes contendo altos níveis de IgG para essa L-aminoácido oxidase. A análise da reatividade de anti-BatroxLAAO foi avaliada em soro pré-ímmune, não apresentando nenhuma reatividade no mesmo. A reatividade do anticorpo apresentou-se positiva a partir da diluição de 1:500 com uma absorbância (nm) de $1,76 \pm 0,05$ e apresentou reatividade positiva até a diluição 1:60000 com absorbância (nm) de $0,35 \pm 0,21$ (Figura 16). Esses dados atestam o bom

procedimento realizado, por nosso grupo de estudo, para a obtenção dos soros imunes.

Além da IgG anti-BatroxLAAO reconhecer esta L-aminoácido (LAAO de *Bothrops atrox*) pelo método de ELISA, este anticorpo foi também capaz de interagir com outras peçonhas botrópicas: *Bothrops jararaca* e *Bothrops jararacussu* de forma que as absorbâncias (nm) obtidas para as peçonhas de *Bothrops jararaca* e *B. jararacussu* foram $0,53 \pm 0,0$ e $0,52 \pm 0,0$, respectivamente. De forma surpreendente, a peçonha de *Bothrops atrox* revelou absorbância de $0,49 \pm 0,04$. Esta elevada atividade do anticorpo anti-BatroxLAAO nas diferentes peçonhas botrópicas pode ser explicada pela alta reatividade cruzada da enzima em função da presença de grandes concentrações de L-aminoácido oxidases nas peçonhas testadas.

Para avaliar de forma mais específica a atividade do anticorpo anti-BatroxLAAO, foram avaliadas as L-aminoácido oxidases provenientes das peçonhas de *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu* (isoladas e caracterizadas em nosso Laboratório de Toxinologia, FCFRP-USP) e *Bothrops moojeni* e, para tais experimentos, os valores obtidos após a reação de ELISA e leitura em 405 nm foram de $0,31 \pm 0,0$; $0,56 \pm 0,01$ e $0,27 \pm 0,0$, respectivamente (Figura 17). O anticorpo anti-BatroxLAAO demonstrou uma absorção (nm) de $0,63 \pm 0,01$. A reatividade apresentada pelas LAAOs de peçonhas de serpentes contra o anticorpo anti-BatroxLAAO pode estar relacionada à alta homologia química dessas enzimas. Alves et al. (2008) apresentaram a caracterização bioquímica e funcional da L-aminoácido oxidase de *Bothrops atrox* e relataram a alta homologia desta enzima com as LAAOs de *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararaca*, previamente caracterizadas. De acordo com Tan e Ponnudurai (1994) a ligação de outras enzimas L-aminoácido oxidases em um anticorpo específico e a reatividade cruzada apresentada pode estar relacionada, também, com as características antigênicas similares entre as LAAOs e o compartilhamento de epítopos comuns.

De forma geral, os anticorpos monoclonais são dirigidos para simples epítopos dos antígenos e apresentam alta especificidade em termos de sua baixa reatividade cruzada com outros antígenos. Ocasionalmente, porém, pode ocorrer uma combinação a antígenos que venham a reagir pobremente, ou não, na presença de um anti-soro específico porque este geralmente contém um grupo de diferentes anticorpos que reagem com uma certa “área” da superfície do antígeno. O anti-soro define a forma geral da área deste grupo de anticorpos, enquanto que um

anticorpo monoclonal reage com um epítopo que pode ser apenas parte da “área”, e esta região menor pode apresentar bastante semelhança com a superfície do outro antígeno permitindo ao anticorpo monoclonal se combinar. A fixação inapropriada com um anticorpo monoclonal pode ocorrer porque somente parte das regiões hipervariáveis pode estar envolvida na região com o antígeno original, deixando a possibilidade de afinidade adventícia para um antígeno não relacionado através de outras partes do sítio combinatório (ROITT, 1999).

A obtenção de anticorpos monoclonais é de elevada importância pela valiosa aplicação que os mesmos oferecem na identificação de marcadores fenotípicos característicos de determinados tipos celulares, imunodiagnóstico, diagnóstico de tumores e terapias, além da análise funcional de moléculas de superfície e secretada. No entanto, com a elevada reatividade cruzada do anticorpo anti-BatroxLAAO com outras L-aminoácido oxidases de outras peçonhas de serpentes, os trabalhos e experimentos para o desenvolvimento de um anticorpo contra um epítopo específico e com a imensa vantagem da alta especificidade não poderá ser alcançada.

A fim de obter informações sobre o tamanho e a quantidade relativa da proteína foram realizados testes experimentais como a técnica de *Western blotting*. A posição do antígeno na membrana foi detectada pelo acoplamento de um anticorpo marcado, fornecendo assim, informações sobre o tamanho e a quantidade do antígeno (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

O passo inicial para o procedimento de *Western Blotting* é a separação das moléculas usando gel de eletroforese (SDS-PAGE). Após a eletroforese, as moléculas são transferidas para uma segunda matriz, geralmente membrana de nitrocelulose ou PVDF (*polyvinylidene fluoride*). Em seqüência, a membrana é bloqueada a fim de prevenir qualquer ligante de anticorpo não específico na superfície da membrana. A proteína transferida é complexada com um anticorpo. Um substrato apropriado é então adicionado a enzima e, juntos (antígeno e anticorpo), produzem um produto detectável como precipitados cromogênicos ou fluorogênicos na membrana para a detecção colorimétrica ou fluorimétrica, respectivamente. O método de detecção mais sensível utiliza um substrato quimioluminescente que, quando combinado com a enzima, produz luz como produto. A luz produzida pode ser capturada usando um filme fotográfico que é reconhecido pela detecção de quimioluminescência. Quaisquer que sejam os

substratos utilizados, a intensidade do sinal está relacionada à quantidade de antígeno na membrana do *blotting* (GERSHONI; PALADE, 1983).

A Figura 18 nos mostra inicialmente a reação somente com o anticorpo primário (A) e somente com o anticorpo secundário (B), não havendo nenhuma banda característica para tais anticorpos devido à ausência de antígeno para a ligação dos anticorpos. Quando os anticorpos, primário e secundário, foram acoplados ao antígeno, obtivemos uma banda na posição de 67 kDa característica da proteína L-aminoacido oxidase da peçonha de *Bothrops atrox* (Figura 18 C).

A literatura já relatou que o processo de apoptose é induzido por LAAO de várias espécies de serpentes (SUHR; KIM, 1996; TORII; NAITO; TSURUO, 1997; SOUZA et al., 1999; ABE et al., 1998; ALI et al., 2000; ZHANG et al., 2004; ALVES et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009; WEI et al., 2009).

Várias são as especulações da razão para tal atividade apoptótica das LAAOs. Alguns estudos mostram a indução de apoptose por LAAOs envolvidas nas vias das caspases (ALVES et al., 2008). O mecanismo da LAAO na atividade apoptótica é ainda pouco conhecido, de forma que as atribuições são referentes ao H_2O_2 , caspases ou ainda devido à interação com algum receptor de membrana (SUHR; KIM, 1996; DU; CLEMETSON, 2002; ANDE et al., 2006).

BatroxLAAO promoveu efeito citotóxico sobre a linhagem tumoral JURKAT (Leucemia de Células T) apresentando $33,05 \pm 2,03\%$ de viabilidade celular na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Já na linhagem celular B16F10 (Melanoma Murino) na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, BatroxLAAO apresentou viabilidade de $53,67 \pm 1,28\%$. Com o aumento da concentração da proteína a viabilidade celular diminuiu, atingindo apenas $28,32 \pm 2,03\%$ e $18,19 \pm 2,54\%$ para 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A linhagem celular PC12 (Célula Tumoral - feocromocitoma de glândula adrenal de rato) apresentou um efeito dose-dependente onde 100 $\mu\text{g/mL}$ de BatroxLAAO atingiu $30,85 \pm 2,15\%$ da viabilidade celular (Figura 19). Em comparação com as linhagens tumorais testadas, a linhagem PBMC nas menores concentrações (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$), apresentou uma viabilidade de $80,65 \pm 0,28\%$ e $68,37 \pm 2,1\%$, respectivamente. Com o aumento da concentração de BatroxLAAO a viabilidade dessas células permanecia em torno de 55,53%, sendo que para 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, a viabilidade celular era de $51,78 \pm 2,03$ e $60,39 \pm 1,23\%$ (Figura 19). Quando realizado o tratamento das linhagens celulares acima citadas com catalase e BatroxLAAO, não foi observada morte celular significativa por necrose ou apoptose

(Figura 19). Na presença de catalase, que efetivamente produz H_2O_2 , uma interrupção na morte celular foi observada. Em geral, as células mantiveram-se sem alterações, considerando, portanto, a liberação de H_2O_2 como possível meio de ação das LAAOs.

Para complementar o estudo de indução de apoptose por BatroxLAAO, foram realizados experimentos por citometria de fluxo, nos quais a capacidade de indução de apoptose dessa enzima foi analisada pela marcação por anexina V em diferentes linhagens celulares. A análise por citometria de fluxo é uma técnica complementar aos ensaios de MTT e análise morfológica, que possibilita a avaliação apoptótica das células submetidas ao tratamento com proteínas e/ou substâncias biologicamente ativas. Trata-se de um método mais sensível na detecção da célula patológica. Esta detecção repousa essencialmente sobre a medição de um conteúdo anormal de DNA no núcleo da célula tumoral.

Para o tratamento das células JURKAT com BatroxLAAO, os resultados mostraram que essa proteína induz morte celular por necrose nessa linhagem, sendo que 10 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$ de BatroxLAAO foi capaz de induzir apenas $0,66 \pm 0,3\%$ e $0,53 \pm 0,1\%$ de morte celular por apoptose. Nessas mesmas concentrações de proteína, a porcentagem de células necróticas apresentadas foi de $14,34 \pm 0,85\%$ e $18,31 \pm 0,82\%$ (Figura 20).

Esses dados corroboram com um estudo de LAAO de *Calloselasma rhodostoma* em células JURKAT, onde essa proteína revelou morte por necrose nessa linhagem (ANDE; KOMMOJU et al., 2006). Esses dados podem ser consequência da exposição dos elevados níveis de H_2O_2 , pois já está bem estabelecido que abaixo de condições de severo estresse oxidativo, a integridade mitocondrial é comprometida, permitindo a abertura do poro de transição da permeabilidade, sobrecarga do cálcio mitocondrial, perda do potencial de membrana e o colapso do metabolismo de energia celular resultando em lise da célula (ANDE et al., 2006).

As linhagens PBMC, após tratamento com BatroxLAAO, não apresentaram apoptose, mesmo nas menores concentrações experimentais. No entanto, o índice de células necróticas após o tratamento com LAAO nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ foi de $34,1 \pm 2,27\%$ e $36,7 \pm 9,5\%$, respectivamente (Figura 23).

Das linhagens testadas, as células animais foram as que demonstraram melhores resultados referentes ao índice apoptótico. No tratamento das células

B16F10 com 25 µg/mL e 50 µg/mL de BatroxLAAO foi demonstrado morte por apoptose em $51,8 \pm 1,55\%$ e $61,5 \pm 2,49\%$ das células, respectivamente. Essas células apresentaram baixo índice de necrose quando comparadas ao controle negativo nas mesmas concentrações. Já para o tratamento das células PC12 com BatroxLAAO nas menores concentrações (5 µg/mL e 10 µg/mL) foi observado $25,8 \pm 2,4\%$ e $16,4 \pm 1,2\%$ de morte por apoptose, respectivamente.

Células de glioma de ratos (C6) foram tratadas com L-aminoácido de *Trimeresurus flavoviridis*, OHAP-1, e esta demonstrou inibição no crescimento desse glioma após tratamento com IC_{50} de aproximadamente $2,48 \pm 0,26\%$ µg/mL. Após o tratamento com OHAP-1 concomitante com catalase e glutathione (2,5; 5 e 10 µg/mL), o efeito inibitório no crescimento das células por OHAP-1 foi significativamente reverso (SUN et al., 2003).

Em outro estudo realizado com a L-aminoácido oxidase de serpente coreana, Suhr e Kim (1996) verificaram ação apoptótica dessa proteína em células animais (L1210), analisando quantitativamente a fragmentação de DNA das células após tratamento com a proteína. Após 24 horas de tratamento foram observadas mortes por necrose, e isto pode estar relacionado às quantidades de H_2O_2 liberadas na reação enzimática. Em seguida, realizaram o tratamento desta LAO concomitante com catalase e a viabilidade não foi completamente recuperada, em torno de 70%, indicando que a atuação apoptótica de LAO não é completamente explicada pelo efeito de H_2O_2 gerado pela reação enzimática em meio de cultura (SUHR; KIM, 1996).

São escassos os estudos que descrevem a ação apoptótica de LAAOs por citometria de fluxo. Em geral, testes com essa técnica têm sido realizados na detecção do ciclo celular, que permite o acompanhamento da distribuição das células, nas diferentes fases do ciclo, em função dos estímulos recebidos por essas proteínas.

BF-LAAO, uma LAAO de *Bungarus fasciatus* exibiu efeito citotóxico em células de carcinoma alveolar basal humano (A549) e causou aproximadamente 41,2% de apoptose nessas células após período de incubação de 12 horas (WEI et al., 2009).

Sun et al. (2003) observaram que OHAP-1, uma LAAO de *Trimeresurus flavoviridis*, apresentou efeito apoptótico em células de glioma humano RBR 17T, U251 e C6 de ratos. Este efeito, segundo os autores, poderia ser mediado pela

promoção de geração de ROS intracelular e expressão da proteína p53 em células de glioma, sugerindo OHAP-1 como um potencial candidato a terapia clínica antitumoral.

De forma a elucidar a atividade da BatroxLAAO, Alves et al. (2008) realizaram ensaios sobre a atividade das caspases 3 e 9 e observaram uma redução na viabilidade celular causada pela BatroxLAAO ilustrada pelo aumento da atividade das caspases-3 e 9, indicando a ocorrência de apoptose. Os autores sugerem que, desta forma, a LAAO não teria somente a sua via de ação pela geração de H_2O_2 , mas também pela via extrínseca de indução de apoptose, ou seja, via receptor Fas-L e pela via intrínseca de indução de apoptose, ou seja, via mitocondrial.

A fim de complementar os efeitos apoptóticos provocados pela enzima BatroxLAAO, realizamos a atividade apoptótica dessa enzima sobre a linhagem celular tumoral HL-60 e sobre as células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Ao visualizarmos a atividade apoptótica de BatroxLAAO principalmente sobre as células tumorais, realizamos experimentos para observar a atuação da BatroxLAAO no ciclo celular.

As Figuras (24 A e B) representam os resultados iniciais do tratamento de BatroxLAAO sobre as células tumorais HL-60 e células mononucleares do sangue periférico (PBMC), respectivamente. Nas condições experimentais testadas, a linhagem normal, PBMC, tratada com BatroxLAAO (50 $\mu\text{g/mL}$), apresentou viabilidade celular de aproximadamente 72%, considerando um valor relevante de sobrevivência das células normais, não havendo aumento significativo no número de morte por apoptose e necrose (Figura 24 B). No entanto, quando tratamos as culturas da linhagem HL-60 com BatroxLAAO (50 $\mu\text{g/mL}$), foi possível observar morte por apoptose em $28,6 \pm 3,46\%$ das células e houve aumento significativo no número de morte por necrose (Figura 24 B).

Para investigar a possível indução de apoptose na linhagem HL-60 frente ao tratamento com BatroxLAAO, foi realizado o ensaio para detecção de células apoptóticas utilizando três corantes fluorescentes (Iodeto de propídeo/DAF/Hoescht) (Figura 25). Foi possível observar uma frequência significativa de células apoptóticas quando as células foram submetidas ao tratamento com BatroxLAAO.

A perturbação no ciclo é um pré-requisito para a indução de apoptose (HICKMAN, 1992). Como mostrado anteriormente, as células tratadas com LAAO aumentam a porcentagem de células apoptóticas concomitantemente com o

aumento da proporção de células na fase sub-G1. Esta modulação da cinética do ciclo, provocando um atraso na fase G1, funcionaria como um mecanismo antiproliferativo.

O ciclo celular é rigorosamente regulado e esta maquinaria trabalha em harmonia com a morte celular programada a fim de manter o equilíbrio entre proliferação celular e da morte, denominada homeostase. Um desequilíbrio na cinética do ciclo celular é atribuído ao desenvolvimento de muitas doenças humanas, em particular, a transformação tumoral (HSIEH et al., 2008).

A proliferação celular descontrolada é uma marca de todos os tipos de câncer, e o bloqueio do ciclo celular é reconhecido como uma estratégia efetiva no desenvolvimento de terapias antitumorais (BUOLAMWINI, 2000; MCDONALD; EL-DEIRY, 2000; OWA et al., 2001).

O efeito do polissacarídeo *Lycium barbarum* (LBP) sobre as células do câncer de colo retal (SW480) foi avaliada pela primeira vez. Neste estudo, LBP inibiu significativamente o crescimento de SW480 nas concentrações de 400 a 1,000 mg/L, além de ter induzido um atraso no ciclo celular na fase G0/G1 indicando que, proteínas com essas características podem ser um potencial candidato à agente terapêutico antitumoral (MAO et al., 2010).

De forma semelhante, BatroxLAAO (50 µg/mL) induziu atraso na fase G0/G1 do ciclo celular em células HL-60. Para todas as concentrações testadas o aumento de células na fase G0/G1 se destacou, quando comparado às demais fases do ciclo (S e G2/M), podendo esta ser muito acentuada na maior concentração (50 µg/mL), indicando uma diferença de 46% em relação à porcentagem em S e 59% em relação a G2/M (Figura 26).

A literatura relata que nas células há vários “checkpoints”, ou seja, mecanismos de sinalização que coordenam o reparo do DNA com o metabolismo cromossômico e transições no ciclo celular, detectando a presença de diversos danos e reparando-os quando possível (BRANZEI; FOIANI, 2008). Durante a progressão do ciclo celular, o atraso em G1 permite que as células com DNA danificado passem por mecanismos de reparo ou sigam pela via apoptótica. Se o dano é muito severo, a célula é encaminhada para apoptose logo no primeiro checkpoint (G1/S) (EASTMAN, 2004).

Chen et al. (2008) relataram um aumento de células na fase sub-G1 quando estudaram a ação do ergocalciferol na linhagem celular HL-60. O estudo demonstrou

que o ergocalciferol inibia o crescimento de células leucêmicas de uma maneira dose-dependente. Estes ensaios revelaram ainda que o ergocalciferol induziu fragmentação do DNA, sendo ambos os eventos indicativos de apoptose.

Estudos realizados por Yan et al. (2006) demonstraram os efeitos de boemerasina isolada de *Boehmeria siamensis* Craib (Urticaceae) em células de câncer de mama (MDA-MB-231). Ensaios de proliferação e de citometria de fluxo (FACS) mostraram que a inibição de crescimento e a interrupção do ciclo na fase G1 eram causadas pela boemerasina. Uma citotoxicidade de 100% foi observada na concentração de 0,007 µg/mL. Quando as células foram expostas à 0,007 µg/ml de boemerasina A por 12 hs, a porcentagem de células na fase G1 aumentou de 44,8% sem tratamento para 66,3%. Consistentemente com a interrupção do ciclo em G1 e a inibição do crescimento celular, a expressão do RNA mensageiro das ciclinas E2 e D1 na célula foi regulada negativamente com o tratamento.

Durante a progressão do ciclo celular, o atraso em G1 permite que as células com DNA danificado passem por mecanismos de reparo ou sigam pela via apoptótica. Na maioria das malignidades em estado avançado, as células cancerosas tornam-se resistentes a apoptose e não respondem aos efeitos citotóxicos da maioria dos agentes quimioterápicos amplamente utilizados (MOLINARI, 2000). Assim, o desenvolvimento de compostos que induzem apoptose em células HL-60 poderiam indicar uma estratégia quimioterápica (PARK et al., 2008).

A Citotoxina III (CTX III) isolada da peçonha de *Naja naja atra* demonstrou elevada inibição da proliferação celular em células de carcinoma hepático (HepG2). A porcentagem de células apoptóticas foi associada, por citometria de fluxo, ao atraso na fase S do ciclo celular. A análise de PCR em tempo real e *Western blot* revelou que ciclina D1, ciclina A e ciclina E, que estão envolvidas na apoptose e progressão do ciclo celular estavam “down” reguladas. Além desses dados, a alteração na razão *BCL-2/BAX* e indução de caspase-8 e 9 contribuem para afirmar a indução de apoptose de CTX III em HepG2 (CHEN et al., 2009)

Em nosso trabalho fica evidente a modulação da cinética do ciclo celular e a indução de apoptose nas células da linhagem HL-60 frente ao tratamento com a LAAO da peçonha de *Bothrops atrox* (Figura 26). Desta forma, os resultados obtidos têm muito a acrescentar no tocante à elucidação das vias de ação destas toxinas no

organismo humano e desta forma, contribuindo com o possível desenvolvimento de fármacos de ação mais eficaz e direcionada contra diversas doenças como o câncer.

A apoptose é um processo programado de morte celular requerido para a manutenção da homeostase sob condições fisiológicas e pela resposta a vários estímulos internos e externos (SUN, 2006). As células acometidas por apoptose são caracterizadas pelo inchaço de membrana, redução citoplasmática, condensação da cromatina e fragmentação do DNA (WYLLIE, 1980). O câncer está associado com uma diminuição do processo apoptótico e o desenvolvimento de células resistentes a apoptose é um fator que contribui significativamente para a falha das terapias em câncer (SUN, 2006). Portanto, a indução de apoptose em células cancerígenas resistentes a apoptose, seria uma estratégia ideal para a terapia de câncer (REED, 2003; NGUYEN; WELLS, 2003). Um dos acessos promissores para alcançar esta estratégia é por meio da modulação de *p53* ou dos componentes da via de sinalização de *p53* (SUN, 2006).

A função biológica da *p53* é, principalmente, a mediação da regulação transcricional de seus alvos genéticos. Como uma chave reguladora do crescimento e morte celular, a *p53* é ativada por vários estímulos ambientais, inclusive por agentes de dano ao DNA. A *p53* ativada age como “guardiã do genoma” pela indução no atraso do crescimento celular para permitir que as células reparem um dano ou gerem apoptose, caso o dano seja muito severo e irreparável (GIACCIA; KASTAN, 1998). Portanto, não surpreendentemente, *p53* é freqüentemente inativada via múltiplos mecanismos durante a carcinogênese. O mecanismo mais comum da inativação de *p53* é a mutação no gene, que ocorre em mais de 50% de todos os cânceres humanos (SUN, 2006).

Como as funções moleculares de *p53* têm sido elucidadas, tem-se tornado claro que *p53* é um freqüente alvo de inativação dos processos de carcinogênese devido a sua ação central (Figura 39) na regulação de proliferação celular e apoptose (HAVRILESKY, et al., 2001).

Figura 39. Vias de sinalização de p53 para atraso no ciclo celular e apoptose: sob condições não acentuadas de estresse, os níveis de p53 estão muito baixos nas células devido a degradação e ligação de MDM2. Em condições com danos no DNA (radiação/ drogas anti-câncer), a ligação MDM2-p53 é dissociada e resulta na fosforilação de p53 pela ATM e acetilação por p300/pCAF, permitindo a ativação de p53. A p53 ativada age como um fator transcricional para transativar genes regulatórios de crescimento como *p21* e *14-3-3σ* para induzir um atraso no ciclo celular. p53 regula mecanismo de indução de apoptose de maneira transcricional dependente pela transativação de genes da via mitocondrial e via receptor de morte, além de reprimir os genes de sobrevivência como *IGFR* e *BCL-2*. De maneira transcricional independente, p53 liga-se a mitocôndria e modula atividade de BH-3 contendo proteínas apoptóticas. (Adaptado de SUN, 2006).

Meng et al. (2004) mostraram que o composto SO_2 e seus derivados causam estresse oxidativo e dano ao DNA de vários órgãos de ratos. É possível que o estresse oxidativo ativa a expressão de genes iniciais imediatos e permite um dano no DNA (WEBSTER et al., 1994; OZOLINS; HALES, 1997; YAMAZA, et al., 2004). Quando ocorre dano no DNA, a expressão de p53 é aumentada (DORSZEWSKA; ADAMEZ, 2004).

Bai e Meng (2009) demonstraram que a expressão de p53 foi reforçada no pulmão após exposição de SO_2 , sugerindo que SO_2 deve induzir estresse oxidativo e ativar genes iniciais imediatos (*c-fos*, *c-jun*, *c-myc*) e então leva ao dano no DNA e, consequentemente, aumenta a expressão de p53. Estudos prévios demonstram que

o estresse oxidativo por SO_2 pode alterar a expressão de genes reguladores de apoptose como *BAX*, *BCL-2* e *p53*, além de induzir apoptose em ratos por via de receptor de morte e via mitocondrial (BAI; MENG, 2005 a, b).

Apoptose induzida por *p53* é mediada pela ativação de genes envolvidos nas duas maiores vias apoptóticas: 1) a via mitocondrial, com os genes *BAX*, *NOXA*, *PUMA*, *p53A1P1*, *PIGs* e *APAF-1*; 2) a via de receptores de morte, com os genes *KILLER/DR5*, *FAS* e *PIDD* (SUN, 2006). A Figura 39 ilustra a via de sinalização de *p53* na regulação do atraso no crescimento celular e apoptose.

Muitas proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas como *BAX* e *BCL-2*, regulam apoptose por meio da mitocôndria e suas interações com a membrana mitocondrial (JUN-YING; CUN-SHUAN, 2009).

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

Mousavi et al. (2009) demonstraram que Açafrão, *Crocus sativus*, utilizado em especiarias culinárias no Oriente Médio, induziu apoptose em células MCF-7 e revelou expressão de *BAX*, confirmando a via mitocondrial envolvida na apoptose induzida por *saffron* em células MCF-7.

Jun-Ying e Cun-Shuan (2009) demonstraram que os compostos de Selênio induziram colapso do potencial de membrana mitocondrial e aumento nos níveis de citocromo *C*. Essa transição na permeabilidade mitocondrial induzida por composto de Selênio pode provocar a liberação do citocromo *C* (SHILO et al., 2003). Ainda neste estudo, foram analisadas as expressões de *BCL-2* e *BAX*, sendo que *BCL-2* foi significativamente inibida pelos compostos de Selênio e a expressão de *BAX* foi aumentada, revelando o papel apoptótico desses compostos (JUN-YING; CUN-CHUAN, 2009).

Um análogo de amonafida, derivado de naftalimida ($\text{M}_2\text{-A}$), é um potente agente anticâncer. $\text{M}_2\text{-A}$ induziu atraso no ciclo celular na fase G2/M e inibiu a proliferação de células HeLa, HL60, MCF-7, dentre outras (WANG, et al., 2009).

Wang e colaboradores (2009) demonstraram que M₂-A apresentou elevada expressão de *BAX* e baixa expressão de *BCL-2*, sugerindo que o aumento da razão *BAX/BCL-2* deve estar envolvida com a apoptose induzida por M₂-A.

A expressão de genes pró e anti-apoptóticos não revelou resultados como esperávamos, gerando dados, até o momento, inconclusivos. Uma possível solução para confirmação desses dados seria a realização de imunofenotipagem em todos os tratamentos realizados com as diferentes linhagens tumorais e a proteína BatroxLAAO, a fim de verificar se a ação que observamos é, de fato, desencadeada pela própria BatroxLAAO ou se existe algum outro estímulo responsável pelo sinergismo ou antagonismo que possam interferir nos resultados obtidos. Outro fato que favoreceu a não conclusão dos resultados foi a diferença de resposta observada em cada grupo de animais, sendo que, muitas vezes, em um único grupo, a diferença de resposta entre os animais sob um mesmo estímulo foi muito evidente, dificultando, portanto, a afirmação e conclusão da ação da proteína BatroxLAAO.

Os resultados apresentados nas Figuras 29, 30 e 31 nos permitem afirmar que BatroxLAAO não induz o aumento da expressão de genes anti-apoptóticos como *bcl-2*, após os tratamentos realizados, *in vivo*. Em geral, podemos observar um pequeno aumento nos tratamentos realizados com a proteína em animais que receberam a indução tumoral, no entanto, esse leve aumento não apresenta uma alteração estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quando comparamos aos valores do controle negativo.

BatroxLAAO demonstrou ter maior ação sobre os órgãos, principalmente baços de animais inoculados com células tumorais B16F10, onde verificamos na Figura 32 A, o aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na expressão do gene *BAX* após o tratamento simultâneo e tardio com a proteína BatroxLAAO. Com esses dados podemos afirmar que a BatroxLAAO responde diferentemente aos diversos tipos celulares. Esta característica difere do que foi demonstrado pela LAAO de *Trimeresurus flavoridis*, que apresentou efeito apoptótico em células de glioma humano e de ratos (SUN et al., 2003). Os mecanismos das LAAOs na atividade apoptótica são ainda pouco conhecidos, de forma que as atribuições são referentes ao H₂O₂, caspases ou ainda devido à interação com algum receptor de membrana (SUHR; KIM, 1996).

Tal suposição pode ser amparada pela detecção das proteínas pró-apoptóticas pela metodologia de *Western blotting* (Figura 38). Semelhantemente à

BatroxLAAO, o perfil apoptótico do açafrão em células MCF-7 foi confirmado pelo aumento da expressão do gene *BAX* seguido da análise por *Western blotting* (MOUSAVI et al., 2009). ACTX-8, uma proteína isolada de *Agkistrodon acutus* apresentou apoptose (em células HeLa) mediada pela via mitocondrial, com translocação de *BAX* e *BAD* do citosol para a mitocôndria (Zhang et al., 2007).

As Figuras 35, 36 e 37, demonstram a ação da proteína BatroxLAAO na indução da expressão do gene *FAS*. Verificamos que os valores para os tratamentos somente com a proteína são semelhantes em todos os perfis e, ainda, ocorre um leve aumento da expressão desse gene quando BatroxLAAO é inoculada em animais previamente submetidos à indução tumoral. No entanto, esse aumento observado não é estatisticamente significativo ($p > 0,05$) quando comparado aos valores do controle.

Com esses dados relativos à expressão do gene *BAX* em órgãos (principalmente baços) de animais inoculados com as células B16F10 seguidos do tratamento com a proteína BatroxLAAO, podemos supor que BatroxLAAO é uma proteína que promove apoptose, preferencialmente pela via mitocondrial. Em contrapartida, os dados de expressão dos genes *BCL2* e *FAS*, após tratamento com células tumorais e a BatroxLAAO, apresentaram baixa ação desta proteína.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

1) Quanto ao aspecto estrutural:

A cristalização da BatroxLAAO foi realizada sob a condição de 0,05 M de sulfato heptahidratado de zinco, 15% (v/v) de Polietilenoglicol monometil éter 550, controle de pH 5 com 0,1M de cacodilato de sódio e proteína BatroxLAAO a 6 mg/mL. A utilização de parafina e silicone apresentou melhora dos cristais, revelando-os únicos e de coloração amarela, característicos da enzima, permitindo, portanto, melhor crescimento e difração desses cristais a 2,3 Å. Com essa resolução estrutural e dados mais refinados, foi possível determinar a estrutura terciária da BatroxLAAO. A proteína apresenta sequências de resíduos de aminoácidos altamente conservados, comparados às outras LAAOs já descritas, indicando os possíveis sítios de ação desta proteína, bem como a possível localização de ligação ao cofator FAD, que é essencial para a atividade da proteína e os possíveis locais da liberação de H₂O₂ que é um dos responsáveis pela ação tóxica da proteína durante a reação catalítica.

A alta similaridade estrutural da BatroxLAAO com as demais LAAOs descritas, principalmente com a de *A. h. pallas* (ZHANG et al., 2004) sugere que as LAAOs, em geral, apresentam semelhantes mecanismos catalíticos. Entretanto, apresentam também distintas estereoespecificidade, o que as tornam, cada uma, singular em suas respostas às atividades específicas. BatroxLAAO apresentou conservação do resíduo Arg322, o que pode ser responsável pela interação hidrofóbica com substratos.

Por fim, BatroxLAAO apresenta três domínios estruturais: 1) domínio ligante de substrato; 2) domínio ligante de FAD e 3) domínio helicoidal. O domínio ligante da FAD pode estar situado próximo aos aminoácidos N85 e L86. Todos esses dados estruturais favorecem o entendimento do mecanismo de ação desta proteína na atividade tóxica que a mesma exerce.

2) Quanto ao potencial biotecnológico:

BatroxLAAO apresentou elevada ação leishmanicida em *L. braziliensis*, *L. major* e *L. donovani*. Sendo que *L. major* e *L. donovani* foram as mais sensíveis à ação da BatroxLAAO. Esses dados corroboram com os dados já apresentados na literatura, onde diferentes LAAOs botrópicas apresentam elevada toxicidade sobre

diferentes espécies de *Leishmania*. No entanto, é válido ressaltar que a BatroxLAAO exerceu de forma particular sua atividade sobre as formas promastigotas testadas, de forma que a toxicidade sobre *L. braziliensis* foi demasiadamente baixa quando comparada às outras. Diante deste dado, reitera-se a distinta estereoespecificidade destas proteínas frente às atividades específicas.

Como agente bactericida, a enzima BatroxLAAO apresentou moderada ação contra *E. coli* e *S. aureus*, sendo compatível com os dados apresentados por outras LAAOs, do gênero botrópico, na literatura.

A BatroxLAAO apresentou-se potencialmente ativa contra *Trypanosoma cruzi*, causador do mal de Chagas. Essa atividade tem sido pouco explorada com toxinas animais, especialmente com LAAOs, portanto, esse experimento trouxe uma contribuição no desenvolvimento de novas moléculas contra esse parasita;

A proteína BatroxLAAO apresentou-se como excelente agente fungicida contra *Candida albicans*, pois com 37,5 µg/mL esta proteína foi capaz de inibir o crescimento de 100% das cepas. A *Candida albicans* é uma espécie de fungo diplóide que causa, oportunamente, infecções orais e vaginais benignas nos seres humanos, além de apresentar-se em infecções sistêmicas malignas em doentes com AIDS.

Para o entendimento e aprofundamento no estudo da ação fungicida, outros testes precisam ser realizados para o conhecimento das vias de atuação dessa proteína frente à *Candida albicans* e outros patógenos como *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida glabrata* ou *Candida parapsilosis* que também são responsáveis por casos de candidíase.

Os dados aqui apresentados corroboram com os dados apresentados em literatura no aspecto da ação sobre fungos. No entanto, trata-se de um dado, até o momento, inédito sobre a considerável ação de uma LAAO botrópica sobre *Candida albicans*.

3) Quanto à produção de anticorpos anti-BatroxLAAO

O procedimento de imunização de camundongos com BatroxLAAO promoveu a geração de anticorpos policlonais para L-aminoácidos oxidases. O procedimento utilizado mostrou-se eficiente pela elevada imunodeteção de anticorpos anti-BatroxLAAO em relação aos soros controles pré-ímmes. A especificidade de BatroxLAAO nos soros obtidos, foi analisada com diferentes peçonhas de serpentes

do mesmo gênero e outras L-aminoácidos de peçonhas de serpentes. O anticorpo produzido não apresentou especificidade única, ou seja, apresentou reatividade cruzada para outras proteínas (LAAOs) e peçonhas de diferentes espécies. A alta homologia das LAAOs pode favorecer o compartilhamento de epítopos comuns que favorecem a reatividade cruzada apresentada pelo anticorpo anti-BatroxLAAO.

4) Quanto ao potencial antitumoral *in vitro*

A proteína BatroxLAAO mostrou-se eficiente na ação anti-tumoral (*in vitro*) com alta citotoxicidade em células tumorais. Nas condições testadas a BatroxLAAO comportou-se como indutor de apoptose para linhagens tumorais, corroborando com os dados da literatura. O ensaio realizado com a técnica de microscopia de fluorescência seguida do ensaio de avaliação da cinética do ciclo celular permitiu-nos detectar o atraso na fase G0/G1, demonstrando a ação evidente desta proteína.

5) Quanto ao potencial antitumoral *in vivo*

A proteína BatroxLAAO apresentou baixa atividade apoptótica *in vivo*, sendo que nos modelos testados, ficou evidente a ação desta proteína em baço de animais inoculados somente com células B16F10. Para os tratamentos efetuados com células tumorais PC12 e JURKAT não foram observadas qualquer alteração estatisticamente significativa. Diante desses dados, podemos inferir que a BatroxLAAO é uma proteína com caráter apoptótico, atuando preferencialmente pela via mitocondrial, ativando o gene apoptótico *BAX* e não *FAS* ou *BCL2*, em modelos de animais induzidos com células de melanoma murino. Os dados apresentados, *in vivo*, são inéditos e serão realizados outros experimentos como imunofenotipagem para confirmar a moderada ação apoptótica da BatroxLAAO, *in vivo*.

6) Considerações finais

Os dados estruturais obtidos neste trabalho nos permitem concluir que a BatroxLAAO é uma proteína que apresenta alta homologia com outras LAAOs já descritas em literatura, no entanto, pode apresentar resultados distintos frente às atividades já estudadas. Estes dados são, até o momento, inéditos para uma LAAO botrópica e, portanto, trará grande contribuição no desenvolvimento de novas moléculas com potenciais promissores.

Com base nos resultados obtidos, podemos considerar a BatroxLAAO uma enzima multifuncional com excelente potencial biotecnológico, principalmente como agente leishmanicida e fungicida. Estas atividades serão melhores exploradas, a fim de obter o delineamento das vias de ação desta proteína sobre esses agentes. BatroxLAAO apresentou também moderada atividade apoptótica *in vivo*. Esses dados, possivelmente, favorecerão o desenho de novos agentes terapêuticos eficazes e de ação direcionada.

Estas propriedades e o potencial uso da BatroxLAAO para uma variedade de efeitos têm estimulado a expressão dessa proteína em um sistema heterólogo. O interesse em realizar clonagem e expressão da BatroxLAAO deve-se à baixa rentabilidade da proteína (1,9%) em relação à peçonha bruta, que dificulta a realização de procedimentos experimentais. Desta forma, a expressão dessa proteína por métodos de biologia molecular, consiste em uma alternativa viável para a obtenção da mesma em quantidades suficientes para o estudo de suas atividades enzimáticas e biológicas.

A utilização de técnicas de biologia molecular e estrutural é essencial para o entendimento da relação entre estrutura e atividade em ensaios biológicos de interação proteína-proteína/ligante. Diante disto, poderão ser identificadas regiões críticas na estrutura da proteína para as interações em processos biológicos, permitindo o desenho de moléculas recombinantes mutantes que poderiam potencializar a atividade biológica do complexo ou favorecer a interação com outras proteínas. Estas técnicas poderão permitir a descoberta de novos compostos que possivelmente permitirão o desenho de fármacos com interesse biotecnológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia Celular e Molecular*, 5^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ABE, Y.; SHIMOYAMA, Y.; MUNAKATA, H.; ITO, J.; NAGATA, N.; OHTSUKI, K. Characterization of an apoptosis-inducing factor in *Habu* snake venom as a glycyrrhizin (GL)-binding protein potently inhibited by GL in vitro. **Biol Pharm Bull**, v. 21, p. 924-927, 1998.
- ADAMS, P.D., P.V. AFONINE, G. BUNKOCZI, V.B. CHEN, I.W. DAVIS, N. ECHOLS, J.J. HEADD, L.W. HUNG, G.J. KAPRAL, R.W. GROSSE-KUNSTLEVE, A.J. MCCOY, N.W. MORIARTY, R. OEFFNER, R.J. READ, D.C. RICHARDSON, J.S. RICHARDSON, T.C. TERWILLIGER, P.H. ZWART. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, v. 66, p. 213-221, 2010.
- AHN, M.Y.; LEE, B.M.; KIM, Y.S. Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). **Int J Biochem Cell biol**, v. 29, p. 911-919, 1997.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing Inc. 2002, p. 1616.
- ALI, S.A.; STOEVA, S.; ABBASE, A.; ALAN, J. M.; KAYED, R.; FAIGLE, M.; NEUMEISTER, B.; VOELTER, W. Isolation, Structural and a Functional Characterization of an apoptosis Inducing L-amino acid oxidase from *Leaf-nosed Viper* (*Eristocophis macmahoni*) Snake Venom. **Arch Bioch and Biophys**, v. 384, p 216-226, 2000.
- ALVES*, R.M.; ANTONUCCI*, G.A.; PAIVA, H.H.; CINTRA, A.C.O.; FRANCO, J.J.; MENDONÇA-FRANQUEIRO, E.P.; DORTA, D.J.; GIGLIO, J.R.; ROSA, J.C.; FULY, A.L.; DIAS-BARUFFI, M.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comp Biochem Physiol A**, 151, p. 542 – 550, 2008.
- ALVES, R.M. (2007) Isolamento e Caracterização bioquímica e funcional de uma L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops atrox*. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP. Universidade de São Paulo – USP.
- ANDE, S.R.; KOMMOJU, P.R.; DRAXL, S.; MURKOVIC, M.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; FERNANDO-MAY, E. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, v. 11, p. 1439-51, 2006.

- ANDE, S.R.; FUSSI, H.; KNAUER, H.; MURKOVIC, M.; GHISLA, S.; FRÖHLICH.; MACHEROUX, P. Induction of apoptosis in yeast by L-aminoacid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **Yeast**, v. 25, p. 349-357, 2008.
- ARAKI, S.; ISHIDA, T.; YAMAMOTO, T.; KAJI, K.; HAYASHI, H. Inductions of apoptosis by hemorrhagic snake venom in vascular endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 190, p. 148–153, 1993.
- ARIMA, J.; UESUGI, Y.; IWABUCHI, M.; HATANAKA, T. Study on peptide hydrolysis by amino peptidases from *Streptomyces griseus*, *Streptomyces septatus*, and *Aeromonas proteolytica*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 70, p. 541–547, 2006.
- ARIMA, J.; SASAKI, C.; SAKAGUCHI, C.; MIZUNO, H.; TAMURA, T.; KASHIMA, A.; KUSAKABE, H.; SUGIO, S.; INAGAKI, K. Structural characterization of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. **FEBS J.**, v. 276, p. 3894-3903, 2009.
- ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, v. 281, p. 1305–1308, 1998.
- ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P.; ASPERTI, M.C.; MANDELBAUM, F.R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (*caissaca*). **Toxicon**, v 23, p. 691-706, 1985.
- BAI, J.; MENG, Z. Effect of Sulfur Dioxide on Expression of Proto-oncogenes and Tumor Suppressor Genes from Rats. **Environ. Toxicol.**, v. 25, p. 272-283, 2009
- BAI, J.; MENG, Z. Expression of apoptosis-related in livers from rats exposed to sulfur dioxide. **Toxicology**, v. 216, p. 253-260, 2005b.
- BAI, J; MENG. Effects of sulfur dioxide on apoptosis-related gene expressions in lungs from rats. **Regul Toxicol Pharmacol.**, v. 43, p. 272-279, 2005a.
- BARRAVIEIRA, B. **Venenos Animais**: uma visão integrada. Rio de Janeiro, EPUB, cap.63, 1994, p.97-105.
- BARRAVIERA, B. Venenos: Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. Rio de Janeiro: EPUB, 1999, p. 205-223.
- BERGER, B.J.; BHATTI, A.R. Snake venom components and their cross-reactivity: a review. **Biochem Cell Biol.** v. 67, p. 597 – 601, 1989.
- BIEBER, A.L. In: Lee, C.Y. (Ed.), Metal and Nonprotein Constituents in Snake Venoms. Springer-Verlag, New York, 1979.
- BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, v. 39, p. 615–647, 2003.

- BRANZEI, D.; FOIANI, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 9, p. 297-308, 2008.
- BUOLAMWINI, J.K. Cell cycle molecular targets in novel anticancer drug discovery. **Curr Pharm Des.**, v. 6, p. 379-92, 2000.
- BUTZKE, D.; HURWITZ, R.; THIEDE, B.; GOEDERT, S; RUDEL, T. Cloning and biochemical characterization of APIT, a new L-amino acid oxidase from *Aplysia punctata*. **Toxicon**, v. 46, p. 479-89, 2005.
- CARDOSO, J.L.C. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes, São Paulo: SARVIER, 2003.
- CHAYEN, N.E. A novel technique to control the rate of vapour diffusion, giving larger proteins crystals. **Journal of Applied Crystallography**, 30, p. 198–202, 1997.
- CHEN, W.J.; HUANG, Y.T.; WU, M.L.; HUANG, T.C.; HO, C.T.; PAN, M.H. Induction of apoptosis by Vitamin D₂, Ergocaciferol, via reactive oxygen species generation, glutathione depletion, and caspases activation in human leukemia cells. **J Agric Food Chem.** 56, p. 2996-3005, 2008.
- CHEN, X.; LV, P.; LIU, J.; XU, K. Apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell (HepG2) induced by cardiotoxin III through S-phase arrest. *Exp Toxicol Pathol.* v, 61 (4), p. 307-15, 2009.
- CHINONAVANIG, L.; BILLINGS, P.B.; MATANGKASOMBUT, P.; RATANABANANGKOOK, K. Antigenic relationships and relative immunogenicities of venom proteins from six poisonous snakes of Thailand. **Toxicon**, 26, p. 883-890, 1988.
- CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, p. 1279–130, 1991.
- CISCOTTO, P.; MACHADO DE AVILA, R.A.; COELHO, E.A.F.; OLIVEIRA, J.; DINIZ, C.G.; FARÍAS, L.M.; DE CARVALHO, M.A.R.; MARIA, W.S.; SANCHEZ, E.F.; BORGES, A.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of a L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 53, p. 330 – 341, 2008.
- COSTA TORRES, A.F.; DANTAS, R.T.; TOYAMA, M.H.; FILHO, F.D.; ZARA, F.J.; de QUEIROZ, M.G.R.; PINTO, N.A.N.; de OLIVEIRA, M.R.; TOYAMA, D.O.; MONTEIRO, H.S.A.; MARTINS, A.M.C. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. **Toxicon.** Article in press, p. 1-10, 2010. doi:10.1016/j.toxicon.2009.11.013
- COUDERT, M. Characterization and physiological function of a soluble L-amino acid oxidase in *Corynebacterium*, **Archives of Microbiology** 102, p. 151-3, 1975.

- CURTI, B.; RONCHI, S.; SIMONETA, P.M. D- and L-amino acid oxidases. In: Mueller, F. **Chemistry and Biochemistry of Flavoenzyme 3**, Ed. CRC Press, Boca Roton, p.69-94, 1992.
- da SILVA, C.J.; JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Epidemiology of snake bite in a central region of Brazil. **Toxicon**. v. 41(2), p. 251–255, 2003.
- DAL PAI, V.; NETO, H.S. Ação dos venenos ofídicos sobre os tecidos animais. In: BARRAVIERA, B. Venenos animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro, Ed. EPUC, p. 411, 1994.
- DE PASQUALE, A. Pharmacognosy: the oldest modern science. **J. Ethnopharmacol.** 11, p. 1–16, 1984.
- DORSZEWSKA, J.; ADAMEZEWSKA-GONCERZEWICZ, Z. Oxidative damage to DNA, p53 gene expression and p53 protein level in the process of aging in rat brain. **Respir Physiol Neurobiol** v. 139, p. 227-236, 2004.
- DU, X.Y.; CLEMETSON, K.J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon** 40, p. 659-665, 2002.
- DUERRE, J.A.; CHAKRABARTY, S. I-amino acid oxidases of *Proteus rettgeri*, **J Bacteriol.** 121, p. 656-63, 1975.
- DUNBAR, B.S.; SKINNER, S.M. Preparation of monoclonal antibodies. **Methods Enzymol.** 182:670-9, 1990.
- EASTMAN, A. Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies. **J Cell Biochem.** v. 91, p. 223-31, 2004.
- ESKES, R.; ANTONSSON, B.; OSEN-SAND, A.; MONTESSUIT, S.; RICHTER, C.; SADOUL, R.; AZZEI, G.; NICHOLS, A.; MARTINOU, J.C. Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. **J. Cell. Biol**, v. 143, p. 217–224, 1998.
- EVANS, P. Scaling and assessment of data quality. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, v. 62, p. 72-82, 2006.
- FERREIRA, M.L.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; FRANCA, F.O., CARDOSO, J.L.; MOTA, I. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. **Toxicon**, v 30 p. 1603–1608, 1992.
- FRANÇA, S.C.; KASHIMA, S.; ROBERTO, P.G.; MARINS, M.; TICLI, F.K.; PEREIRA, J.O.; ASTOLFI-FILHO, S.; STÁBELI, R.G.; MAGRO, A.J.; FONTES, M.R.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M. Molecular approaches for structural characterization of *Bothrops* I-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling.

Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 355 (2), p. 302-306, 2007.

- FURTADO, M.F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S.R.; ROCHA, M.M. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). *Toxicon*, 48 (4), p. 401–410, 2006.
- GASPAROTO, T.H.; VIEIRA, N.A.; PORTO, V.C.; CAMPANELLI, A.P.; LARA, V.S. Ageing exacerbates damage of systemic and salivary neutrophils from patients presenting Candida-related denture stomatitis. *Immun Ageing*, v. 28, 2009.
- GEORGIEVA, D., MURAKAMI, M., PERBAND, M., ARNI, R., BETZEL, C. The structure of a native l-amino acid oxidase, the major component of the *Vipera ammodytes ammodytes* venom, reveals dynamic active site and quaternary structure stabilization by divalent ions. *Mol Biosyst.* 2010 Oct 11.
- GERSHONI, J.M.; PALADE, G.E. Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem.* v.131, p.1–15, 1983.
- GIACCIA, A.J.; KASTAN, M.B. The complexity of p53 modulation: Emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev*, v12, p. 2973–2983, 1998.
- GREEN, D.R.; REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-12, 1998.
- GUÉRCIO, R.A.P.; SHEVCHENKO, A.; SHEVCHENKO, A.; LOPEZ-LOZANO, J.L.; PAHA, J.; SOUSA, M.V.; RICART, C.A.O. Ontogenetic variation in the venoms proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Science*, v. 11:4:11, 2006.
- HARLOW & LANE. *Antibodies: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 1988, Cap: 6, 7, e 8.
- HARVEY, A.L. *Snake Toxins*, 1991. Pergamon Press, New York.
- HAVRILESKY, L.J.; ALVAREZ, A.A.; WHITAKER, R.S.; MARKS, J.R.; BERCHUCH, A. Loss of expression of the p16 tumor suppressor gene is more frequent in advanced ovarian cancers lacking p53 mutations. *Gynecol Oncol*, v. 83, p. 491-500, 2001.
- HICKMAN, J.A. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev.*, v. 11, p. 121-39, 1992.
- HOFMANN, H.; BON, C. Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. 2. Identification, purification and properties of two factor X activators. *Biochemistry*, v. 26, p. 780–787, 1987.

- HOMSI-BRADENBURGO, M.I.; BORGES, M.H.; SOARES, A.S.; RODRIGUES, V. M.; IZIDORO, L.F.M. Ação antipeçonha do extrato vegetal de *Casearia sylvestris*. Biotecnologia-Ciência e Desenvolvimento, v. 1, p.28-30, 1988.
- HSIESH, S.Y.; ZHUANG, F.H.; WU, Y.T.; CHEN, J.K.; LEE, Y.L. Profiling the proteome dynamics during the cell cycle of human hepatoma cells. Proteomics, v. 8, p. 2872-84, 2008.
- IZIDORO, L.F.M.; RIBEIRO, M.C.; SOUZA, G.R.L.; SANT'ANA, C.D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRADENBURGO, I.; GOULART, L.R.; BELEBONI, R.O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and Functional Characterization of na L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. Bioorg Med Chem. v. 14, p. 7034-43, 2006.
- JANCARIK, J.; KIM, S.H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. Journal of Applied Crystallography, v. 24, p. 409-411, 1991.
- JIN, Z., EL-DEIRY, W.S. Overview of cell death signaling pathways. Cancer Biol Ther., v. 4(2), p. 139-63, 2005. Review.
- JUN-YING, Y., CUN-SHUAN, X. Antitumor effects of a selenium heteropoly complex in K562 cells. Pharmacol Rep., v. 61 (2), p. 288-95, 2009.
- KASAI, K.; ISHIKAWA, T.; KOMATA, T.; FUKUCHI, K.; CHIBA, M.; NOZAKA, H.; NAKAMURA, T.; SATO, T.; MIURA, T. Novel L-amino acid oxidase with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from epidermal mucus of the flounder *Platichthys stellatus*. FEBS J. v. 277 (2), p. 453-465, 2010.
- KOHLER, G.; MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, v. 256: 495-7, 1975.
- KOMMOJU, P.R.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S. Molecular cloning, expression and purification of L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. Protein Expression and Purification, v. 52, p. 89-95, 2007.
- LEE, M.L., TAN, N.H., FUNG, S.Y., SEKARAN, S.D. 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., v. (2),p. 237-42, 2010.
- LEE, S.K.; ZHANG, W.; SANDERSON, B.J.S. Human lymphoblastoid cell by resveratrol via cell cycle arrest and apoptosis induction. J. Agric. Food Chem. v. 56, p. 7572-7577, 2008.
- LESLIE, A.G.W. The integration of macromolecular diffraction data. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, v. 62, p. 48-57, 2006.

- LI, R.; ZHU, S.; WU, J.; WANG, W.; LU, Q.; CLEMETSON, K.J. L-amino acid oxidase from *Naja atra* venom activates and binds to human platelets. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. v. 40, p. 19-26, 2008.
- LI, Z.Y.; YU, T.F.; LIAN, E.C. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. *Toxicon*, v. 32, p. 1348-58, 1994.
- LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J.M. A new muscle damaging toxin myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*, v. 27, p. 725–733, 1989.
- MACKESSY, S.P. Venom ontogeny in the Pacific rattle snakes *Crotalus viridis helleri* and *C. v. oreganus*. *Copeia*, p. 92–101, 1988.
- MACKESSY, S.P.; WILLIAMS, K.; ASHTON, K.G. Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus* concolor: a case of venom paedomorphosis? *Copeia*, p. 769–782, 2003.
- MAO, F.; XIAO, B.; JIANG, Z.; ZHAO, J.; HUANG, X.; GUO, J. Anticancer effect of Lycium barbarum polysaccharides on colon cancer cells involves G0/G1 phase arrest. *Med Oncol*. 2010. PMID: 20066520.
- MARCHI-SALVADOR, D.P.; FERNANDES, C.A.; SILVEIRA, L.B.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R. Crystal structure of a phospholipase A(2) homolog complexed with p-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1794 (11), p. 1583-90, 2009.
- MASSEY, V.; CURTI, B. On the Reaction Mechanism of *Crotalus adamanteus* L-Amino Acid Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 242 (6), p. 1259-1264, 1967.
- MCCOY, A.J., R.W. GROSSE-KUNSTLEVE, P.D. ADAMS, M.D. WINN, L.C. STORONI, R.J. Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, v. 40, p. 658-674, 2007.
- MCDONALD, E.R.; EL-DEIRY, W.S. Cell cycle control as a basis for cancer drug development. *Int J Oncol*. v.16, p. 871-86, 2000.
- MCPHERSON, A. Introduction to Macromolecular Crystallography. *J. Chem. Educ.* v. 80 (9), p 1007, 2003.
- MCPHERSON, A. Preparation and Analysis of Protein Crystals. New York: John Wiley e Sons, 1982, p. 371.
- MEBS, D. Toxicity in animals. Trends in evolution? *Toxicon*, v. 39, p. 87-96, 2001.

- MEHLOTRA, R. K. Antioxidant defense in parasitic protozoa. *Crit. Rev. Microbiol.* v. 22, p. 295–314, 1996.
- MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso, J.L.C. et al. *Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.* São Paulo: Sarvier, FAPESP, 2003, p.33-61.
- MENEZ, A. Immunology of snakes toxins. In: *Snake Toxins*, (Harvey, A. L., Ed.) New York: Pergamon Press, 1991, p. 35–90.
- MENG, Z.; QIN, G.; ZHANG, B.; BAI, J. DNA damaging effects of sulfur dioxide derivatives in cells from various organs of mice. *Mutagenesis*, v 19, p. 465-468, 2004.
- MINTON, S.A., Jr. Common antigens in snake venoms. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 52, p. 845–862, 1979.
- MOLINARI, M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Prolif.* v. 33, p. 261-74, 2000.
- MOUSAVI, S.H.; TAVAKKOL-AFSHARI, J.; BROOK, A.; JAFARI-ANARKOOLI, I. Role of caspases and Bax protein in saffron-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Food and Chemical Toxicology.*, v. 47, p. 1909-1913, 2009.
- MOUSTAFA, I.M.; FOSTER, S.; LYUBIMOV, A.Y.; VRIELINK, A. Crystal structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L-phenylalanine substrate: insights into structure and mechanism. *J Mol Biol.* v. 364, p. 991-1002, 2006.
- MURAKAWA, M.; JUNG, S.K.; IIJIMA, K.; YONEHARA, S. Apoptosis-inducing protein, AIP, from parasite-infected fish induces apoptosis in mammalian cells by two different molecular mechanisms, *Cell Death Differ.* v. 8, p. 298-307, 2001.
- NGUYEN, J.T.; WELLS, J.A. Direct activation of the apoptosis machinery as a mechanism to target cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, v 100, p. 7533–7538, 2003.
- NIEDERMANN, D.M.; LERCH, K. Molecular cloning of the L-amino acid oxidase gene from *Neurospora crassa*, *Journal of Biological Chemistry.* v. 265, p. 17246-51, 1990.
- OBARA, K.; OTSUKA-FUCHINO, H.; SATTAYASAI, N.; NONOMURA, Y.; TSUCHIYA, T.; TAMIYA, T. Molecular cloning of the antibacterial protein against of the giant African snail, *Achatina fulica Ferussac*, *Eur J Biochem.* v. 209, p. 1-6, 1992.
- OWA, T.; YOSHINO, H.; YOSHIMATSU, K.; NAGASU, T. Cell cycle regulation in the G1 phase: a promising target for the development of new chemotherapeutic anticancer agents. *Curr Med Chem.* v. 8, p. 1487-503, 2001.

- OZOLINS, T.R.; HALES, B.F. Oxidative stress regulates the expression and activity of transcription factor activated protein-1 in rat conceptus. *J. Pharmacol Exp Ther*, v 280, p. 1085-1093, 1997.
- PARK, B.Y.; OH, S.R.; AHN, K.S.; KWON, O.K.; LEE, H.K. Induction of apoptosis by vitamin D₂, ergocalciferol, via reactive oxygen species generation, glutathione depletion, and caspase activation in human leukemia cells. *J Agric Food Chem.*, v. 56, p. 2996-3005, 2008.
- PAWELEK, P.D.; CHEAH, J.; COULOMBE, R.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; VRIELINK, A. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. *The EMBO Journal*, v. 19, p. 4204 – 4215, 2000.
- PINHEIRO, M.P. (2007) Estudos cristalográficos da enzima diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*. Qualificação de mestrado apresentada para o Programa de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP.
- PISTORIUS, E.K.; VOSS, H. Some properties of a basic L-amino acid oxidase from *Anacystis nidulans*, *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 611, p. 227-40, 1980.
- PONNUDURAI, G.; CHUNG, M.C.; TAN, T.H. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. *Arch Biochem Biophys*, v.313, p. 373-378, 1994.
- QUEIROZ, G.P.; PESSOA, L.A.; PORTARO, F.C.V.; FURTADO, M.F.D.; TAMBOURGI, D.V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon*, v. 52, p. 842-851, 2008.
- REED, J.C. Apoptosis-target therapies for cancer. *Cancer Cell*, v. 3, p. 17-22, 2003.
- RIBEIRO, L. A.; DE CAMPOS, V.A.; ALBUQUERQUE, M. J.; TAKAOKA, N.Y. Snake bites in the state of São Paulo, Brazil. *Rev Assoc Med Brás*, v. 39, p. 4–7, 1993.
- RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T. Bites by snakes in the genus *Bothrops*: a series of 3,139 cases. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 30, p. 475-80, 1997.
- ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFIELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol*, v. 156, p. 261-273, 1949.
- RODRIGUES, R.S.; DA SILVA, J.F.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F.P.; OTAVIANO, A.R.; HENRIQUE-SILVA, F.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A.J.; BRAZ, A.S.; DOS SANTOS, J.I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; FONTES, M.R.; FULY, A.L.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Biochimie*, v. 91 (4), p. 490-501, 2009.

- ROITT, Ivan et al. *Imunologia*. São Paulo: Editora Manole LTDA, 1999. 5ª ed.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: *Venomous Animals and their Venoms*. v.2, Ed. W. Burcherl and E. Bucley, New York, 1971, p.345.
- ROY, A.; ZHOU, X.; CHONG, M.Z.; D'HOEDT, D.; FOO, C.S.; RAJAGOPALAN, N.; NIRTHANAN, S.; BERTRAND, D.; SIVARAMAN, J.; KINI, R.M. Structural and functional characterization of a novel homodimeric three-finger neurotoxin from the venom of *Ophiophagus hannah* (King cobra). *The Journal of biological chemistry*, 2010. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M109.074161>
- SAMEL, M.; TÕNISMÄGI, K.; RÖNNHOLM, G.; VIJA, H.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, E. L-Amino acid oxidase from *Naja naja oxiana* venom. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. v. 149, p. 572-80, 2008.
- SANCHEZ, E.F.; SCHNEIDER, F.S.; YARLEQUE, A.; BORGES, M.H.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO, S.G.; EVANGELISTA, K.S.; EBLE, J.A. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2010. doi:10.1016/j.abb.2010.01.010
- SCORRANO, L.; OAKES, S.A.; OPFERMAN, J.T.; CHENG, E.H.; SORCINELLI, M.D.; POZZAN, T.; KORSMEYER, S.J. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science*, v. 300, p. 135–139, 2003.
- SHI, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*. v. 9, p. 459-70, 2002.
- SHILO, S.; ARONIS, A.; KOMARNITSKY, R.; TIROSH, O. Selenite sensitizes mitochondrial permeability transition pore opening in vitro and in vivo: a possible mechanism for chemo-protection. *Biochem J*, v 370, p. 283 – 290, 2003.
- SKARNES, R.C. L-amino-acid oxidase, a bactericidal system. *Nature*, v. 225, p. 1072-3, 1970.
- SOUZA, D.H.; EUGENIO, L.M.; FLETCHER, J.E.; JIANG, M.S.; GARRATT, R.C.; OLIVA, G.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data. *Arch Biochem Biophys*. v.368, p.285-290, 1999.
- STÁBELI, R.G., MARCUSSI, S., CARLOS, G.B., PIETRO, R.C., SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S., GIGLIO, J.R., OLIVEIRA, E.B., SOARES, A.M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorg Med Chem.*, v. 12(11), p. 2881-6, 2004.
- STÁBELI, R.G.; MAGALHÃES, L.M.P.; SELISTRE-ARAUJO, H.S.; SOARES, A.M.; OLIVEIRA, E.B. Antibodies to a fragment of the *Bothrops moojeni* L-amino

acid oxidase cross-react with snake venoms components unrelated to the parent protein. *Toxicon*. v. 46, p. 308-17, 2005.

- STÁBELI, R.G.; SANT'ANA, C.D.; RIBEIRAO, P.H.; COSTA, T.R.; TICLI, F.K.; PIRES, M.G.; NOMIZO, A.; ALBUQUERQUE, S.; MALTA-NETO, N.R.; MARINS, M.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. *Int J Biol Macromol*. v. 41, p. 132-40, 2007.
- SUHR, S.M.; KIM, D.S. Comparison of the apoptotic pathways induced by L-amino acid oxidase and hydrogen peroxide. *J Biochem*. v.125, p.305-309, 1999.
- SUHR, S.M.; KIM, D.S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. v. 224, p. 134-9, 1996.
- SUN, L.K.; YOSHI, Y.; HYODO, A.; TSURUSHIMA, H.; SAITO, A.; HARAKUNI, T.; LI, Y.P.; KARIYA, K.; NOZAKI, M.; MORINE, N. Apoptotic effect in the glioma cells induced by specific protein extracted from *Okinawa habu* (*Trimeresurus flavoviridis*) venom in relation to oxidative stress. *Toxicology in Vitro*, v. 17, p. 169-77, 2003.
- SUN, M.Z., GUO, C., TIAN, Y., CHEN, D., GREENAWAY, F.T., LIU, S. Biochemical, functional and structural characterization of Akbu-LAAO: a novel snake venom L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. *Biochimie*, v. 92(4), p. 343-9, 2010.
- SUN, Y. p53 and Its Downstream Proteins as Molecular Targets of Cancer. *Molecular Carcinogenesis*, v 45, p. 409 – 415, 2006.
- TAN, N.H.; YEO, K.H.; JAAFAR, M.I. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitation of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom and venom antibodies. *Toxicon*, v. 30 (12), p. 1609-1620, 1992.
- TAN, N.H.; LIM, K.K.; NIK JAAFAR, M.I. An investigation into the antigenic cross-reactivity of *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom neurotoxin, phospholipase A₂, hemorrhagin and L-amino acid oxidase using enzyme-linked immunosorbent assay. *Toxicon* 31, p. 865–872, 1993.
- TAN. N. H.; PONNUDURAI, G. A comparative study of the biological properties of some snake venoms. *Comp Biochem Physiol B*. v. 99, p. 351–354, 1991.
- TAN, N.H.; PONNUDURAI, G. An investigation on the antigenic cross-reactivity of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit Viper) venom hemorrhagin, thrombin-like enzyme and L-amino acid oxidase using enzyme-linked immunosorbent assay. *Toxicon*, v., 32, p. 1265–1269, 1994.
- TEMPONE, A.G.; ANDRADE JR, H.F.; SPENCER, P.J.; LOURENÇO, C.O.; ROGERO, J.R.; NASCIMENTO, N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania*

spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* v. 280, p. 620-624, 2001.

- TÕNISMÄGI, K.; SAMEL, M.; TRUMMAL, K.; RÖNNHOLM, G.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, E. L-amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: isolation, characterization, effects on platelets and bacteria. *Toxicon*, v. 48 (2), p. 227-237, 2006.
- TORII, S.; NAITO, M.; TSURUO, T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from *Western diamondback rattlesnake* venom. *J Biol Chem*. v. 272, p. 9539-9542, 1997.
- TORII, S.; YAMANE, K.; MASHIMA, T.; HAGA, N.; YAMAMOTO, K.; FOX, J.W.; NAITO, M.; TSURUO, T. Molecular cloning and functional analysis of apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. *Biochemistry*, v. 39, p. 3197-205, 2000.
- TOYAMA, M.H.; TOYAMA DDE, O.; PASSERO, L.F.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.; TOMOKANE, T.Y.; FONSECA, F.V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P.P.; BERIAM, L.O.; MARTINS, M.A.; MONTEIRO, H.S.; FONTELES, M.C. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon*, v. 47 (1), p. 47-57, 2006.
- VALLON, O.; BULTE, L.; KURAS, R.; OLIVE, J.; WOLLMAN, F. A. Extensive accumulation of an extracellular L-amino-acid oxidase during gametogenesis of *Chlamydomonas reinhardtii*, *European Journal of Biochemistry*. v. 215, p. 351-60, 1993.
- WANG, J.; WU, A.; XU, Y.; LIU, J.; QIAN, X. M₂-A induces apoptosis and G2-M arrest via inhibiting P13K/Akt pathway in HL60 cells. *Cancer Letters*. 2009. DOI: 10.1016/j.canlet.2009.03.039.
- WEBSTER, K.A.; DISCHER, D.J.; BISHOPRIC, N.H. Regulation of fos and jun immediate-early genes by redox or metabolic stress in cardiac myocytes. *Circ Res*, v 74, p. 679-686, 1994.
- WEI, J.F.; YANG, H.W.; WEI, X.L.; QIAO, L.Y.; WANG, W.Y.; HE, S.H. Purification, characterization and biological activities of the L-amino acid oxidase from *Bungarus fasciatus* snake venom. *Toxicon*, v. 54, p. 262-271, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Progress in Characterization of Venoms and Standartization of Antivenoms. 1981, Geneva: World Health Organization.
- WYLLIE, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, v 284, p. 555-556, 1980.

- YAMAZA, T.; MASUDA, K.F.; ATSUTA, I.; NISHIJIMA, K.; KIDO, M.A.; TANAKA, T. Oxidative stress-induced DNA damage in the synovial cells of the temporomandibular joint in the rat. *J Dent Res*, v. 83, p. 619-624, 2004.
- YAN, J.; LUO, D.; LUO, Y.; GAO, X.; ZHANG, G. Induction of G1 arrest and differentiation in MDA-MB-231 breast cancer cell by boehmeriasin A, a novel compound from plant. *Int J Gynecol Cancer*, v. 16, p.165-70, 2006.
- YAN, N.; SHI, Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annu. Rev. Cell Dev Biol*, v. 21, p. 35–56, 2005.
- YANG, H.; JOHNSON, P.M.; KO, K.C.; KAMIO, M.; GERMANN, M.W.; DERBY, C.D.; TAI, P.C. Cloning, characterization and expression of escaping, a broadly antimicrobial FAD-containing L-amino acid oxidase from ink of the sea hare *Aplysia californica*, *J Exp Biol*. v. 208, p. 3609-22, 2005.
- ZELLER, A.E. Snake venom action: are enzymes involved in it?, *Experientia*. v. 33, p. 143-50, 1977.
- ZHANG, H.; TENG, M.; NIU, L.; WANG, Y.; LIU, Q.; HAO, Q.; DONG, Y.; LIU, P. Purification, partial characterization, crystallization and structural determination of AHP-LAAO, a novel L-amino acid oxidase with cell apoptosis-inducing activity from *Agkistrodon halys pallas* venom. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. v. 60, p. 974-7, 2004.
- ZHANG, Y, I.; WANG, J.H.; LEE, W.H.; WANG, Q.; LIV, H.; ZHENG, Y.T.; ZHANG, Y. Molecular Characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 309, p. 598 – 604, 2003.
- ZHANG, L.; WEI, L.J. ACTX-8, a cytotoxic L-amino acid oxidase isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom, induces apoptosis in Hela cervical cancer cells. *Life Sci.*, v. 80 (13), p. 1189-1197, 2007.
- ZHANG, L., WU, W.T. Isolation and characterization of ACTX-6: a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon acutus* snake venom. *Nat Prod Res.*, v. 22(6), p. 554-63, 2008.
- ZHONG, S.R.; JIN, Y.; WU, J.B.; JIA, Y.H.; XU, G.L.; WANG, G.C.; XIONG, Y.L.; LU, Q.M. Purification and characterization of a new l-amino acid oxidase from *Daboia russellii siamensis* venom. *Toxicon*. v. 54 (6), p. 763-771, 2010.