UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeito do veneno bruto e da L-aminoácido oxidase de *Bothrops*
pirajai em células BCR-ABL positivas**

Versão corrigida da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Sandra Mara Burin

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeito do veneno bruto e da L-aminoácido oxidase de *Bothrops*
pirajai em células BCR-ABL positivas**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à
Farmácia para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientado(a): Sandra Mara Burin

Orientador(a): Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

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.

Burin, Sandra Mara

Efeito do veneno bruto e da L-aminoácido oxidase de *Bothrops pirajai* em células Bcr-Abl positivas. Ribeirão Preto, 2011.

71 p. : Il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Castro, Fabíola Attié.

1. Leucemia Mielóide Crônica. 2. BCR-ABL 3. Apoptose 4. L-aminoácido oxidase 5. *Bothrops pirajai*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Sandra Mara Burin

Efeito do veneno bruto e da L-aminoácido oxidase de *Bothrops pirajai* em células Bcr-Abl positivas

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador(a): Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho...

... aos meus pais com muito carinho

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado esta oportunidade e ter me guiado em todos os momentos para que eu chegasse até aqui.

À Profa Dra Fabíola Attié de Castro, minha orientadora, pela amizade e ensinamentos, essenciais para meu crescimento científico e pessoal, pela atenção, dedicação e por estar sempre presente durante o decorrer deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela oportunidade da realização do mestrado.

Ao CNPq e à Fapesp pelo apoio financeiro, concedido para a realização desta pesquisa.

À Profa Dra Suely Vilela e Dr. Andreimar Soares pela colaboração com este projeto, cedendo-nos os venenos .

À Dra. Simone Kashima Haddad, por disponibilizar o Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto para a realização dos experimentos.

À Fabiana, responsável pela Citometria de Fluxo, por sua grande colaboração, essencial durante todo o curso.

À Luciana, técnica do laboratório de Hematologia da FCFRP, pela amizade e ajuda com os experimentos, principalmente com os Westerns.

Às amigas Raquel, Natália, Livia, Aline e Renata do laboratório de Hematologia da FCFRP, pela amizade, apoio e colaboração.

À Lorena e à Maria Augusta, minhas grandes amigas e companheiras desde a Faculdade por tantos momentos de convívio e experiências trocadas.

Às novas amigas Aline e Luiza pela amizade, força e incentivo.

A todos os amigos e familiares que estiveram comigo durante esta jornada.

“O importante é não parar de questionar”

(Albert Einstein)

RESUMO

BURIN, S.M. **Efeito do veneno bruto e da L-aminoácido oxidase de *Bothrops pirajai* em células BCR-ABL positivas.** 2011. 71f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa caracterizada citogeneticamente pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph) e molecularmente pelo neogene *bcr-abl1* que codifica a oncoproteína BCR-ABL com alta atividade de tirosina-quinase. A célula leucêmica BCR-ABL⁺ apresenta baixa adesão ao estroma medular, resistência à apoptose e potencial mitogênico exacerbado. A LMC possui curso evolutivo trifásico (fase crônica, acelerada e blástica) e seu tratamento pode ser realizado por meio de diferentes modalidades terapêuticas, destacando-se o mesilato de imatinibe (MI) que inibe a TK BCR-ABL induzindo altas taxas de remissão citogenética dos pacientes na fase crônica da doença. Apesar do MI ser eficiente, os pacientes na fase acelerada e blástica da doença são comumente refratários a essa terapia e na fase crônica há casos de resistência ao MI descritos. Nesse contexto, potenciais novos fármacos são investigados para melhorar a eficiência da terapia da LMC. Nesse estudo, investigamos o efeito do veneno bruto (VB) e da enzima L-amino-ácido-oxidase (LAAO) da *Bothrops pirajai* em desencadear apoptose em células BCR-ABL⁺. A apoptose das células HL-60 e HL-60.BCR-ABL foi quantificada pela detecção da percentagem de células com núcleos hipodiplóides pela citometria de fluxo e confirmada pela observação da ativação das caspases 3, 8 e 9 por *western-blot*. Os resultados obtidos indicam que a LAAO é capaz de induzir apoptose em células HL-60 e HL-60.BCR-ABL por ativação das vias extrínseca e intrínseca. Além disso, foi verificado que a LAAO diminui a fosforilação de BCR-ABL em células HL-60.BCR-ABL e quando associada ao MI potencializou a inibição da atividade quinase de BCR-ABL. Os dados da presente investigação indicaram ainda que a LAAO é capaz de modular a expressão de *bad*, *bak*, *bax*, *bid*, *bimel*, *fas*, *fasl*, *a1*, *bcl-2*, *bcl-x_l*, *bcl-w* e *c-flip*, genes reguladores da apoptose celular. Apesar do pouco conhecimento acerca do mecanismo de ação dessa toxina, os dados obtidos sugerem que a LAAO possui o potencial de estimular a apoptose nas linhagens HL-60 e HL-60.BCR-ABL e aumentar o efeito do inibidor da atividade quinase, MI, dados relevantes para estudos futuros associados a descrição de novos fármacos contra leucemia mielóide crônica. .

Palavras chaves: Leucemia Mielóide Crônica, BCR-ABL, Apoptose, L-aminoácido oxidase e *Bothrops pirajai*.

ABSTRACT

Burin, S.M. **Effect of *Bothrops pirajai* crude venom and L-amino acid oxidase in BCR-ABL positive cells.** 2011. 71f. Master. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder cytogenetically characterized by the presence of Philadelphia chromosome (Ph) and molecularly by *bcr-abl1* neogene that encodes the BCR-ABL oncoprotein with high tyrosine kinase (TK) activity. The leukemic cell BCR-ABL⁺ presents poor adhesion to bone marrow stroma, resistance to apoptosis and exacerbated mitogenic potential. The CML has a three-phase course (chronic, accelerated and blastic phase) and its treatment can be performed by different therapeutic modalities, especially the imatinib mesylate (IM) that inhibits the TK BCR-ABL inducing high rates of cytogenetic remission in chronic phase. Although IM is effective, patients in accelerated and blastic phases of the disease are often refractory to this therapy and there are also cases of resistance to IM described in chronic phase. In this context, potential new drugs are investigated to improve the efficiency of the therapy of CML. In this study, we investigated the effect of crude venom (CV) and of the enzyme L-amino acid oxidase (LAAO) from *Bothrops pirajai* in triggering apoptosis in BCR-ABL⁺. The apoptosis of HL-60 cells and HL-60. BCR-ABL was quantified by detecting the percentage of cells with hypodiploid nuclei by flow cytometry and confirmed by observation of the activation of caspases 3, 8 and 9 by Western blot. The results indicate that LAAO is able to induce apoptosis in HL-60 cells and HL-60. BCR-ABL by activation of the extrinsic and intrinsic pathways. Furthermore, it was found that LAAO decreases phosphorylation of BCR-ABL in HL-60 cells. BCR-ABL when associated with IM potencialized the inhibition of kinase activity of BCR-ABL. The data from this study also indicated that the LAAO is able to modulate the expression of *bad*, *bak*, *bax*, *bid*, *bimel*, *fas*, *FasL*, *A1*, *bcl-2*, *bcl-xl*, *bcl-w* and *c-flip*, regulatory genes of apoptosis. Even though there is little knowledge about the mechanism of action of this toxin, the data obtained suggests that LAAO has the potential to stimulate apoptosis in HL-60 lines and HL-60. BCR-ABL and increase the effect of the inhibitor of protein kinase activity, IM, relevant data for future studies associated with the description of new drugs against chronic myeloid leukemia.

Keywords: chronic myeloid leukemia, BCR-ABL, apoptosis, L-amino acid oxidase and *Bothrops pirajai*.

RESUMEN

BURIN, S.M. **Efecto del veneno bruto y de la L-aminoácido oxidasa de *Bothrops pirajai* en células BCR-ABL positivas**. 2011. 71f. Tesis (Maestría). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una enfermedad mieloproliferativa caracterizada citogenéticamente por la presencia del cromosoma Philadelphia (Ph) y molecularmente por el neogen *bcr-abl1* que codifica la oncoproteína BCR-ABL con alta actividad de tirosina-cinasa. La célula leucémica BCR-ABL⁺ presenta baja adhesión al estroma medular, resistencia a la apoptosis y el potencial mitogénico alterado. La LMC posee un curso evolutivo trifásico (fase crónica, acelerada y blástica) y su tratamiento puede ser realizado por medio de diferentes modalidades terapéutica, destacándose el mesilato de imatinibe (MI) que inhibe la TK BCR-ABL induciendo altas tasas de remisión citogenética de los pacientes en la fase crónica de la enfermedad. A pesar del MI ser eficiente, los pacientes en la fase acelerada y blástica de la enfermedad son comúnmente reflejados a esa terapia y en la fase crónica hay casos de resistencia al MI descritos. En este contexto, potenciales nuevos fármacos son investigados para mejorar la eficiencia de la terapia de la LMC. En este estudio, investigamos el efecto del veneno bruto (VB) y de la enzima L-amino-ácido-oxidasa (LAAO) de *Bothrops pirajai* en desencadena apoptosis en células BCR-ABL⁺. La apoptosis de las células HL-60 y HL-60.BCR-ABL fue cuantificada por la detección de células nucleadas hipodiploides por citometría de flujo y confirmada por la activación de las caspasas 3, 8 y 9 por *western-blot*. Los resultados obtenidos indicaron que la LAAO es capaz de inducir la apoptosis en células HL-60 y HL-60.BCR-ABL por activación de las vías intrínsecas y extrínsecas. Además de esto, fue verificada que la LAAO disminuye la fosforilación de BCR-ABL en células HL-60.BCR-ABL y cuando está asociada al MI fue potencializada la inhibición de la actividad cinasa de BCR-ABL. Los datos de la presente investigación indicaron que la LAAO es capaz de modular la expresión de: *bad, bak, bax, bid, bimel, fas, fasl, a1, bcl-2, bcl-x_l, bcl-w y c-flip*, los cuales son genes reguladores de la apoptosis celular. Apesar del poco conocimiento acerca del mecanismo de la acción de esta toxina, los datos obtenidos sugieren que la LAAO posee el potencial de estimular la apoptosis en los linajes celulares HL-60 y HL-60.BCR-ABL, así como también aumenta el efecto del inhibidor de la actividad cinasa, MI, datos relevantes para estudios futuros asociados a la descripción de nuevos fármacos contra la leucemia mieloide crónica.

Palabras claves: Leucemia Mieloide Crónica, BCR-ABL, Apoptosis, L-aminoácido oxidasa y *Bothrops pirajai*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cariótipo de paciente com LMC indicando a presença do Cromossomo Philadéphia.....	4
Figura 2 - Esquema representando a via extrínseca da apoptose.....	8
Figura 3 – Esquema representando a via intrínseca da apoptose.....	9
Figura 4 – Análise da percentagem dos núcleos hipodiplóides de células HL-60.BCR-ABL pelo método HFS por citometria fluxo.....	20
Figura 5 - RNAs extraídos de amostras de HL-60 e HL-60 BCR-ABL cultivadas na presença e ausência da LAAO e submetidos à eletroforese em gel red 1,5%.....	23
Figura 6 – Percentagem de núcleos hipodiplóides em células HL-60 após 12 e 18 horas de incubação com o veneno bruto (VB).....	29
Figura 7 – Percentagem de núcleos hipodiplóides em células HL-60 após 18 horas de incubação com o veneno bruto (VB).....	30
Figura 8 – Percentagem de núcleos hipodiplóides em células HL-60.Bcr-Abl após 12 e 18 horas de incubação com o veneno bruto (VB).....	31
Figura 9 – Percentagem de núcleos hipodiplóides em células HL-60 após 18 horas de incubação com o veneno bruto (VB).....	32
Figura 10 – Percentagem de núcleos hipodiplóides em células HL-60 após 18 horas de incubação com a L-aminoácido oxidase.....	33
Figura 11 – Percentagem de núcleos hipodiplóides em células HL-60.Bcr-Abl após 18 horas de incubação com a L-aminoácido oxidase.....	34
Figura 12 – Ativação da caspase 3 pela LAAO em células HL-60.....	35
Figura 13 – Ativação da caspase 8 pela LAAO em células HL-60.....	35
Figura 14 – Ativação da caspase 9 pela LAAO em células HL-60.....	36
Figura 15 – Ativação da caspase 3 pela LAAO em células HL-60.Bcr-Abl.....	36
Figura 16 – Ativação da caspase 8 pela LAAO em células HL-60.Bcr-Abl.....	37
Figura 17 – Ativação da caspase 9 pela LAAO em células HL-60.Bcr-Abl.....	37
Figura 18 - Análise da porcentagem de núcleos hipodiplóides em células HL-60.BCR-ABL tratadas com LAAO, MI e LAAO associada ao MI por 18h.....	38
Figura 19 – Expressão da proteína fosfotirosina, c-abl e de BCR-ABL em células HL-60.BCR-ABL sem tratamento, tratadas com MI, LAAO e LAAO associada ao MI por 18 horas.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos cDNAs das moléculas envolvidas na apoptose celular, tamanho do fragmento amplificado e temperatura de anelamento (TA).....	25
Tabela 2 - Concentração dos oligonucleotídeos e Programa das reações de amplificação dos genes avaliados.....	26
Tabela 3 - Expressão gênica em células HL-60 tratadas com LAAO nas concentrações de 0,5 e 1,0µg/mL.....	43
Tabela 4 - Expressão gênica em células HL-60.BCR-ABL tratadas com LAAO nas concentrações de 1,0 e 1,5µg/mL.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abl – Ableson leukemia

ACT-D – Actinomicina -D

APAF-1 – Apoptosis Protease- Activator Factor 1

ATP – Trifosfato de adenosina

bad – bcl-2 antagonist of the cell death

bak – bcl-2 homologous antagonist / killer

bax – bcl-2 associated x protein

bcl-x_l – bcl-2 related gene

bcl-w – antiapoptotic bcl-2 family member

bcl-2 – b-cell lymphoma

bcr – “Breakpoint cluster region”

bcr-abl1 – gene resultante da translocação t(9;22)q(34;11)

BCR-ABL – proteína resultante da expressão do gene bcr-abl1

bid – bh3-interacting domain against

bim – bcl-2 interacting mediator

BpirLAO – L-aminoácido oxidase de *Bothrops pirajai*

BSA – Albumina de soro bovino

cDNA – DNA complementar

CT - controle

DD – death domain

DISC – Death Inducing Signaling Complex

DNA – ácido desoxirribonucléico

DMSO – Dimetilssulfóxido

DR – Death receptor

FADD – Fas- Associated Death Domain

Fas/CD95 – receptor de morte

FasL – Fas ligand

Flip – Flice-inhibitory protein

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

HEPES - Hidroxietilpiperazina

HFS – Hypotonic Fluorescent Solution

HL-60 – linhagem celular de leucemia pró-mielocítica

HL-60.BCR-ABL –linhagem HL-60 transfectada com o gene *bcr-abl1*

IAP – Proteína Inibidora da Apoptose

IL - Interleucina

INF- α – Interferon α

kDa – quilodaltons

LAAO – L-aminoácido oxidase

LMC – Leucemia Mielóde Crônica

MI – Mesilato de Imatinibe

Ph – Cromossomo Philadelphia

PI – Iodeto de propídeo

PY - fosfotirosina

PVDF – DifluoridoPolividileno

RNA – Ácido Ribonucléico

STAT - “Signal transducer and activator of transcription”

STI571 – “Signal Transduction Inhibitor 571”

TA – Temperatura Ambiente / Temperatura de Anelamento do primer

TBS – Salina tamponada com Tris

TK – Tirosina quinase

TMO – Transplante de Medula Óssea

TNF – Fator de necrose tumoral

Tris HCl – Tris hidrocloreídrico

t(9;22)q(34;11) – translocação entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Leucemia Mielóide Crônica.....	2
1.1.1. Características Gerais.....	2
1.1.2. Leucemia Mielóide Crônica e o BCR-ABL.....	3
1.1.3. Leucemia Mielóide Crônica e Apoptose.....	5
1.1.4. Tratamento da LMC.....	9
1.2. Venenos, L-aminoácido-oxidase, e Apoptose.....	11
 2. OBJETIVOS.....	 15
2.1. Geral.....	15
2.2. Específicos.....	15
 3. MATERIAL E MÉTODOS.....	 17
3.1. Linhagens celulares, veneno bruto e L-aminoácido oxidase de <i>Bothrops pirajai</i>	17
3.2. Cultivo celular.....	17
3.3. Ensaio de Indução de Apoptose.....	18
3.4. Detecção das caspases 3, 8 e 9 por western-blot.....	20
3.5. Detecção do efeito da associação do Mesilato de Imatinibe com a LAAO.....	21
3.6. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real.....	23
3.7. Análise Estatística.....	27
 4. RESULTADOS.....	 29
4.1. Indução de Apoptose da linhagem HL-60 pelo Veneno Bruto de <i>Bothrops pirajai</i>	29
4.2. Indução de Apoptose na linhagem HL-60.BCR-ABL pelo Veneno Bruto de <i>Bothrops pirajai</i>	30
4.3. Indução de Apoptose na linhagem HL-60 pela L-aminoácido oxidase de <i>Bothrops pirajai</i>	32

4.4. Indução de Apoptose na linhagem HL-60.BCR-ABL pela L-aminoácido oxidase de <i>Bothrops pirajai</i>	33
4.5. Ativação das Caspases 3, 8 e 9 por <i>western blot</i>	34
4.5.1. Análise da expressão protéica das caspases 3, 8 e 9 nas células HL-60.....	35
4.5.2. Análise da expressão protéica das caspases 3, 8 e 9 nas células HL-60.BCR-ABL.....	36
4.6. Detecção da percentagem de núcleos hipodiplóides e da atividade de fosfotirosina na linhagem HL-60.BCR-ABL tratada com Mesilato de Imatinibe e L-aminoácido oxidase.....	37
4.7. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real.....	41
5. DISCUSSÃO.....	47
5.1. Detecção do efeito da associação do Mesilato de Imatinibe com a L-aminoácido oxidase.....	51
5.2. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real.....	54
6 . CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leucemia Mielóide Crônica

1.1.1. Características Gerais

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa, resultante da expansão clonal de uma célula tronco hematopoética pluripotente alterada (SAWYERS, 1999; FRAZER et al., 2006; MELO et al., 2007).

Caracteriza-se laboratorialmente por apresentar aumento da produção de granulócitos maduros, culminando com a leucocitose exacerbada (CHEN, et al., 2010). Constitui 14% de todas as leucemias e sua incidência anual é de 1 a 2 casos por 100.000 pessoas, acometendo principalmente os homens em relação as mulheres (na proporção de 2:1) e mais freqüentemente indivíduos na faixa etária entre 45 e 55 anos (FADERL et al., 1999).

O único fator de risco comprovado para a LMC é a exposição à radiação ionizante (DOLL; SMITH, 1968; HEHLMANN et al., 2007).

Baseado em achados clínico-laboratoriais, a LMC apresenta três estágios de evolução distintos: fase crônica, acelerada e blástica. A maioria dos pacientes com LMC é diagnosticada na fase crônica, na qual se observa a elevação do número de granulócitos jovens que preservam suas funções (MELO et al., SHERBENOU; DRUKER, 2007). Na fase crônica grande parte dos pacientes é assintomática (20-40% dos casos) ou apresenta sinais e sintomas inespecíficos, tais como fadiga, anorexia, cansaço e sudorese.

Os fenótipos das fases acelerada e blástica são mais diversos quando comparados a fase crônica (CHEN et al., 2010; WONG; WITTE, 2004).

A fase acelerada pode surgir em meses ou anos depois do diagnóstico da doença, dependendo principalmente da resposta do paciente ao tratamento instituído na fase crônica. Esta fase caracteriza-se pelo aumento do número de blastos e basófilos circulantes e alteração significativa na contagem de trombócitos. Na medula óssea há blastos, porém a contagem fica abaixo de 20% (COTTA e BUESO-RAMOS, 2007).

A fase blástica caracteriza-se pelo aumento de blastos (>20%) na medula óssea e sangue periférico, leucocitose e basofilia no sangue periférico, anemia e trombocitopenia (FADERL et al., 1999). Nessa fase, ocorre falha na maturação dos precursores mielóides malignos, que frequentemente possuem anormalidades citogenéticas adicionais o que resulta na agudização da LMC, a doença progride para leucemia linfóide ou mielóide aguda (HEANEY et al., 2007; CHAUFFAILLE, 2009).

O fenótipo agressivo da crise blástica sugere que diferentes anormalidades oncogênicas como trissomia do cromossomo 8, perda da função de genes supressores de tumor como p16 e p53 poderiam levar à transição da fase crônica para a blástica (CHEN et al., 2010; MICHOR, 2007; MITELMAN, 1993, JENNINGS & MILLS, 1998).

1.1.2. Leucemia Mielóide Crônica e o BCR-ABL

Em 1960, o sinal patognomônico da LMC foi descrito por Nowel e Hungerford, o cromossomo Philadelphia (Ph). Esta descoberta foi a primeira demonstração de um rearranjo cromossomal ligado a patogênese de um câncer específico. Esse marcador citogenético da LMC, foi identificado como resultante de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos $t(9;22)q(34;11)$. Dessa translocação surge o cromossomo 22 encurtado, denominado cromossomo Philadelphia (NOWEL; HUNGERFORD, 1960; WESTBROOK, 1992) (Figura 1), e o neogene *bcr-abl1* que codifica a oncoproteína BCR-ABL com elevada e constitutiva atividade tirosina-quinase (DI BACCO et al., 2000; NEVIANI et al, 2007).

Assim, o neogene *bcr-abl1* é o responsável pelo fenótipo maligno das células leucêmicas, pois determina a transformação da célula progenitora hematopoética normal em maligna por meio de três mecanismos principais: induz na célula a resistência à apoptose, adesão alterada ao estroma medular e alto potencial mitogênico. Portanto, pacientes com LMC, apresentam células precursoras hematopoéticas e do sangue periférico malignas mais resistentes à apoptose do que as células normais, devido à expressão da tirosina-quinase Bcr-Abl. Estas alterações nos mecanismos reguladores da proliferação e morte da célula progenitora culminam

no acúmulo de células leucêmicas BCR-ABL positivas encontradas na LMC. (NEVIANI, 2007).

Daley e colaboradores, em 1990, por meio de experimentos com modelos murinos que mimetizavam a doença, detectaram que a proteína quimérica BCR-ABL estava associada ao desenvolvimento da LMC. Nesses modelos, o camundongo, após ter sido transplantado com medula óssea, cujas células apresentavam um vetor retroviral com Bcr-Abl, desenvolveu síndrome mieloproliferativa com as características da LMC.

A instabilidade genética, consequência da translocação que originou o cromossomo Ph, é provavelmente a responsável pelas aberrações cromossômicas ou mutações adicionais nas células leucêmicas (CILLONI; SAGLIO, 2009)

Ao ocorrer a translocação entre os cromossomos 9 e 22, diferentes tamanhos de proteínas como p190, p210 e p230 kDa, podem ser originados, dependendo do sítio de quebra do gene Bcr. A proteína de tamanho p210 é a mais freqüente e está associada com a patogênese da LMC e à indução de apoptose por drogas citostáticas e radiação ionizante (NISHII et al, 1996), enquanto a p190 está ligada ao pior prognóstico da doença. A p230 está associada com a leucemia neutrofílica crônica, forma mais indolente da doença (BRECCIA et al., 2011; DI BACCO et al., 2000; NEVIANI et al., 2007).

Figura 1 – Cariótipo de paciente com LMC indicando a presença do Cromossomo Philadelphia. As setas representam os cromossomos originados pela translocação $t(9;22)(q34;q11)$. Figura adaptada de: www.fleury.com.br (acessado em fevereiro, 2011).

1.1.3. Leucemia Mielóide Crônica e Apoptose

A apoptose, processo fisiológico de morte celular programada, desempenha importante papel na homeostase dos diferentes tecidos e controla, inclusive, o sistema hematopoético (MAURILLO et al., 2001).

A resistência anormal à apoptose pode conduzir ao aparecimento de neoplasias e doenças auto-imunes (RAMENGHI et al., 2000) devido a persistência de células mutantes ou transformadas, enquanto que sua exacerbação acarreta o surgimento de doenças agudas neurodegenerativas e neuromusculares (RATHMELL; THOMPSON, 2002).

O fenômeno da apoptose celular quando iniciado promove a ativação de eventos moleculares, que culminam na ativação de certas proteases, denominadas caspases, as quais são responsáveis pelo desmantelamento e morte celular (AMARANTE-MENDES; GREEN, 1999). A regulação deste processo é realizada por fatores inibidores e ativadores da cascata apoptótica, entre os quais podemos destacar os receptores de morte (“death receptors”) pertencentes à família do receptor de TNF- α (SUDA et al., 1993), as proteínas pertencentes às famílias Bcl-2, IAPs, FLIPs, Caspases, ou ainda fatores de supressão de tumores com p53, entre outros. (HALE et al., 1996; BORNER, 2003). O equilíbrio das interações entre as proteínas pro- e anti-apoptóticas definem a ocorrência da morte celular.

A apoptose pode ser desencadeada por duas vias, a via extrínseca (figura 2) e a via intrínseca (figura 3). A chamada via extrínseca é iniciada pela ligação dos receptores de morte (“DR, Death Receptors” - Fas/CD95, TNFRI, DR3, DR4, DR5 e DR6), aos seus respectivos ligantes. Os DR são moléculas existentes na superfície celular que apresentam um domínio extracelular rico em cisteína e um domínio intracelular denominado DD (“death domain”). A interação receptor-ligante leva a uma interação homofílica de receptor-adaptador citoplasmático de domínio de morte. O adaptador de proteína Fas associado ao DD (FADD) permite o recrutamento da pro-caspase 8, formando o complexo DISC (Death-inducing signaling complex). A pró-caspase 8 é autoclivada e transformada em caspase 8 ativa, sendo então liberada para o citoplasma, onde poderá agir diretamente na ativação da caspase 3 (fase executora do processo de apoptose), ou então agir na clivagem da molécula Bid, a qual se dirige à mitocôndria, induzindo a liberação de citocromo c e SMAC. A

clivagem de Bid representa um ponto de interconecção entre as vias extrínseca e intrínseca da apoptose (AMARANTE-MENDES; GREEN 1999; ZIVNY et al., 2010). Por outro lado, a via intrínseca começa pela ação de diferentes sinais de estresse intracelular, tais como irradiação, agentes quimioterápicos, vírus, bactérias e ausência de fatores de crescimento celular, os quais convergem para a mitocôndria, induzindo a translocação de citocromo c e SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases) destas organelas para o citosol, resultando, na presença de APAF-1, na ativação de moléculas de caspase-9. A via executora do processo de apoptose é comum a ambas vias iniciadoras caracteriza-se pela ativação das caspases executoras, a saber, caspases-3, -6 e -7, e pelo desmantelamento celular característico da apoptose (DU et al., 2000 ; SHARMA et al., 2000; SUSIN et al., 1999).

A regulação da via mitocondrial é realizada pelos membros da família Bcl-2, proteínas citoplasmáticas capazes de integrar sinais de sobrevivência ou morte celular gerados nos meios intra e extracelulares (BORNER, 2003). Essa família subdivide-se em duas classes: proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 e A1), cuja função é proteger a célula da morte, e pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bid, Bmf etc), que sensibilizam ou conduzem a célula à apoptose (BORNER, 2003). As proteínas inibidoras interferem na formação do complexo APAF-1/caspase 9 por meio do bloqueio da liberação do citocromo C ou SMAC/DIABLO da mitocôndria (BORNER, 2003). As proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak e Bad) ativam-se quando interagem com a molécula tBid, liberada pela clivagem da proteína Bid pela caspase-8. A via mitocondrial também é susceptível a regulação negativa pelas proteínas da família dos IAPs (c-IAP-1 e -2, X-IAP e Survivina), as quais podem inibir as caspases-3 e -9, mas são bloqueadas pelo SMAC (HUANG 2002; SHI 2002).

Como citado anteriormente, a ausência ou diminuição da expressão das proteínas pró-apoptóticas estão associadas ao aparecimento de infecções recorrentes, doenças hematológicas (linfomas e leucemias), autoimunes e resistência a drogas (SHARMA et al., 2000). Em contraste, a exacerbação dessa expressão obtida por meio da utilização de radioterapia, antineoplásicos, imunoterápicos no tratamento de tumores sólidos ou leucemias conduz a cura de doenças (GUILHOT; LACCOTTE 1998; SHARMA et al., 2000). Ainda neste contexto, anormalidades concernentes à expressão das proteínas anti-apoptóticas também culminariam em doenças.

A elucidação dessas anomalias em diferentes doenças poderia colaborar com a escolha e/ou modulação do tratamento dessas doenças. Por exemplo, o proto-oncogene *bcl-2*, presente na membrana mitocondrial interna de várias linhagens celulares, inibe a ativação do fenômeno da apoptose, com o aumento de sua expressão em linfócitos, células precursoras hematopoéticas e tumorais, promovendo a resistência celular à apoptose (HOCKENBERY, et al., 1991).

Outro dado a ser ressaltado, é o fato de que a citotoxicidade mediada pelas células T e NK contra células tumorais pode ser exercida pela via de ativação do sistema Fas-FasL, todavia células tumorais podem evadir da resposta imune pela via Fas-FasL. Assim, células leucêmicas ou tumorais que secretam ou expressam o antígeno FasL podem promover a apoptose de células efectoras, impedindo que estas atuem na erradicação do clone tumoral (LICKLITER, et al., 1999). O antígeno FasL presente nas células tumorais, quando ligado ao antígeno Fas das células efectoras, conduziria à apoptose da célula efectora, diminuindo o pool circulante de células da resposta imune. Por isso, a necessidade da observação do nível de expressão dos antígenos Fas nas células da resposta imune e FasL nas células precursoras malignas.

É sabido que, na LMC, as células precursoras hematopoéticas malignas são mais resistentes à apoptose do que as células normais, devido à expressão da tirosina-quinase *bcr-abl/1* que prolonga a sobrevivência da célula. A proteína BCR-ABL parece exercer sua capacidade antiapoptótica, por meio do aumento da expressão das proteínas BCL-2 e BCL-X_L nas células malignas (SANCHEZ-GARCIA ;MARTIN-ZANCA, 1997).

Handa e colaboradores (1997) relataram que, na LMC, a expressão da proteína Bcl-2 aumenta com a progressão da doença, o que suporta a hipótese de que seja a expressão desta proteína, em altos níveis, que prolongaria a sobrevivência da célula leucêmica e a torna resistente a apoptose enquanto que Wei et al (2007) demonstraram que o perfil das proteínas reguladoras da apoptose tem relação com a resposta aos inibidores de TK. O antígeno Fas parece estar expresso em níveis normais nas células malignas dos pacientes portadores de LMC na fase crônica, mas devido a alta expressão do BCL-2, as células malignas apresentam resistência à apoptose (RAVANDI, et al., 2001). A correlação entre a patogênese/prognóstico da LMC com as demais proteínas reguladoras do processo de apoptose tem sido pouco

investigada, no entanto como a célula precursora maligna presente na doença é resistente à apoptose, esta abordagem precisa ser melhor explorada.

Algumas modalidades de tratamento da LMC, como os inibidores da tirosina-quinase, parecem objetivar a inibição da proliferação celular, da atividade quinase e potencialização da apoptose. Mesmo com a eficiência dessa terapia há ainda pacientes que apresentam progressão da doença ou mesmo refratariedade às terapias.

Assim sendo, a descrição de substâncias capazes de tornar essas células mais sensíveis à apoptose poderiam colaborar no aumento da eficácia dos inibidores de tirosina quinase no tratamento dessa doença.

Figura 2 – Esquema representando a via extrínseca da apoptose. Figura adaptada de PEREIRA e AMARANTE-MENDES, 2011.

Figura 3 – Esquema representando a via intrínseca da apoptose. Figura adaptada de PEREIRA e AMARANTE-MENDES, 2011.

1.1.4. Tratamento da LMC

O tratamento clínico da LMC pode ser realizado por meio da quimioterapia (hidroxicarbamida), inibidores da enzima tirosina-quinase (STI571 ou mesilato de imatinibe ou Glivec®; dasatinibe e nilotinibe) e transplante de medula óssea (TMO). Dentre esses, o mesilato de imatinibe (MI) é escolhido como primeira linha do tratamento de LMC para a maioria dos pacientes diagnosticados na fase crônica (BRECCIA et al., 2011).

O MI demonstrou ser 10 vezes mais potente do que IFN- α no controle da doença (GOLDMAN, 2004). Seu mecanismo de ação consiste em ocupar, e conseqüentemente bloquear, o sítio catalítico da molécula BCR-ABL na região de ligação ao ATP. Dessa forma, a atividade enzimática da proteína BCR-ABL é suprimida e a célula leucêmica morre. Um dos grandes trunfos do mesilato de imatinibe é sua alta especificidade; ele liga-se quase que exclusivamente a BCR-ABL, além de algumas outras tirosina-quinases, como c-kit e receptor de PDGF (BRECCIA et al., 2011; BUCHDUNGER et al., 2000), com o que praticamente não provoca efeitos colaterais (JOHN et al., 2004). Além de impedir o avanço da

leucemia, por bloquear a progressão para a fase acelerada ou blástica, o mesilato de imatinibe normaliza a contagem de leucócitos no sangue periférico em 98% dos casos, o que configura remissão hematológica (KANTARJIAN et al., 2002 e 2003).

Os pacientes nas fases acelerada e blástica apresentam boa resposta inicial ao mesilato de imatinibe, após 4 semanas, 69% dos pacientes que começaram a ser tratados na fase acelerada e 15% daqueles já na fase blástica respondem ao tratamento, o que até então não havia sido reportado para nenhum outro fármaco (TALPAZ, 2002; SESSIONS, 2007). Apesar dos avanços obtidos com a utilização do MI no tratamento dos pacientes com LMC, vários mecanismos de resistência das células leucêmicas a esse tratamento já foram descritos e células BCR-ABL positivas persistem na medula óssea e sangue periférico mesmo após a terapia. As principais causas dessa resistência são: presença de mutações no sítio catalítico de Bcr-Abl, duplicação do cromossomo Philadelphia, superexpressão do gene *bcr-abl* e redução na captura do composto devido a superexpressão de glicoproteína P (Pgp) ou, alternativamente, por metabolização excessiva (RADICH, 2010; MAHON et al., 2000; GORE et al., 2001; SHAH et al., 2002; AZAM et al., 2003).

Outras opções para o tratamento dos pacientes resistentes ao MI seriam o dasatinibe e o nilotinibe. Medicamentos mais potentes que o MI, mas que também são ineficientes nos pacientes em fases acelerada, blástica ou portadores da mutação T315I (SHERBENOU; DRUKER, 2007). Um número de novos inibidores de TK, como o Bosutinibe e Sarafenib, estão em desenvolvimento (JABBOUR et al., 2009).

A persistência de células BCR-ABL positivas nos pacientes em tratamento com o mesilato de imatinibe indica que a inibição da atividade de tirosina-quinase de Abl talvez não seja suficiente para erradicar todas as células leucêmicas. Assim sendo, a identificação de novos fármacos que induzam a morte da célula leucêmica BCR-ABL positiva ou potencializem a ação do mesilato de imatinibe seria de fundamental importância para o tratamento de pacientes com LMC resistentes ao inibidor de tirosina-quinase.

1.2. Venenos, L-aminoácido-oxidase, e Apoptose

As toxinas animais têm sido importantes instrumentos para ampliar os conhecimentos sobre a fisiologia humana e farmacologia. Informações sobre a natureza e mecanismos de ação das toxinas permitiram a evolução do tratamento de suas intoxicações baseada em informações mais científicas e, portanto, mais eficientes (BERTAZZI et al., 2005).

Os venenos da maioria das serpentes são constituídos por toxinas, em concentrações variadas, as quais incluem: neurotoxinas, citotoxinas, cardiotoxinas, proteínas que agem na hemostasia (proteases) e peptídeos (desintegrinas, peptídeos potenciadores da bradicinina/inibidores da enzima conversora de angiotensina), oxidases (L-aminoácido oxidase), hialuronidases, metaloproteases e lectinas (DUERRE et al., 1975; MATSUI et al., 2000, RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; SARRAY et al., 2004).

O gênero *Bothrops* encontrado em todo o Brasil é o responsável pela maioria dos acidentes ofídicos brasileiros (EVANGELISTA, et al., 2010). A ação de seu veneno é proteolítica, coagulante e hemorrágica (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; QUEIROZ et al., 2008).

Da Silva e colaboradores, em 1996, mostraram que o veneno de *Bothrops jararaca* apresentou efeito antitumoral nas células de Tumor Ascítico de Ehrlich e que este efeito antitumoral deve ser devido ao efeito anti-proliferativo celular associado indiretamente com a resposta inflamatória mediada por IL-2, IL-8 e TNF- α .

Outros pesquisadores demonstraram, por exemplo, a atividade anticarcinogênica do veneno da cobra Indiana monocellate, estudada recentemente em modelos de leucemia, carcinoma e sarcoma (GOMES et al., 2010; DEBNATH et al., 2007; KARTHLEYAN et al., 2008).

Os componentes biologicamente ativos que se encontram em maior quantidade nos venenos das serpentes do gênero *Bothrops* são: fosfolipase A₂, metaloproteases, serinoproteases, LAAOs, fatores de crescimento dos nervos (NGF) e lectina tipo C, proteínas ricas em cisteína (CORREA-NETTO et al., 2010). Dentre este conjunto complexo de componentes tóxicos e não tóxicos destaca-se a LAAO,

que representa de 1 a 9% do total das proteínas do veneno (IZIDORO et al., 2006).

As L-Aminoácido Oxidases (LAAOs, EC 1.4.3.2) são flavoenzimas que catalizam a deaminação oxidativa de L-aminoácidos em α -cetoácido com a produção de amônia e peróxido de hidrogênio. As LAAOs são usualmente glicoproteínas homodiméricas ligantes de FAD, com uma massa molecular entre 110 e 150 kDa, quando medidas por filtração em gel em condições não-desnaturantes.

Esta versátil classe de enzimas está amplamente distribuída em várias espécies de seres vivos, como nas peçonhas de serpentes, insetos, fungos, bactérias e até mesmo plantas (TAN ;FUNG, 2008; DU & CLEMETSON, 2002).

As LAAOs são substâncias de grande interesse na área científica, por apresentarem alto potencial citotóxico sobre diversos patógenos, linhagens celulares tumorais, fungos e vírus (LEE et al., 2011; SUN et al., 2010; WEI et al., 2009; ZULIANI et al., 2009; DU e CLEMETSON, 2002). O efeito farmacológico desta enzima ainda é incerto (TORRES et al., 2010; TORII et al., 1997), contudo trabalhos recentes descrevem amplos efeitos biológicos e farmacológicos como, indução de apoptose (YAN, 2006; 2005), citotoxicidade, indução e/ou inibição de agregação plaquetária, hemorragia, hemólise, edema, atividade bactericida, leishmanicida e anti-HIV (SUN et al., 2011; STILES et al., 1991; SUHR e KIM, 1996; SOUZA et al., 1999; SAKURAI et al., 2001 e 2003; DU e CLEMETSON, 2002; SAMEL et al., 2006; STABELI et al., 2007). Muitos dos efeitos biológicos de LAAOs são creditados aos efeitos secundários do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzido durante a reação enzimática e que induz a apoptose celular (RODRIGUES et al., 2009; DU; CLEMETSON, 2002; LEWIS; GARCIA, 2003; ANDE et al., 2006).

Apesar dos numerosos estudos publicados sobre as LAAOs e suas atividades biológicas, pouco se sabe sobre a ação do veneno e da LAAO de *B. pirajai*, conhecida popularmente como “jararacussu da Bahia (COSTA et al., 1999). Investigações demonstraram o efeito citotóxico da LAAO de *Bothrops pirajai* (BpirLAAO) em linhagens celulares de tumor S180, câncer de mama, leucemia aguda de células T e tumor Ascítico de Erlich (IZIDORO et al., 2006). O efeito observado nesse último caso foi dose dependente sobre as células tumorais e parece estar relacionado também a produção de peróxido de hidrogênio (IZIDORO et al., 2006).

Nesse contexto, a L-aminoácido oxidase de *Bothrops pirajai* torna-se interessante para a investigação sobre células leucêmicas BCR-ABL positivas para possível descrição de tratamento mais eficiente para pacientes com LMC.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o potencial do veneno bruto e da enzima LAAO de *Bothrops pirajai* em induzir apoptose nas células BCR-ABL positivas.

2.2. Específicos

A) determinar as doses do veneno bruto e da LAAO de *Bothrops pirajai* capazes de induzir apoptose em células HL-60 e HL-60.BCR-ABL;

B) verificar se a morte celular nessas linhagens é desencadeada pela via intrínseca ou extrínseca da apoptose;

C) checar se a LAAO sensibiliza a morte de células HL-60.BCR-ABL pelo inibidor de tirosina-quinase mesilato de imatinibe

D) avaliar se a LAAO, em baixas concentrações, modula a expressão de genes pró e anti-apoptóticos que controlam a apoptose celular em células HL-60 e HL-60.BCR-ABL.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares, veneno bruto e L-aminoácido oxidase de *Bothrops pirajai*

Foram empregadas nesse estudo as linhagens celulares HL-60 (célula derivada de leucemia pró-mielocítica) e HL-60.BCR-ABL. Esta última, cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Gustavo Amarante Mendes do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

A HL-60.BCR-ABL é originada da infecção de células HL-60 selvagens com retrovírus recombinante, obtidas por meio da transfecção por eletroporação da combinação de células empacotadoras das linhagens PA317 e ψ 2 com o plasmídeo pSR α MSVp185bcr-abl tkneo, contendo o gene *bcr-abl*. Quando comparada a célula HL-60 vetor e selvagem, essa célula transfectada com o gene *bcr-abl* é extremamente resistente à apoptose induzida por agentes apoptogênicos clássicos como actinomocina-D, teniposídeo, etoposídeo, vincristina, citarabina, estaurosporina e ciclofosfamida (BRUMATTI et al., 2003; AMARANTE-MENDES, et al., 1997 e 1998).

O veneno bruto e o componente biologicamente ativo L-aminoácido oxidase (LAAO) da *Bothrops pirajai* foram fornecidos pela Profa. Dra. Suely Vilela da FCFRP-USP e pelo Dr. Andreimar Martins Soares. A enzima LAAO purificada e utilizada nesse estudo apresentou grau de pureza superior a 95%.

3.2. Cultivo celular

As linhagens celulares encontravam-se congeladas em nitrogênio líquido e continham aproximadamente 1×10^7 células/mL de solução de congelamento (soro bovino fetal, 10% DMSO). O descongelamento deu-se submergindo o flaconete com as células em recipiente de água a 37°C até que as mesmas se desgrudassem da parede do tubo. Assim sendo, as células foram depositadas em 10 mL de meio RPMI completo (suplementado com 10% soro bovino fetal, 2mM glutamina, 100UI/mL penicilina, 100 μ g/mL estreptomicina e 25mM HEPES) e centrifugadas a

240 x g a 4°C por dez minutos. Após esse procedimento as células foram ressuspensas em 1mL de meio RPMI, contadas em azul de tripan na câmara de Neubauer e plaqueadas para cultivo.

Após estabelecimento do crescimento celular de modo exponencial, as linhagens celulares foram empregadas nos experimentos com o veneno bruto e LAAO. Os ensaios foram realizados somente quando a viabilidade celular, verificada pelo método do azul de tripan, estava superior a 95%.

3.3. Ensaios de Indução de Apoptose

Esses experimentos foram realizados para avaliar se o veneno bruto e a LAAO eram capazes de induzir a apoptose nas linhagens celulares HL-60 e HL-60.BCR-ABL. As células foram plaqueadas na concentração de 2×10^4 por poço em placas de 96 poços na presença e na ausência do VB e da LAAO de *Bothrops pirajai* para padronização da técnica e das doses a serem utilizadas nos experimentos subsequentes.

Foram utilizadas durante a padronização dos ensaios as concentrações de 0,05 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 5,0 µg/mL, 7,5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL do veneno bruto e 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 1,5 µg/mL, 2,0 µg/mL, 2,5 µg/mL e 5 µg/mL de LAAO, além da realização dos controles negativo (somente células) e positivo (células na presença do indutor de apoptose clássico).

As células HL-60 e HL-60.BCR-ABL foram plaqueadas na concentração de 2×10^4 /poço e incubadas na presença ou ausência dos tratamentos citados anteriormente por 12 e 18 horas.

O controle positivo de indução de apoptose foi realizado com células plaqueadas com o agente apoptogênico Actinomicina (ACT-D) (Sigma®, St Louis, Missouri, EUA) na concentração de 1µM. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

Após a incubação das células com o VB e LAAO por 12 e 18 horas as células foram recuperadas dos poços, centrifugadas e submetidas à avaliação da apoptose celular pelo método de *Hypotonic-Fluorescent-Solution* (HFS, solução hipotônica

fluorescente). Os resultados obtidos foram expressos pela média da percentagem de núcleos hipodiplóides das amostras obtidas em três experimentos independentes.

Após padronização dos testes foram iniciados os ensaios para determinação do efeito da LAAO sobre as linhagens celulares.

Foram plaqueadas as células HL-60 e HL-60.BCR-ABL na concentração de 1×10^5 por poço e incubadas durante 18 horas com os diferentes tratamentos. Após esse período, as células foram recuperadas dos poços, centrifugadas por $240 \times g$ a 4°C durante dez minutos e submetidas à avaliação da apoptose pelo método HFS.

As células recuperadas dos poços da cultura após exposição ao veneno bruto, LAAO e agente apoptogênico foram incubadas com solução HFS (iodeto de propídeo $50 \mu\text{g/mL}$ em citrato de sódio 0,1% e Triton X-100 0,1%) por 15 minutos e analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto, BD) pelo software DiVa.

A percentagem de morte celular destes ensaios foi quantificada avaliando-se o conteúdo de DNA genômico (percentagem de núcleos hipodiplóides), visto que as células foram marcadas com iodeto de propídio (PI) e os espectros de emissão de luz pelos fluorocromos foram analisados no citômetro de fluxo (FACSCanto, BD, San Jose, Califórnia, EUA), detector FL2, com *gate* retirando apenas *debris*. Foram adquiridos e analisados cinco mil eventos da *gate* por meio de gráficos em formato de histograma. A avaliação do conteúdo de DNA foi feita por meio da incorporação de PI em núcleos isolados. Dessa forma, os núcleos de células saudáveis exibem incorporação compatível com conteúdo diplóide ou tetraplóide, presente em células em fase G0-G1 ou G2-M, enquanto que núcleos apoptóticos aparecem na região hipodiplóide do histograma, devido à fragmentação ou maior condensação da cromatina (NICOLETTI et al, 2006; BRUMATTI et al., 2003).

A figura 4 mostra os gráficos de citometria de fluxo obtidos durante a análise da percentagem de células em núcleos hipodiplóides pelo método de HFS. Na figura 4A o histograma refere-se ao controle negativo do experimento, ou seja, o HFS de células HL-60.BCR-ABL não tratadas, enquanto que a figura 4B ilustra a análise de células HL-60.BCR-ABL tratadas com LAAO. Observa-se na figura 3B que a LAAO induziu a apoptose nas células HL-60.BCR-ABL, pois há marcação dos núcleos hipodiplóides com iodeto de propídio.

Figura 4 – Análise da percentagem dos núcleos hipodiplóides de células HL-60.BCR-ABL pelo método HFS por citometria fluxo. 4A) Controle negativo do ensaio. 4B) Células HL-60.BCR-ABL tratadas com LAAO na concentração de 2,5µg/mL. O histograma indica a intensidade de fluorescência (percentagem) dos núcleos hipodiplóides (células em apoptose) marcados com iodeto de propídio (P2) e núcleos diplóides (P1, células viáveis).

3.4. Detecção das caspases 3, 8 e 9 por *western-blot*

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

Assim sendo, 1×10^6 células HL-60 e HL-60.BCR-ABL foram cultivadas com as diferentes concentrações de LAAO (0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 1,5 µg/mL, 2,0 µg/mL e 2,5 µg/mL), sem estímulo (controle negativo) e estimuladas com ACT-D 1µM (controle positivo) por 18h. Após esse período as células foram coletadas e ressuspensas em tampão de amostra para *western-blot* (5% de mercaptoetanol, 4% de SDS, 20% de glicerol e 100mM Tris-CL-pH 6).

O lisado protéico das linhagens HL-60 e HL-60.BCR-ABL foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membrana de PVDF para detecção das caspases. As membranas de *western-blot* foram bloqueadas em tampão de lavagem com 5% de leite desnatado por 12 horas à temperatura ambiente (TA) e subsequentemente incubadas com os anticorpos primários específicos desejados.

Os anticorpos primários utilizados foram: anticorpo monoclonal de camundongo anti-caspase 8 humano na diluição de 1:1000 (código 551243; BD Pharmingen®, San Diego, Califórnia, EUA), anticorpo policlonal de coelho anti-caspase 3 humano na diluição 1:1000 (código 235412, Calbiochem®, Darmstadt, Germany), anticorpo monoclonal de camundongo anti-caspase 9 humano na diluição 1:250 (código 63103; SIGMA, San Louis, Missouri, EUA) e anticorpo policlonal de coelho anti tubulina 1:5000, (código T3320; SIGMA, San Louis, Missouri, EUA), empregada para marcar a proteína endógena das amostras investigadas.

Esses anticorpos foram diluídos, nas concentrações indicadas em solução de bloqueio contendo 0,01% azida por período que variou de 16h à 72h, em temperatura ambiente. Após três lavagens das membranas com tampão TBS-T (20 mM de Tris-CL-pH 6, 137 mM NaCl e 0,1% de Tween), essas foram incubadas com os anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho conjugados à peroxidase na diluição de 1:2000 (Amersham Biosciences®, GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, Pensilvânia, EUA) por uma hora a temperatura ambiente (TA). A detecção da marcação foi realizada pelo método de quimioluminescência (Amersham ECL Plus®, GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, Pensilvânia, EUA).

3.5. Detecção do efeito da associação do Mesilato de Imatinibe com a LAAO

O efeito da LAAO e da LAAO associada ao Mesilato de Imatinibe (MI) (Novartis Pharma AG, Suíça) sobre a atividade quinase de BCR-ABL e quanto ao potencial indutor de apoptose foi avaliado em células HL-60.BCR-ABL.

Células HL-60.BCR-ABL na concentração de 1×10^6 foram plaqueadas em placas de 24 poços da seguinte forma: controle negativo; células com MI na concentração de 10 μ M por 18h; células, MI na concentração de 10 μ M e LAAO nas concentrações de 0,5 μ g/mL, 1,0 μ g/mL, 1,5 μ g/mL, 2,0 μ g/mL e 2,5 μ g/mL por 18 horas. Paralelamente, 1×10^6 dessas células foram cultivadas junto ao MI na concentração de 10 μ M por 2h horas para observar diferença do perfil de inibição da atividade quinase entre 2 e 18h de incubação com o fármaco.

Após os períodos correspondentes de incubação, as células foram coletadas dos poços, colocadas em tampão HFS e de amostra de *western-blot*.

A quantificação da apoptose das células HL-60.BCR-ABL tratadas com a associação LAAO e MI, nas diferentes concentrações por 18h, foi determinada pelo método de HFS, cuja técnica está descrita no item III.3 dessa dissertação.

Para avaliar a potencial inibição da atividade quinase de BCR-ABL pela LAAO foi realizado o *western-blot* nos lisados protéicos celulares para detecção de fosfotirosina.

Assim, amostras da enzima LAAO previamente incubadas (nas concentrações: 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 1,5 µg/mL; 2,0 µg/mL e 2,5 µg/mL) por 18h foram utilizadas.

O lisado protéico das amostras foi submetido ao SDS-PAGE para separação das proteínas, que foram posteriormente transferidas para membrana de PVDF (BRUMATTI et al., 2003). As membranas de western blot foram bloqueadas em tampão de lavagem com 5% de BSA por 3 horas à TA e subsequente incubadas com o anticorpo monoclonal anti-fosfotirosina (PY) (UpstateBiotech Inc., Lake Placid, NY, USA, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Gustavo Amarante-Mendes, do Instituto de Ciências Biomédicas / USP) diluído 1:2000 em tampão de bloqueio (por 12 horas, em temperatura ambiente. Após três lavagens de 10 minutos com TBS-T, os *blots* foram incubados com anticorpo secundário anti-camundongo conjugados à peroxidase na diluição de 1:2000 (Amersham Biosciences®, GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, Pensilvânia, EUA) por uma hora a TA. A detecção da marcação foi realizada pelo método de quimioluminescência (Amersham ECL Plus®, GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, Pensilvânia, EUA).

Após os experimentos descritos acima neste item, as amostras utilizadas nos ensaios de associação LAAO + MI; LAAO sem MI e amostras de HL-60 já armazenadas em tampão de amostra foram novamente transferidas para membrana de PVDF. Como descrito anteriormente, as membranas de western blot foram bloqueadas em tampão de lavagem com 5% de BSA por 3 horas à TA e subsequente incubadas com o anticorpo monoclonal ant-c-abl (código MAB1130; Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) diluído 1:250 em tampão de bloqueio por 5 horas, em temperatura ambiente. Após três lavagens de 10 minutos com TBS-T, os *blots* foram incubados com anticorpo secundário anti-camundongo conjugados à peroxidase na diluição de 1:3000 (Amersham Biosciences®, GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, Pensilvânia, EUA) por uma

hora a TA. A detecção da marcação foi realizada pelo método de quimioluminescência (Amersham ECL Plus[®], GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, Pensilvânia, EUA).

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

Para a extração do RNA total, 3×10^6 células das linhagens previamente plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas por 18 horas na ausência e na presença da LAAO (concentrações selecionadas: 0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL para HL-60 e 1,0 µg/mL e 1,5 µg/mL para HL-60.BCR-ABL), foram coletadas dos poços após este período e lisadas com 500µL de Trizol (Invitrogen[®], Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), conforme protocolo do fabricante. O RNA foi recuperado da fase aquosa pela adição de clorofórmio e centrifugação. Em seguida, a fase aquosa contendo o RNA foi submetida à precipitação com isopropanol e centrifugação. O precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 13 µL de água livre de RNases e DNases. A concentração de RNA total foi quantificada em espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm.

O RNA extraído das células foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%, que foi realizada à corrente elétrica de 80 Volts durante 50 minutos e as bandas 28S, 18S e 5S. Devido à utilização do corante gel-red (Biotium, Hayward, Califórnia, USA), as bandas do RNA foram visualizadas em transiluminador UV. (Figura 5)

Figura 5. RNAs extraídos de amostras de HL-60 e HL-60 BCR-ABL cultivadas na presença e ausência da LAAO e submetidos à eletroforese em gel red 1,5%. Observa-se a visualização das bandas 28S, 18S e 5S do RNA.

Para obtenção do cDNA, foi utilizado o kit High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), sendo utilizado 1 µg de RNA por reação e o seguinte ciclo: 25°C por 10 minutos e a 37°C por duas horas no equipamento Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

Os cDNA das linhagens foram utilizados nos ensaios de PCR em tempo real para quantificação da expressão dos genes pró e anti-apoptóticos. Para a amplificação e quantificação dos cDNA por real time PCR utilizou-se o Kit SybrGreen Quantitect (Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA) e o aparelho ABIPrism 7700 (Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA).

Para tanto, oligonucleotídeos (primers) específicos foram desenhados para a amplificação dos genes pró-apoptóticos (*fas*, *fasl*, *bax*, *bad*, *bak*, *bim_{EL}*, *bid*) e anti-apoptóticos (*a1*, *bcl-w*, *bcl-x_L*, *bcl-2*, *c-flip*) (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) (tabela 1). Os programas utilizados no processo de amplificação das amostras foram padronizados anteriormente pela equipe do laboratório. Foram empregados como controle da qualidade da amplificação e síntese de cDNA o gene *actina*, como “housekeeping” gene (gene endógeno). Os resultados foram expressos pelos 2^{-ddCt} , que é calculado considerando-se a razão entre o gene testado e o gene endógeno (β -*actina*) em relação à linhagem HL-60 (calibrador) ou HL-60.BCR-ABL (calibrador).

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos cDNAs das moléculas envolvidas na apoptose celular, tamanho do fragmento amplificado e temperatura de anelamento (TA).

Oligonucleotídeo	Sequências (5'→3')	Produto (Pb)	TA (°C)
<i>bax</i>	F: CCC TTT TGC TTC AGG GTT TC R: TCT TCT TCC AGA TGG TGA GTG	501	56
<i>bad</i>	F: CCG AGT GAG CAG GAA GAC TC R: GGT AGG AGC TGT GGC GAC T	209	60
<i>bak</i>	F: TCT GGC CCT ACA CGT CTA CC R: ACA AAC TGG CCC AAC AGA AC	201	60
<i>bid</i>	F: GCT TCC AGT GTA GAC GGA GC R: GTG CAG ATT CAT GTG TGG ATG	203	62
<i>bim_{EL}</i>	F: GCC CCT ACC TCC CTA CAG AC R: AAG ATG AAA AGC GGG GAT CT	152	59
<i>bcl-2</i>	F: ACG AGT GGG ATG CGG GAG ATG TG R: GCG GTA GCG GCG GGA GAA GTC	245	67
<i>bcl-w</i>	F: AGT TCG AGA CCC GCT TCC R: CCC GTC CCC GTA TAG AGC	308	60
<i>bcl-x_L</i>	F: CTG AAT CGG AGA TGG AGA CC R: TGG GAT GTC AGG TCA CTG AA	211	60
<i>a1</i>	F: GGC TGG CTC AGG ACT ATC R: CCA GTT AAT GAT GCC GTC	227	50
<i>fas</i>	F: CAA GGG ATT GGA ATT GAG GA R: TGG AAG AAA AAT GGG CTT TG	203	55
<i>fasL</i>	F: AGG AAA GTG GCC CAT TTA AC R: CAA GAT TGA CCC CGG AAG TA	176	55
<i>c-flip</i>	F: GCC GAG GCA AGA TAA GCA R: GCC CAG GGA AGT GAA GGT	464	54
<i>β-actina</i>	F: GCC CTG AGG CAC TCT TCC A R: CCA GGG CAG TGA TCT CCT TCT	192	58

Tabela 2 - Concentração dos oligonucleotídeos e Programa das reações de amplificação dos genes avaliados.

Gene	Ciclo	Concentração do primer
<i>bax</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 56°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM
<i>bad</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 60°C - 1 min.	6,0 pM
<i>bak</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 60°C - 1 min.	8,0 pM
<i>bid</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 63°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM
<i>bim_{EL}</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 59°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM
<i>bcl-2</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/55x: 95°C - 15 seg; 67°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM
<i>bcl-w</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 60°C - 1 min.	8,0 pM
<i>bcl-x_L</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/55x: 95°C - 15 seg; 60°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM
<i>a1</i>	50°C - 2 min; 95° - 10 min/50x: 95° - 15 seg; 50°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM
<i>fas</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 55°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM
<i>fasL</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 55°C - 25 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM
<i>c-flip</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/50x: 95°C - 15 seg; 54°C - 34 seg; 72°C - 34 seg.	10,0 pM
<i>β-actina</i>	50°C - 2 min; 95°C - 10 min/40x: 95°C - 15 seg; 58°C - 1 min.	2,5 pM

3.7. Análise Estatística

A comparação dos valores da percentagem de núcleos hipodiplóides entre as células tratadas e não tratadas com VB, LAAO e LAAO associada ao MI em diferentes concentrações e no período de 18 horas foi realizada por meio da aplicação do teste *t*.

As análises estatísticas dos resultados dos ensaios das células HL-60.BCR-ABL tratadas com a LAAO e com a LAAO associada ao MI e das células HL-60 e HL-60.BCR-ABL com VB em diferentes concentrações e nos períodos de incubação de 12 e 18 horas foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA). Foram consideradas estatisticamente significantes as análises cujo valor de *p* foi menor do que 0,05.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Indução de Apoptose da linhagem HL-60 pelo Veneno Bruto de *Bothrops pirajai*

As células foram tratadas em diferentes concentrações do veneno bruto (0,05 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 1,0 $\mu\text{g/mL}$, 5,0 $\mu\text{g/mL}$, 7,5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$) e Actinomicina-D (ACT-D) na concentração de 1 μM (controle positivo de morte) por 12 e 18 horas. Os resultados obtidos indicam que o veneno bruto é capaz de induzir apoptose em células HL-60 a partir da concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, contudo somente nas concentrações de 7,5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ que se verifica um perfil dose-dependente de veneno quanto à indução de apoptose nas células tratadas e incubadas por 12 e 18 horas (Figura 6). Analisando-se os tempos de incubação, observa-se que a morte celular foi maior quando as células foram cultivadas nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$ do veneno por 18h (Figura 6).

Assim sendo, 18h de incubação foi o período escolhido para o tratamento das células com o veneno bruto para realização dos ensaios subseqüentes.

Figura 6 – Percentagem de núcleos hipodiplóides em células HL-60 após 12 e 18 horas de incubação com o veneno bruto (VB). C: células sem tratamento (controle negativo); ACT-D: células tratadas com actinomicina-D (controle positivo). Os valores apresentados correspondem à média da porcentagem de células em apoptose obtidas em três experimentos independentes para cada tempo de incubação. * diferença significativa, com valor de $p < 0,05$, quando a variável analisada foi o tempo de incubação.

Neste ensaio, com 18 horas de incubação, observou-se indução significativa da apoptose com o VB a partir da concentração de 0,1 µg/mL. Como esperado para esta célula, a ACT-D induziu significativamente a apoptose, uma vez que a HL-60 é sensível à morte celular estimulada por essa substância, inibidora da RNA polimerase (Figura 7).

Figura 7 – Percentagem de núcleos hipodiploides em células HL-60 após 18 horas de incubação com o veneno bruto (VB). C: células sem tratamento (controle negativo); ACT-D: células tratadas com actinomicina (controle positivo). Os valores apresentados correspondem à média da porcentagem de células em apoptose obtidas em três experimentos independentes para 18 horas de incubação. * diferença significativa, com valor de $p < 0,05$, para a comparação entre as percentagens de morte celular das células tratadas e do controle negativo.

4.2. Indução de Apoptose na linhagem HL-60.BCR-ABL pelo Veneno Bruto de *Bothrops pirajai*

As células HL-60.BCR-ABL também foram tratadas com diferentes concentrações (0,05 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 5,0 µg/mL, 7,5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL) do veneno bruto de *Bothrops pirajai* e ACT-D 1 µM (controle positivo) por 12 e 18 horas. Os resultados obtidos, com relação ao tempo de incubação, para a HL-60.BCR-ABL indicam que a maior percentagem de apoptose ocorre no tempo de incubação de 18h e nas concentrações de 25 e 50 µg/mL (Figura 8).

Figura 8 – Percentagem de núcleos hipodiplóides em células HL-60.BCR-ABL após 12 e 18 horas de incubação com o veneno bruto (VB). C: células sem tratamento (controle negativo); ACT-D: células tratadas com actinomicina-D (controle positivo). Os valores apresentados correspondem à média da porcentagem de células em apoptose obtidas em três experimentos independentes para cada tempo de incubação. * diferença significativa, com valor de $p < 0,05$, quando a variável analisada foi o tempo de incubação.

Foi observada indução significativa da apoptose de células HL-60.BCR-ABL com o VB a partir da concentração de 7,5 µg/mL. Como esperado a ACT-D não induziu à apoptose em HL-60.BCR-ABL (Figura 9).

Figura 9 – Percentagem de núcleos hipodiplóides em células HL-60.BCR-ABL após 18 horas de incubação com o veneno bruto (VB). C: células sem tratamento (controle negativo); ACT-D: células tratadas com actinomicina-D (controle positivo). Os valores apresentados correspondem à média da percentagem de células em apoptose obtidas em três experimentos independentes para cada tempo de incubação. * diferença significativa, com valor de $p < 0,05$, para a comparação entre as percentagens de morte celular das células tratadas e do controle negativo.

4.3. Indução de Apoptose na linhagem HL-60 pela L-aminoácido oxidase de *Bothrops pirajai*

As células HL-60 foram tratadas com diferentes concentrações de LAAO (0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 1,5 µg/mL, 2,0 µg/mL, 2,5 µg/mL e 5,0 µg/mL) e com a ACT-D 1µM (controle positivo) por 18 horas de incubação. Os resultados demonstraram que a percentagem de morte celular da HL-60 induzida pela LAAO apresentou perfil dose-dependente (Figura 10). Foi observada indução significativa da apoptose com a LAAO a partir da concentração de 0,5 µg/mL e como esperado a ACT-D induziu a apoptose dessa célula (Figura 10).

Figura 10 – Percentagem de núcleos hipodiplóides em células HL-60 após 18 horas de incubação com a L-aminoácido oxidase. C: células sem tratamento (controle negativo); ACT-D: células tratadas com actinomicina-D (controle positivo). Os valores apresentados correspondem a média da percentagem de células em apoptose obtidas em três experimentos independentes para cada tempo de incubação. * diferença significativa, com valor de $p < 0,05$, para a comparação entre as percentagens de morte celular das células tratadas e do controle negativo.

4.4. Indução de Apoptose na linhagem HL-60.BCR-ABL pela L-aminoácido oxidase de *Bothrops pirajai*

As células HL-60.BCR-ABL foram tratadas em diferentes concentrações de LAAO (0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 1,5 µg/mL, 2,0 µg/mL, 2,5 µg/mL e 5,0 µg/mL), assim como com a ACT-D 1µM por 18 horas. Os resultados demonstraram que a HL-60.BCR-ABL também apresenta um perfil de apoptose dose-dependente de LAAO (Figura 8). Foi detectada indução significativa de apoptose de HL-60.BCR-ABL com a LAAO a partir da concentração de 1,0 µg/mL. No entanto, observou-se maior indução de apoptose a partir da concentração de 2,0 µg/mL (aproximadamente 30% de apoptose). Como esperado, a ACT-D não induziu a apoptose em HL-60.BCR-ABL (Figura 11).

Figura 11 – Percentagem de núcleos hipodiplóides em células HL-60.BCR-ABL após 18 horas de incubação com a L-aminoácido oxidase. C: células sem tratamento (controle negativo); ACT-D: células tratadas com actinomicina-D (controle positivo). Os valores apresentados correspondem à média da porcentagem de células em apoptose obtidas em três experimentos independentes para cada tempo de incubação. * diferença significativa, com valor de $p < 0,05$, para a comparação entre as percentagens de morte celular das células tratadas e do controle negativo.

4.5. Ativação das Caspases 3, 8 e 9 por *western blot*

Neste trabalho foram analisados os níveis protéicos das caspases 3, 8 e 9 das linhagens HL-60 e HL-60.BCR-ABL cultivadas na ausência e presença de LAAO. Os experimentos, foram realizados por *western-blot* com a finalidade de confirmar os resultados de indução de apoptose por citometria de fluxo e observar a possível ativação das caspases nas linhagens celulares após tratamento com a LAAO e ACT-D. Ainda nesse contexto, a detecção da ativação dessas caspases permite especulação da via pela qual a apoptose foi induzida, se extrínseca ou intrínseca.

Os resultados obtidos nos experimentos estão representados nas figuras de 12 à 17.

4.5.1. Análise da expressão protéica das caspases 3, 8 e 9 nas células HL-60

O tratamento das células HL-60 com a LAAO por 18 horas estimulou a ativação das caspases 3 (Figura 12), 8 (Figura 13) e 9 (Figura 14), sendo possível detectar esta ativação pelo desaparecimento sequencial das bandas específicas das caspases inativas. A ativação ocorreu de modo dose dependente da concentração de LAAO, ou seja quanto maior a concentração de LAAO maior ativação.

Conforme descrito, no item 3.4 em Material e Métodos, a expressão protéica do proteína endógena tubulina foi utilizada para a normalização dos valores da densidade das bandas das proteína-alvo.

Figura 12 – Ativação da caspase 3 pela LAAO em células HL-60. A diminuição da pró-caspase 3 (PM=32kDa), no lisado celular, indica ativação da apoptose das células HL-60 pela enzima LAAO. A figura mostra que a ativação da caspase 3 foi diretamente proporcional a dose da LAAO empregada no ensaio.

Figura 13 – Ativação da caspase 8 pela LAAO em células HL-60. A diminuição da pró-caspase 8 (PM=55kDa), no lisado celular, indica a ativação da apoptose de células HL-60 pela enzima LAAO. A figura mostra que a ativação da caspase 8 foi diretamente proporcional a dose da LAAO empregada no ensaio.

Figura 14 – Ativação da caspase 9 pela LAAO em células HL-60. A diminuição da pró-caspase 9 (PM=37kDa), no lisado celular, indica a ativação da apoptose da células HL-60 pela enzima LAAO. A figura mostra que a ativação da caspase 9 foi diretamente proporcional a dose da LAAO empregada no ensaio.

4.5.2. Análise da expressão protéica das caspases 3, 8 e 9 nas células HL-60.BCR-ABL

Nesta linhagem, o tratamento com a LAAO por 18 horas também culminou com o desencadeamento da apoptose celular verificada pela ativação das caspases 3 (Figura 15), 8 (Figura 16) e 9 (Figura 17). Foi possível avaliar esta ativação pelo desaparecimento de bandas específicas das proformas destas proteínas por meio de *western blot*. Conforme descrito no item 3.4 em Material e Métodos, a expressão protéica da tubulina (PM=48kDa) foi utilizada para a normalização dos valores da densidade das bandas das proteína-alvo.

Figura 15 – Ativação da caspase 3 pela LAAO em células HL-60.BCR-ABL. A diminuição da pró-caspase 3 (PM=32kDa), no lisado celular, indica a ativação da apoptose da célula HL-60.BCR-ABL pela enzima LAAO. A figura mostra que a ativação da caspase 3 foi diretamente proporcional a dose da LAAO empregada no ensaio.

Figura 16 – Ativação da caspase 8 pela LAAO em células HL-60.BCR-ABL. A diminuição da pró-caspase 8 (PM=55kDa), no lisado celular, indica a ativação da apoptose em células HL-60.BCR-ABL pela enzima LAAO. A figura mostra que a ativação da caspase 8 foi diretamente proporcional a dose da LAAO empregada no ensaio.

Figura 17 – Ativação da caspase 9 pela LAAO em células HL-60.BCR-ABL. A diminuição da pró-caspase 9 (PM=37kDa), no lisado celular, indica a ativação da apoptose em células HL-60.BCR-ABL pela enzima LAAO. A figura mostra que a ativação da caspase 9 foi diretamente proporcional a dose da LAAO empregada no ensaio.

4.6. Detecção da percentagem de núcleos hipodiplóides e da atividade de fosfotirosina na linhagem HL-60.BCR-ABL tratada com Mesilato de Imatinibe e L-aminoácido oxidase

Nesta etapa, nosso objetivo foi avaliar o potencial efeito da LAAO quando associada ao inibidor de tirosina quinase (MI) em células HL-60.BCR-ABL e o consequente efeito desta associação sobre a atividade tirosina quinase de BCR-ABL. A indução de apoptose em células HL-60.BCR-ABL foi avaliada por citometria de fluxo. Foi detectada nesse ensaio a percentagem de núcleos hipodiplóides das células HL-60.BCR-ABL tratadas por 18 horas com 10µM de mesilato de imatinibe associado a LAAO nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 µg/mL.

Os resultados obtidos mostraram aumento significativo da percentagem de apoptose celular das células HL-60.BCR-ABL, em relação aos dados obtidos quando as células foram tratadas apenas com o MI (Figura 18A) ou somente com a LAAO

(Figura 18B). Importante ressaltar que o MI sozinho e com 18h de incubação, não induziu a apoptose em células BCR-ABL+

Figura 18 – Análise da porcentagem de núcleos hipodiplóides em células HL-60.BCR-ABL tratadas com LAAO, MI e LAAO associada ao MI por 18h. (A) Comparação entre a porcentagem de núcleos hipodiplóides das células HL-60.BCR-ABL tratadas com MI e com LAAO associada ao MI por 18 horas.

* valor de $p < 0,05$, para a comparação entre as percentagens de morte celular das células tratadas e do controle negativo. **(B)** Comparação entre a porcentagem de núcleos hipodiplóides das células HL-60.BCR-ABL tratadas apenas com LAAO e com LAAO associada ao MI por 18 horas;

* $p < 0,05$

A partir dos resultados obtidos pela citometria de fluxo e na tentativa de melhor elucidar o mecanismo pelo qual a LAAO associada ao MI exerce esse efeito sobre células HL-60.BCR-ABL, foi observada a ação dessa associação sobre a atividade tirosina quinase de BCR-ABL. Assim sendo, foi detectada a expressão da fosfotirosina (PY) nos lisados proteicos das células HL-60.BCR-ABL tratadas por 18 horas com a LAAO nas concentrações (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$) e MI 10 μM por *western-blot*. Paralelamente ao ensaio de 18 horas de incubação, verificamos o perfil de atividade do MI sobre a atividade tirosina quinase das células HL-60.BCR-ABL, tratando-as por apenas 2 horas com o MI. O resultado indicou que não há diferença do efeito do MI sobre a atividade quinase de BCR-ABL entre 2 e 18 horas, sendo assim, ambos períodos são suficientes para inibir a atividade quinase de BCR-ABL.

Os dados obtidos por western blot da associação da LAAO com o MI evidenciaram que a LAAO potencializou a inibição da atividade quinase de BCR-ABL pelo MI na linhagem HL-60.BCR-ABL. O efeito da potencialização da inibição da atividade fosforilativa foi observado de forma dose-dependente de LAAO e ocorreu de forma mais proeminente a partir da concentração de LAAO de 1,5 $\mu\text{g/mL}$, confirmando os resultados obtidos pela citometria de fluxo (Figura 19A).

Uma vez observado este efeito interessante da associação da LAAO com o MI, foi checado a ação da LAAO na atividade quinase de BCR-ABL, sem o MI. Para isto, um novo western blot para fosfotirosina foi realizado com os lisados protéicos das células HL-60.BCR-ABL cultivadas com a LAAO nas mesmas concentrações (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$) por 18 horas. Neste ensaio, observou-se que a partir da concentração de 1,5 $\mu\text{g/mL}$ uma diminuição da intensidade das bandas referentes à atividade fosforilativa de BCR-ABL, sugerindo-nos realmente o efeito inibitório sobre a atividade quinase de BCR-ABL (Figura 19B)

Sabendo-se que o MI possui um efeito inibidor apenas sobre a atividade TK de BCR-ABL, ou seja não afeta a expressão da proteína BCR-ABL, realizamos a marcação com o anticorpo c-abl para constatararmos que a expressão de BCR-ABL (185kDa) não havia sido afetada (figura 19C). Verificamos, como esperado, que a expressão de BCR-ABL não foi afetada pelo tratamento com o MI, no entanto, para nossa surpresa, quando associamos a LAAO, esta expressão apresentou-se

diminuída a partir da concentração de 1,5 μ g/mL, a partir da qual observou-se a diminuição da intensidade das bandas correspondentes à expressão protéica de BCR-ABL.

Figura 19 – Expressão da proteína fosfotirosina, c-abl e de BCR-ABL em células HL-60.BCR-ABL sem tratamento, tratadas com MI, LAAO e LAAO associada ao MI por 18 horas. A) Células HL-60.BCR-ABL sem tratamento (CT); tratadas com MI por 2 e 18 horas e tratadas com MI associado à LAAO por 18 horas. As células foram marcadas com o anticorpo anti-c-abl e anti-fosfotirosina. B) Células HL-60.BCR-ABL sem tratamento (CT) e tratadas com LAAO por 18 horas. As células foram marcadas com o anticorpo anti-c-abl e anti-fosfotirosina. C) Células HL-60 sem tratamento (CT) e tratadas com LAAO por 18 horas. As células foram marcadas com o anticorpo anti-c-abl.

Conforme descrito no item 3.4 em Material e Métodos, a expressão protéica do gene endógeno é utilizada para a normalização dos valores da densidade das bandas das proteína-alvo. Nesses experimentos a tubulina (48kDa), foi empregada como proteína endógena .

4.7. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

Com o objetivo de checar se a LAAO é capaz de modular a expressão de moléculas que controlam a apoptose celular foi realizada a quantificação da expressão dos genes pró e anti-apoptóticos da família BCL-2 e via extrínseca em células HL-60 e HL-60.BCR-ABL tratadas com LAAO em dose que não induziram a apoptose celular.

Assim sendo, a análise da expressão gênica foi realizada nas amostras de cDNA de células HL-60 tratadas com LAAO nas concentrações de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3) e de células HL-60.BCR-ABL cultivadas com LAAO nas concentrações de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e 1,5 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 4).

Para o melhor entendimento dos resultados, os mesmos estão descritos separadamente para a HL-60 e HL-60.BCR-ABL e conforme as concentrações de LAAO utilizadas para cada linhagem.

Os resultados obtidos na HL-60 tratada com LAAO na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de LAAO foram:

- diminuição da expressão de *bad*, *fasl*, *bcl-2* e *bcl-w*;

- aumento da expressão de *bid* e *fas*.

Os genes *a1*, *bak*, *bax*, *bim*, *bcl-x_L* e *c-flip* não foram modulados pela LAAO nesta concentração.

Os dados obtidos na HL-60 tratada com LAAO na concentração de 1,0µg/mL foram:

- diminuição da expressão de *bax*, *bak*, *bid*, *bim_{el}* e *bcl-2*;
- aumento da expressão de *bad*, *fas*, *fasl*, *a1*, *bcl-w* e *c-flip*.

O gene *bcl-x_L* não foram modulados nesta concentração.

Tabela 3- Expressão gênica em células HL-60 tratadas com LAAO nas concentrações de 0,5 e 1,0 µg/mL.

Genes Pró-apoptóticos				Genes Anti-apoptóticos			
	CT/conc LAAO(µg/mL)	-2ddct	Resultado		CT/conc LAAO(µg/mL)	2-ddct	Resulta do
<i>bad</i>	CT	1,00	-----	<i>a1</i>	CT	1,00	-----
	0,5	0,41	↓		0,5	1,12	AM
	1,0	1,90	↑		1,0	4,43	↑
<i>bak</i>	CT	1,00		<i>bcl-2</i>	CT	1,00	-----
	0,5	0,98	AM		0,5	0,30	↓
	1,0	0,53	↓		1,0	0,23	↓
<i>bax</i>	CT	1,00	-----	<i>bcl-x_l</i>	CT	1,00	-----
	0,5	1,01	AM		0,5	1,10	AM
	1,0	0,29	↓		1,0	1,17	AM
<i>bid</i>	CT	1,00	-----	<i>bcl-w</i>	CT	1,00	-----
	0,5	2,50	↑		0,5	0,25	↓
	1,0	0,08	↓		1,0	1,76	↑
<i>bim_{el}</i>	CT	1,00	-----	<i>c-flip</i>	CT	1,00	-----
	0,5	0,96	AM		0,5	1,10	AM
	1,0	0,77	↓		1,0	1,46	↑
<i>fas</i>	CT	1,00	-----				
	0,5	1,50	↑				
	1,0	7,82	↑				
<i>fasl</i>	CT	1,00	-----				
	0,5	0,11	↓				
	1,0	4,67	↑				

CT= controle; AM= ausência modulação. As flechas indicam aumento ou diminuição da expressão.

Os dados obtidos na HL-60.BCR-ABL tratada com LAAO na concentração de 1,0 µg/mL foram:

- diminuição da expressão de *bad*, *bax*, *bim_{el}* e *bcl-x_l*;
- aumento da expressão de *bid*, *fasl*, *a1*, *bcl-2* e *bcl-w*.

Os genes *bak*, *fas* e *c-flip* não foram modulados pela LAAO nesta concentração. Os resultados obtidos na HL-60.BCR-ABL tratada com LAAO na concentração de 1,5 µg/mL foram:

- diminuição da expressão de *bad*, *bak*, *bax*, *fas*,
- aumento da expressão de *bid*, *fasl*, *a1*, *bcl-2* *bcl-x_L* e *bcl-w*;

Os genes *bim* e *c-flip* não foram modulados pela LAAO nesta concentração.

Tabela 4- Expressão gênica da célula HL-60.BCR-ABL tratada com LAAO nas concentrações 1,0 e 1,5µg/mL.

Genes Pró-apoptóticos				Genes Anti-apoptóticos			
	CT/conc LAAO(µg/mL)	-2 ^{ddct}	Resultado		CT/conc LAAO(µg/mL)	2 ^{-ddct}	Resultado
<i>bad</i>	CT	1,00	-----	<i>a1</i>	CT	1,00	-----
	1,0	0,35	↓		1,0	5,03	↑
	1,5	0,19	↓		1,5	5,72	↑
<i>bak</i>	CT	1,00		<i>bcl-2</i>	CT	1,00	-----
	1,0	1,17	AM		1,0	1,76	↑
	1,5	0,57	↓		1,5	2,03	↑
<i>bax</i>	CT	1,00	-----	<i>bcl-x_l</i>	CT	1,00	-----
	1,0	0,38	↓		1,0	0,42	↓
	1,5	0,67	↓		1,5	1,42	↑
<i>bid</i>	CT	1,00	-----	<i>bcl-w</i>	CT	1,00	-----
	1,0	2,28	↑		1,0	1,29	↑
	1,5	5,73	↑		1,5	2,80	↑
<i>bim</i>	CT	1,00	-----	<i>c-flip</i>	CT	1,00	-----
	1,0	0,68	↓		1,0	1,10	AM
	1,5	0,82	AM		1,5	0,96	AM
<i>fas</i>	CT	1,00	-----				
	1,0	1,24	AM				
	1,5	0,66	↓				
<i>fasl</i>	CT	1,00	-----				
	1,0	1,61	↑				
	1,5	14,05	↑				

CT= controle; AM= ausência de modulação. As flechas indicam aumento ou diminuição da expressão.

5. DISCUSSÃO

A LMC é uma doença mieloproliferativa, cuja fisiopatologia está associada à presença do neogene *bcr-abl1*, o qual codifica a proteína BCR-ABL com alta atividade de Tirosina Kinase (TK). (BRECCIA et al., 2011; HEHLMANN et al., 2005). A proteína BCR-ABL altera nas células as vias bioquímicas RAS, PI3K/AKT, NF-κB e STAT, culminando com alterações em processos celulares fundamentais como: proliferação, sobrevivência, diferenciação, reparo de DNA, adesão alterada da célula ao estroma medular e resistência a morte celular (KAWAUCHI et al., 2003)

As células BCR-ABL⁺ resistem à apoptose induzida por quimioterápicos, portanto não são sensíveis a essa classe de medicamentos convencionais usados para tratamento de outras neoplasias e leucemias agudas (BEDI et al., 1995). A LMC é tratada principalmente com o mesilato de imatinibe, medicamento capaz de inibir a atividade quinase de BCR-ABL, bloquear a proliferação celular e as vias de ativação RAS, PI3K/AKT, NF-κB e STAT, promovendo a morte da célula leucêmica (CARROL et al., 1997)

Apesar do surpreendente resultado dessa terapia, visto que o fármaco induz remissão hematológica e citogenética na maior parte dos pacientes, já foram descritos vários mecanismos de resistência das células BCR-ABL a esse tratamento e a interrupção de seu uso promove recaída da doença (SMITH, 2011).

Trabalhos publicados na literatura sugerem que as células leucêmicas BCR-ABL⁺ persistem na medula óssea e sangue periférico pós-tratamento com MI, o que indica que a inibição da atividade de TK de Abl talvez não seja suficiente para erradicar todas as células leucêmicas (MAHON et al., 2000; GORRE et al., 2001). Assim sendo, a identificação de fármacos que induzam a morte da célula leucêmica *bcr-abl1* positiva ou potencializem a ação do MI torna-se de fundamental relevância para tratamento de portadores de LMC resistentes ao inibidor de TK.

Há na literatura numerosos estudos que investigam novas substâncias contra as células BCR-ABL positivas, visto que essas são extremamente resistentes aos agentes apoptogênicos clássicos, inclusive quimioterápicos (DUMAZET et al., 2002; POTIN, 2006; MAI; LIN, 2005; YASSIN et al., 2008).

Dumazet et al. (2002), investigaram o efeito do óxido nítrico (NO) na indução de apoptose de células BCR-ABL positivas. Os autores observaram que o

NO e seus derivados diminuíam a proliferação e promoviam a apoptose em células leucêmicas.

O trióxido de arsênio (A_2O_3) foi outro composto investigado com o intuito de promoção da apoptose em células de pacientes com LMC. Os mecanismos de morte celular induzida pelo A_2O_3 nas células leucêmicas não estão completamente elucidados, no entanto, observou-se que nas linhagens K562 e KCL22 a apoptose celular é desencadeada pela estimulação da via intrínseca e a ativação da via JNK (POTIN et al., 2006).

Os produtos naturais derivados de plantas também têm sido explorados quanto aos seus potenciais efeitos antineoplásicos, inclusive contra células de BCR-ABL⁺ e de pacientes com LMC. Um exemplo destes produtos é o Homoharringtonine (HHT), éster obtido da extração total do *Cephalotaxus* (espécie de planta alcalóide), encontrada no sul da China, capaz de induzir a morte de células K562 que estão na fase G1 do ciclo celular (MAI; LIN, 2005).

O presente estudo explorou o possível efeito anti-leucêmico do veneno bruto e da enzima L-amino-ácido-oxidase de *Bothrops pirajai* em células BCR-ABL⁺. Além disso, avaliou o papel LAAO como adjuvante da terapia com MI nessas células.

Os Venenos de serpentes são reconhecidos como importantes fontes de substâncias bioativas, que apresentam numerosas atividades farmacológicas (IZIDORO, et al., 2006; WARREL, 2010). Estes venenos são misturas muito complexas de proteínas, peptídeos, lipídeos, nucleotídeos, dentre outras substâncias. Incluas neste complexo coquetel de componentes dos venenos de serpentes, estão as LAAOs. (MASSEY; CURTI, 1967; ZHANG et al., 2003; DU; CLEMETSON, 2002).

Essa discussão enfocará principalmente os resultados obtidos quanto ao efeito das LAAO sobre as linhagens celulares HL-60 e HL-60.BCR-ABL, dada origem da mesma como proteína purificada.

As LAAOs são flavoenzimas que catalizam a deaminação oxidativa de L-aminoácidos em α -cetoácido com a produção de amônia e peróxido de hidrogênio. Essas enzimas encontram-se em altas concentrações nos venenos de serpentes, contribuindo para sua toxicidade via estresse oxidativo decorrente da produção de peróxido de hidrogênio (DU e CLEMETSON, 2002). A literatura descreve que as LAAOs interferem em vários processos biológicos, como imunomodulação e

promovendo em células tumorais a indução de apoptose e aumento do potencial inflamatório (TAN ; FUNG, 2008; WEI et al., 2007 e 2009).

Estudos publicados na literatura mostram ainda que a LAAO não afeta, e até potencializa a resposta imune contra tumores (TORRES et al., 2010; TORRES et al., 2007). A LAAO estimula a apoptose em diferentes tipos de células malignas *in vitro*, como células de leucemia pró mielocítica, carcinoma ovariano, câncer de estômago, melanoma, fibrosarcoma e câncer coloretal. (ALVES et al., 2008; AHN et al., 1997).

Esses dados são importantes, pois fornecem embasamento científico para elaboração de estratégias quanto ao desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas contra tumores (FRANÇA et al., 2007; ANDE et al., 2008; ZHANG; WU, 2008).

Os mecanismos moleculares envolvidos nas ações biológicas da LAAO não foram ainda totalmente esclarecidos, mas os dados da literatura permitem a especulação da possível ação dessa enzima em células BCR-ABL⁺.

Essa investigação explorou o potencial efeito do veneno bruto e da LAAO de *B. pirajai* em desencadear a morte celular nas células HL-60 e HL-60.BCR-ABL.

Além disso, avalia se a apoptose induzida pela LAAO foi desencadeada pela via intrínseca ou extrínseca. A apoptose induzida por drogas antitumorais é mediada geralmente pela via extrínseca (receptores de morte) ou pela via intrínseca (via mitocondrial), no entanto, em alguns casos ambas as vias podem estar envolvidas na indução de morte celular (RAKSHIT et al., 2010).

Nossos resultados evidenciaram a ativação das caspases 3, 8 e 9 em linhagens HL-60 e HL-60.BCR-ABL após tratamento com LAAO e VB. Sabe-se que a clivagem da pró-caspase 8 pode ativar diretamente a caspase 3 ou iniciar a apoptose através da via mitocondrial (HENGARTNER, 2000). A ativação da pró-caspase 8 sugeriu-nos que a via dos receptores de morte foi envolvida na morte celular induzida pela BpirLAAO, enquanto que a ativação da caspase 9 comprovou a ativação da via intrínseca.

Nossos resultados sugerem que a apoptose induzida pela BpirLAAO é conduzida por efeitos cooperativos das vias extrínseca e intrínseca.

Esse dado é extremamente relevante, visto que é raro substâncias capazes de induzir morte de células BCR-ABL⁺. Sabe-se que a expressão de BCR-ABL torna as células resistentes aos agentes quimioterápicos clássicos (BRUMATTI et al, 2003; BUENO-DA-SILVA, et al. 2003), e o resultado aqui obtido mostra que a célula

BCR-ABL⁺ é sensível ao efeito da LAAO e do VB de *B. pirajai*. Além disso, foi verificado que o VB e a LAAO induziram a apoptose de maneira dose-dependente nas células HL-60.BCR-ABL.

A literatura especula que a LAAO exerça essa atividade por meio da liberação de peróxido de hidrogênio em outras linhagens celulares tumorais, como Jurkat (leucemia célula T aguda), SKBR-3 (câncer de mama) e A2789 (carcinoma ovariano) (IZIDORO et al., 2006; CLEMETSON et al., 2008; SUN et al., 2003 e 2010; SKULACHEV, 2002; ZHUN; WU, 2008; TAN; FUNG, 2008; ALVES et al., 2010).

A hipótese de que o aumento da produção de peróxido de hidrogênio e demais ROS associado a indução de apoptose está relacionada ao efeito desses componentes na mitocôndria. Os ROS geram perturbações mitocondriais, como o ataque de radicais livres aos fosfolipídeos da membrana e a depleção da membrana mitocondrial, que promove a abertura dos poros, resultando na liberação de proteínas como o citocromo c para o citosol (RAKISH et al., 2010; ALVES et al., 2008; TEMPONE et al., 2001).

O mecanismo pelo qual a LAAO induz a apoptose, ativando as vias extrínseca e intrínseca da apoptose celular não pode ser elucidado durante essa investigação pelo limitado fornecimento de veneno durante os dois anos de mestrado. Não foi checado se a apoptose induzida por LAAO de *B. pirajai* é mediada realmente pelo peróxido de hidrogênio.

Estudos de outros autores também demonstraram, por de ensaios de citometria de fluxo, que a LAAO de diferentes espécies de serpentes induziram a apoptose em linhagens celulares. Souza et al. (1999), descreveram que a LAAO de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, causou fragmentação do DNA em HL-60 na concentração de 25µg/mL, após 24h de tratamento. Outra recente investigação descreveu que a LAAO de *Bothrops atrox* (BatroxLAAO) induz a apoptose na HL-60 de maneira dose dependente (ALVES et al., 2008). Essa mesma investigação mostrou que BatroxLAAO e LAAO de Malayan pit viper promovem a morte celular em células Jurkat (linhagem de leucemia de células T aguda) (Ande et al., 2006).

Zhang & Cui demonstraram que a LAAO isolada da serpente *Agkistrodon acutus*, denominada ACTX-6, exibiu propriedades citotóxicas *in vitro* contra várias linhagens celulares de câncer, incluindo A549, HeLa, BGC, SMMC7721, KB e Caco-2. Os autores descreveram que a ativação das caspases 3, 8 e 9 aumentaram de

maneira dose dependente e que ambas as vias de ativação de apoptose envolvidas no processo de indução de apoptose por ACTX-6.

Nossos estudos reforçam os achados que relatam o potencial das LAAOs de serpentes em gerar apoptose em linhagens tumorais.

Como citado anteriormente, pouco se sabe sobre a ação da LAAO em células BCR-ABL positivas. Há apenas um relato na literatura a respeito da utilização da LAAO em K562, célula originada de um paciente com LMC em crise blástica, que expressa a proteína BCR-ABL de forma constitutiva. Esse trabalho sugere que a LAAO de *Vipera berus berus* estimula a apoptose em células K562 nas concentrações de 2,5 a 10µg/mL após 7 e 24 horas de tratamento. Demonstrou-se ainda que a LAAO se liga diretamente a superfície da célula K562 aumentando a concentração local de peróxido de hidrogênio (SAMEL et al., 2006). O peróxido de hidrogênio nascente endógeno resultante da interação da LAAO com a membrana celular seria o causador da apoptose celular.

Dado ao fornecimento limitado da LAAO não foram realizados experimentos para checar se o peróxido de hidrogênio participava do mecanismo indutor de morte em células HL-60 e HL-60.BCR-ABL.

Especulando sobre os nossos achados, verificamos que os dados indicam a possibilidade da toxina LAAO se aplicar futuramente em ensaios pré-clínicos e no tratamento de células Ph⁺ e BCR-ABL⁺ de pacientes com LMC para que possamos confirmar sua relevância no tratamento dessa doença e aprofundar nossos achados em relação ao seu mecanismo de ação.

5.1. Detecção do efeito da associação do Mesilato de Imatinibe com a L-aminoácido oxidase.

Sabe-se que a resistência das células HL-60.BCR-ABL à apoptose está associada à atividade TK de BCR-ABL, e que o elevado potencial anti-apoptótico de BCR-ABL limita a eficácia de quimioterápicos associados com o mesilato de imatinibe, para o tratamento da LMC (COPLAND et al., 2006; BEDI et al., 1995).

A associação do MI a outras drogas tem sido buscada como nova abordagem frente ao tratamento da LMC. Uma dessas combinações é o MI associado ao interferon-α. Esta associação mostrou-se promissora, porém ensaios clínicos em

grupos de pacientes, mostraram que o uso prolongado desta combinação apresentou poucos benefícios (CORTES et al., 2011).

Outros inibidores de TK como Dasatinibe e Nilotinibe, apresentam atividade contra a maioria das mutações que provocam a resistência ao MI, mas não se mostraram eficientes contra a mutação T315I e na doença em fase avançada (CERVANTES; MAURO, 2011).

Sendo assim, A busca por novos fármacos ou substâncias adjuvantes do efeito do MI tem sido uma estratégia muito aplicada no tratamento da LMC (NGUYEN, et al., 2011; CORBIN, et al., 2011).

Substâncias naturais, como derivados de APIS, toxinas de serpentes e fitoterápicos enquadram-se nessa abordagem de busca de novos fármacos para tratamento da LMC.

Nesse contexto, a *Daedalea gibbosa*, uma espécie de cogumelo medicinal, foi investigado como possível inibidor da tirosina quinase BCR-ABL. Foi YASSIN e colaboradores verificaram que o extrato orgânico de *Daedalea gibbosa* diminui a atividade fosforilativa de BCR-ABL. Estes dados sugeriram aos pesquisadores que a atividade anti-LMC do extrato orgânico de *Daedalea gibbosa* estava relacionada à inibição da atividade quinase de BCR-ABL (YASSIN et al., 2008).

Em nosso estudo a apoptose das células HL-60.BCR-ABL induzida pela LAAO foi potencializada pela adição do mesilato de imatinibe. Além disso, detectamos que a LAAO potencializa a inibição da atividade quinase induzida pelo MI e a expressão da proteína BCR-ABL. Dados interessantes e que não haviam sido associados anteriormente quanto a atividade biológica exercida pela LAAO em células BCR-ABL⁺.

A literatura demonstra que a característica de resistência à apoptose de células BCR-ABL⁺ está associada aos níveis de expressão dessa proteína.

A resistência à apoptose parece ser parcialmente independente da atividade enzimática de BCR-ABL e portanto insensível ao MI, que atua especificamente na atividade TK de BCR-ABL (GRAHAM et al., 2002; LI, 2007).

BUENO-DA-SILVA e colaboradores (2003) descreveram que o MI antes de 24h de incubação com as células BCR-ABL não promove a morte celular e que o mesmo não sensibiliza as células à apoptose, dado este constatado em nosso trabalho quando as células foram tratadas apenas com MI por 18 horas. Entretanto, quando o MI foi associado à LAAO a percentagem de células em apoptose se

elevou, o que indica que nesse caso há um efeito somatório de efeitos que conduziram à maior sensibilização da célula a morte.

Com a finalidade desvendar melhor o mecanismo pelo qual a apoptose das células HL-60.BCR-ABL é potencializada pela LAAO associada ao MI, a expressão de BCR-ABL e da atividade quinase de BCR-ABL foi investigada nessas situações.

Os resultados obtidos indicaram que a LAAO é capaz de diminuir a expressão de BCR-ABL, portanto atenua a atividade quinase, o que acarretaria maior sensibilidade da célula à apoptose. Esse dado explica pelo menos em parte a potencialização da morte celular induzida por LAAO em associação com o MI, mas não permite que postulemos uma hipótese de como a LAAO induz a morte celular.

O fato da LAAO diminuir a expressão de BCR-ABL é extremamente relevante do ponto de vista de descrição de novos fármacos para LMC. Entretanto, esse efeito precisa ser comprovado em células que expressam o BCR-ABL constitutivamente e em células de pacientes com LMC.

Como descrito anteriormente, nesta discussão, a maioria dos efeitos biológicos da LAAO está associada à produção de peróxido de hidrogênio (ROS).

Nesse contexto, Sattler e co-autores (2000) observaram que a transformação celular maligna mediada pela atividade quinase de BCR-ABL está associada ao aumento das espécies reativas de oxigênio endógenas, como o peróxido de hidrogênio. Essas substâncias promovem a inibição das fosfatases (PTPases), ativação de receptor de fator derivado de plaqueta, aumenta a produção de TGF-beta e induzem aumento da fosforilação de resíduos de tirosina. ROS parece aumentar a atividade quinase de c-ABL, o que indica sua participação no mecanismo leucemogênico exercido por BCR-ABL.

Esse mesmo trabalho mostra que as espécies reativas de oxigênio são inibidas pelo MI, o que comprova a indução de ROS pela BCR-ABL.

Nossos resultados indicam que a LAAO diminui a atividade quinase e a expressão de BCR-ABL, sugerindo, portanto, que o peróxido de hidrogênio em nosso modelo não exerça ação sobre a indução da apoptose em células BCR-ABL+ e sobre sua atividade quinase.

Kumar et al. (2003) também verificaram que o inibidor de TK, mesilato de imatinibe, diminui a produção das espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria. O mesilato de imatinibe impede, portanto que as células BCR-ABL morram por necrose ou apoptose desencadeadas pelo estresse oxidativo celular.

Esse achado permite-nos dizer que provavelmente o peróxido de hidrogênio em nosso modelo experimental não é o responsável pela indução de apoptose das células HL-60.BCR-ABL, visto que essas células tratadas com a LAAO associada ao MI morrem em maior proporção do que quando tratadas somente com LAAO.

Paradoxalmente aos achados acima, Rakishit et al. (2010), constataram que peróxido de hidrogênio exógeno e a liberação de ROS exercem um papel na inibição da atividade quinase de BCR-ABL. O estudo foi realizado por meio da adição de peróxido de hidrogênio em células K562. Neste estudo, as células K562 foram tratadas com peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações (10, 15 e 25 μ M). Os resultados obtidos neste ensaio revelaram que peróxido de hidrogênio interfere na atividade fosforilativa de BCR-ABL de maneira dose-dependente. Em baixas concentrações (abaixo de 25 μ M) o peróxido de hidrogênio aumenta a atividade fosforilativa, enquanto que na concentração de 25 μ M, a atividade fosforilativa diminuiu.

Tendo em vista estes dados paradoxais relatados na literatura, torna-se necessário maiores investigações acerca do envolvimento de ROS e do peróxido de hidrogênio como participante do efeito da LAAO sobre células BCR-ABL+ e quanto sua relação com atividade fosforilativa de BCR-ABL e potencialização do efeito do MI.

5.2. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

Em células de LMC, a proteína BCR-ABL diminui a expressão de *bcl-2* e aumenta a de *a1*, *mcl-1*, *bcl-w* *bcl-x_L* por meio da ativação de vias de transdução de sinais como a STAT5, inibe a liberação de citocromo c e impede a ativação das caspases (Bueno-Da-SILVA, 2003; RAKISHIT, et al., 2010; HORITA, et al., 2000; DEMING, et al., 2004).

A maior expressão de moléculas anti-apoptóticas confere às células BCR-ABL maior resistência à apoptose. A utilização de fármacos que diminuam a expressão das moléculas anti-apoptóticas e elevem a das pró-apoptóticas são desejáveis por promoverem a sensibilização da célula leucêmica à morte.

Nesse sentido, checamos se a LAAO, em concentrações abaixo daquelas que induzem apoptose, é capaz de modular a expressão de moléculas que controlam a

apoptose na célula HL-60.BCR-ABL. Analisamos o perfil de expressão de genes pró-apoptóticos (*bad*, *bak*, *bax*, *bid*, *bimel*, *fas* e *fasl*) e anti-apoptóticos (*a1*, *bcl-x_L*, *bcl-w*, *bcl-2* e *c-flip*) nas linhagens HL-60 e HL-60.BCR-ABL tratada com LAAO.

Não há relatos na literatura de estudos sobre a expressão gênica de genes pró e anti apoptóticos em linhagens BCR-ABL positivas tratadas com LAAOs.

Apenas um estudo descreve a expressão destes genes em linhagens de células neoplásicas de pulmão tratadas com LAAO de *Agkistrodon*. Neste estudo, realizado por Zang e Cui, 2007, foi observado o aumento da expressão dos genes *Fas* e *FasL* nas células tratadas com LAAO na concentração 10 µg/mL por 12, 24 e 48 horas.

Os dados obtidos em nosso trabalho demonstraram que a LAAO modulou tanto os genes pró como os anti-apoptóticos nas linhagens HL-60 e HL-60.BCR-ABL. A modulação mostrou-se dependente do tipo celular, já que os resultados da expressão gênica foram distintos entre as células HL-60 e HL-60.BCR-ABL.

A ação de LAAO sobre a expressão desses genes parece ser dose dependente, visto que essa substância interferiu na expressão dos genes pró e anti-apoptóticos conforme a dose empregada no tratamento das células.

De forma geral a LAAO foi capaz de modular concomitantemente os genes pró- e anti-apoptóticos, resultando provavelmente no equilíbrio do processo de apoptose e vida celular. Entretanto, é preciso ressaltar dois achados em HL-60.BCR-ABL a elevação do *bid* e a diminuição do *bcl-x_L*.

O gene *bid* apresentou elevação de expressão na linhagem HL-60.BCR-ABL após o tratamento com a LAAO. Sendo *bid* o conector das vias extrínseca e intrínseca, este foi um dado relevante, considerando que foi constatado em nossos experimentos a ativação das caspases 3, 8 e 9 em HL-60.BCR-ABL tratadas com LAAO. Outro dado relevante foi a diminuição da expressão de *bcl-x_L* nas células HL-60.BCR-ABL tratadas com a LAAO na concentração de 1,0 µg/mL, pois esse parece ser o principal gene associado a resistência dessas células à apoptose (AMARANTE - MENDES, et al., 1998b).

Considerando a limitação da quantidade de LAAO, não foi possível avaliar funcionalmente se o tratamento das linhagens HL-60 e HL-60.BCR-ABL com LAAO em baixas concentrações resulta na sensibilização dessas linhagens a morte, esse seria um experimento de grande relevância que será feito no futuro.

CONCLUSÕES

6 . CONCLUSÕES

- 1) O veneno bruto e a LAAO foram capazes de induzir a apoptose de maneira dose-dependente nas linhagens HL-60 e HL-60.BCR-ABL;
- 2) A LAAO promoveu a ativação das caspases 3, 8 e 9. Assim, a apoptose induzida pela LAAO nas linhagens HL-60 e HL-60.BCR-ABL é desencadeada pela ativação das vias intrínseca e extrínseca;
- 3) A associação da LAAO ao mesilato de imatinibe culminou no aumento da apoptose da célula HL-60.BCR-ABL;
- 4) A LAAO associada ao MI potencializou a inibição da atividade quinase de BCR-ABL e provocou a diminuição da expressão de BCR-ABL;
- 5) A LAAO interferiu na expressão de genes anti- e pró-apoptóticos das vias intrínseca e extrínseca da apoptose em linhagens HL-60 e HL-60.BCR-ABL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.**, London, v. 29, n.6, p. 911-919, 1997.

ALI, M.Y.; STOEVA, S.; ABBASE, A.; ALAM, J.M.; KAYED, R.; FAIGLE, M. et al. Isolation, structural and a functional characterization of na apoptosis inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 384, n.2, p. 216-226, 2000.

ALVES, R.M.; ANTONUCCI, G.A.; PAIVA, H.H.; CINTRA, A.C.; FRANCO, J.J.; MENDONÇA-FRANQUEIRO, E.P. et al. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* venom. **Comparative Biochem. And Physiology, part A**, New York, v. 151, n.4, p. 542-550, 2008.

AMARANTE-MENDES, G.P.; GREEN, D.R. The regulation of apoptotic cell death. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v. 32, n.9, p. 1053-1061, 1999.

AMARANTE-MENDES, G.P.; MCGAHON, A.J.; NISHIOKA, K.W.; AFAR, D.E.; WITTE, N.O.; GREEN, D.R. Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xl. **Oncog.**, v.16, n.11, p.1183-90, 1998b. targets an earlier progenitor population than imatinib therapy in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. **Blood.**, v.107, n.11, p.4532-9, 2006.

ANDE, S.R.; ANDE, S.R.; KOMMOJU, P.R.; DRAXL, S.; MURKOVIC, M.; GHISLA, S.; FRÖHLICH, K.U.; MACHEROUX, P. Induction of apoptosis in yeast by L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodossoma*. **YEAST**, Oxford, v. 25, n.5, p. 349-357, 2008.

ANDE, S.R.; KOMMOJU, P.R.; DRAXL, S.; MURKOVIC, M.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; FERRANDO-MAY, E. Mechanism cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis.**, London, v. 11, n.8, p. 1439-1451, 2006.

AZAM, M.; LATEK R. R.; DALEY, G.Q.. Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. **Cell.**, Cambridge, v. 112, n. 6, p. 831-843, 2003.

BEDI, A.; BARBER, J.P.; BEDI, G.C.; EL-DEIRY, W.S.; SIDRANSKY, D.; VALA, M.S. et al. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. **Blood.**, Washington, v.86, n.3, p.1148-58, 1995.

BEDI, A.; ZEHNBAUER, B.A.; BARBER, J.P.; SHARKIS, S.J.; JONES, R.J. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. **Blood.**, Washington, v.83, n.8, p.2038-44, 1994.

BERTAZZI, D.T.; DE ASSIS-PANDOCHI, A.I.; TALHAFFERRO, V.L.; CALEIRO SEIXAS AZZOLINI, A.E.; PEREIRA CROTT, L.S.; ARANTES, E.C. Activation of the complement system and leukocyte recruitment by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Int. Immunopharmacol.**, Amsterdam, v.5, n.6, p.1077-1084, 2005.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol. Immunol.**, Oxford, v. 39, n.11, p. 615-647, 2003.

BRECCIA, M.; EFFICACE, F.; ALIMENA, G. Imatinib treatment in chronic myelogenous leukemia: what have we learned so far? **Cancer Letters**, Oxford, v. 30, n.2, p. 115-121, 2011.

BRUMATTI, G.; WEINLICH, R.; CHEHAB, C.F.; YON, M.; AMARANTE-MENDES GP. Comparison of the anti-apoptotic effects of Bcr-Abl, Bcl-2 and Bcl-x(L) following diverse apoptogenic stimuli. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 541, n.4, p. 57-63, 2003.

BUCHDUNGER, E.; CIOFFI C. L.; STOVER, D.; OHNO-JONES, S.; DRUKER, B.J.; LYDON, N.B. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. **J Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 295, n.1, p. 139-145, 2000.

BUENO-DA-SILVA, A.E.B.; BRUMATTI, G.; RUSSO, F.O.; GREEN, D.R.; AMARANTE-MENDES, G.P. Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis is independent of constant tyrosine-kinase activity. **Cell Death and Differ.**, London, v. 10, n.5, p. 592-598, 2003.

CAI, J.; YANG, J.; JONES, D.P. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. **Biochem. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1366, n.1-2, p. 139-148, 1998.

CARROLL, M.; OHNO-JONES, S.; TAMURA, S.; BUCHDUNGER, E.; ZIMMERMANN, J.; LYDON, N.B. et al. a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. **Blood.**, Wahington, v.90, n.12, p.4947-52, 1997.

CERVANTES, F.; MAURO, M. Practical management of patients with chronic myeloid leukemia. **Cancer**., Oxford, v. p.1-12, 2011.

CHAUFFAILLE, M.L.L.F. Leucemia mielóide crônica: tratamento baseado em evidências. **Diagn Tratamento**, São Paulo, v. 14, p. 62-65, 2009.

CHEN, Y.; PENG, C.; LI, D.; LI, S. Molecular and cellular bases of chronic myeloid leukemia. **Protein Cell**., Beijin, v. 1, n.2, p. 124-132, 2010.

CILLONI, D.; SAGLIO, G. CML: a model for targeted therapy. **Best Pract Res Clin Haematol.**, Amsterdam, v.22, n.3, p.285-94, 2009.

COHEN, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochem. J.**, London, v. 326, p. 1-16, 1997.

COPLAND, M.; HAMILTON, A.; ELRICK, J.; BAIRD, W.; ALLAN, K.; JORDANIDES, N. et al. Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. **Blood**., Wahington, v.107, n.11, p. 4532-9, 2006.

CORBIN, A.S.; AGARWAL, A.; LORIAUX, M.; CORTES, J.; DENINGER, M.W.; DRUKER, B.J. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.121, n.1, p.396-409, 2011.

CORTES, J.; HACHHAUS, A.; HUGUES, T.; KANTARJIAN, H. Front-line and salvage therapies with tyrosine kinase inhibitors and other treatments in chronic myeloid leukemia. **J.Clin.Onc.**, Oxford, v, 29, n.5, p.524-531, 2011.

CORTEZ, D.; KADLEC, L.; PENDERGAST, A.M. Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 15, n.10, p. 5531-5541, 1995.

COSTA, P.D.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. DA CRUZ-HÖFLING, M.A. Effects of Bothrops pirajai venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation. **Toxicon**., Oxford, v. 37, n.8, p. 1143-1153, 1999.

COTTA, C.V.; BUESO-RAMOS, C.E. New insights into the pathobiology and treatment of chronic myelogenous leukemia. **Ann. Diag. Pathol**, Philadelphia, v. 11, n.1, p. 68-78, 2007.

DA SILVA, R.J.; FRECCHIO, D. BARRAVIERA, B. Antitumor effect of snake venoms. **J. Venom. Anim. Toxins.**, v.2, n.2, 1996.

DALEY, G.Q.; VAN ETEN, R.; BALTIMORE, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. **Science.**, Washington, v. 247, p. 824-830, 1990.

DEBNATH, A.; CHATTERJEE, U.; DAS, M.; GOMES, A.; Venom of Indian monocellate cobra and Russel's viper show anticancer activity in experimental models. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.111, n.3, p.681-684, 2007.

DEMING, P.B.; SCHAFER, Z.T.; TASHKER, J.S.; POTTS, M.B.; DESMUKH, M.; KORNBLUTH, S. Bcr-Abl-mediated protection from apoptosis downstream of mitochondrial cytochrome c release. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v.24, n.23, p.10289-99, 2004.

DI BACCO, A.; KEESHAN, K.; MCKENNA, S.L.; COTTER, T.G. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukaemia. Desregulation of cell growth and apoptosis. **Oncologist**, Dayton, v. 5, p. 405-415, 2000.

DOLL, R.; SMITH, P.G. The long-term effects of x-radiation in patients treated for metrophatia haemorrhagica. **Br. J. Radiol.**, London, v. 41, p. 362-368, 1968.

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

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

DUERRE, J.A.; CHAKRABARTY, S. L-amino acid oxidases of *Proteus rettgeri*. **J.Bacteriol.**, Baltimore, v.121, n.2, p.656-663, 1975.

DUMAZET, H.F.; MATSUDA, M.M.; DUPOUY, M.; BELLOC, F.; THIOLAT, D.; MARIT, G. et al. Nitric oxide induces the apoptosis of human BCR-ABL-positive myeloid leukemia cells: evidence for the chelation in intracellular iron. **Leuk.**, Baltimore, v.16, n.4, p.708-715, 2002.

EVANGELISTA, I.L.; MARTINS, A.M.C.; NASCIMENTO, N.R.F.; HAVT, A.; EVANGELISTA, J.S.M.; TOYAMA, M.H. et al. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A₂. **Toxicon.**, Oxford, v.55, p.1061-1070, 2010.

FADERL, S.; TALPAZ, M.; ESTROV, Z.; KANTARJIAN, H. Chronic myelogenous leukemia biology and therapy. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 131, p. 207-291, 1999.

FRANÇA, S.C.; KASHIMA, S.; ROBERTO, P.G.; MARINS, M.; TICLI, F.K.; PEREIRA, J.O. et al. Molecular approaches for structural characterization of *Bothrops* L-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 355, n.2, p. 302-306, 2007.

FRAZER, R.; IRVINE, A.E.; McMULLIN, M.F. Chronic myeloid leukemia in the 21st Century. **Ulster Med. J.**, Belfast, v. 76, n. 1, p. 8-17, 2006.

GOLDMAN, J. M. Chronic myeloid leukemia-still a few questions. **Exp. Hematol.**, Copenhagen, v. 32, p. 2-10, 2004.

GOMES, A.; BHATTACHARJEE, P.; MISHRA, R.; AJOY, K.; DASGUPTA, S.C.; GIRI, B. Anticancer potencial of animal venoms and toxins. **Indian. J. Exp. Biol.**, New Delhi, v.48, n.2, p.93-103, 2010.

GORRE, M.E.; MOHAMMED, M.; ELLWOOD, K.; HSU, N.; PAQUETTE, R.; RAO, P.N.; SAWYERS, C.L. Clinical resistance to STI571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. **Science**, Washington, v. 293, n.5531, p. 876-880, 2001.

GRAHAM, S.; JORGENSEN, H.G.; ALLAN, E.; PEARSON, C.; ALCORN, M.J.; RICHMOND, L.; HOLYAKE, T.L. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. **Blood.**, Washington, v.99, n.1, p.319-25, 2002.

GREEN, D.R.; EVAN, G. A matter of life and death. **Cancer Cell.**, Cambridge, v. 1, p. 19-30, 1999.

GUILHOT, F.; LACOTTE-THIERRY, L. Interferon- α : mechanisms of action in chronic myelogenous leukemia in chronic phase. **Hematol. Cell Ther.**, Paris, v. 40, n.5, p. 237-239, 1998.

HANDA, H.; HEDGE, U.P.; KOTELNIKOV, V.M.; MUNDLE, S.D.; DONG, L.M.; BURKE, P.; ROSE, S. et al. Bcl-2 and c-myc expression, cell cycle kinetics and apoptosis during the progression of chronic myelogenous leukemia from diagnosis to blast phase. **Leuk. Res.**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 479-489, 1997.

HEANEY, N.B.; HOLYOAKE, T.L. Therapeutic targets in chronic myeloid leukaemia. **Hematol. Oncol.**, Chichester, v. 25, p. 66-75, 2007.

HEHMANN, R.; BERGER, U.; HOCHHAUS, A. Chronic myeloid leukemia: a model for oncology. **Ann. Hematol.**, Berlin, v. 84, p. 487-497, 2005.

HEHMANN, R.; HOCHHAUS, A.; BACCARANI, M. Chronic myeloid leukaemia. **Lancet**, London, v. 370, p. 342-350, 2007.

HOCKENBERY, D.M.; ZUTTER, M.; HICKEY, W.; NAHM, M.; KORSMEYER, S.J. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. **Pro. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v.88, n.16, p.6961-5, 1991.

HORITA, M.; ANDREU, E.J.; BENITO, A.; ARBONA, C.; SANZ, I.; C.; BENET, I. et al. Blockade of the BCR-ABL kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xl. **J. Exp. Med.**, New York, v.191, n.6, p.977-984, 2000.

HUANG, Z. The chemical biology of apoptosis: exploring protein-protein interactions and the life and death of cells with small molecules. **Chem. Biol.**, London, v. 9, n.10, p. 1059-1072, 2002.

IZIDORO, L.F.M.; RIBEIRO, M.C.; SOUZA, G.R. SANT'ANA, C.D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. et al. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.**, Oxford v. 14, n.20, p. 7034-7043, 2006.

JABBOUR, E.; FAVA, C.; KANTARJIAN, H. Advances in the biology and therapy of patients with chronic myeloid leukemia. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, Amsterdam, v. 22, n.3, p. 395-407, 2009.

JENNING, B.A.; MILLS, K.I. C-myc locus amplification and acquisition of trisomy 8 in the evolution of chronic myeloid leukemia. **Leuk. Res.**, Oxford, v. 22, n.10, p. 899-903, 1998.

JOHN, A. M.; THOMAS, N.S.; MUFTI, G.J.; PADUA, R.A. Seminars in cancer biology: Targeted therapies in myeloid leukemia. **Science**, Washington, v. 14, n.1, p. 41-62, 2004.

KANTARJIAN, H. M.; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S.; GILES, F.; GARCIA-MANERO, G.; FADERL, S. et al. Dose escalation of imatinib mesylate can overcome resistance to standard-dose therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. **Blood.**, Washington, v. 101, n. 2, p. 473-475, 2003.

KANTARJIAN, H., SAWYERS, C. L.; GUILHOT, F.; SCHIFFER, C.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; NIEDERWIESER, D. et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 346, n.9, p. 645-652, 2002.

KARTHLEYAN, R.; KARTHIGAYAN, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BALASUBASHINI, M. Inhibition of Hep2 and HeLa cell proliferation in vitro and EAC tumor growth in vivo by Lapemis curtus (Shaw 1982) venom. **Toxicon.**, Oxford, v.51, n.1, p. 157-161, 2008.

KERR, J.F.; WILLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer.**, London v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KUMAR, S.; MISHRA, N.; RAINA, D.;SAXENA,S.;KUFED,D. Abrogation of the cell death response to oxidative stress by the c-abl tyrosine kinase inhibitor STI571. **Mol. Pharm.**, Bethesda, v.63, n.2, p.276-282, 2002.

KAWAUCHI K. T.; OGASAWARA T, YASUYAMA M., OHKAWA S. Involvement of akt kinase in the action of STI571 on chronic myelogenous leukemia cells. **Blood Cells Mol Dis**, New York, 31, n.1, p.11-17 2003.

LEE, M.L.; TAN, N.H.; FUNG, S.F.; SEKARAN, D. Antibacterial action of a heat-stable form of L-amino acid oxidase isolated from king cobra (*Ophiophagus Hannah*) venom. **Comp. Biochem.Phys. Part C.**, New York, 153, n.2, p.237-242, 2011.

LEWIS, R.J.; GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat. Rev. Drug Disc**, London, v. 2, n.10, p. 790-802, 2003.

LI, S.; D.LI. Stem cell and kinase activity-independent pathway in resistance of leukaemia to BCR-ABL kinase inhibitors. **J.Cell.Mol. Med.**, London v.11, n.6, p.1251-62, 2007.

LICKLITER, J.D.; KRATZKE, R.A.; NGUYEN, P. L. Fas ligand is highly expressed in acute leukemia and during the transformation of chronic myeloid leukemia to blast crisis. **Exp. Hematol.**, Copenhagen, v. 27, n.10, p. 1519-1527, 1999.

LIU, X.; KIM, C.N.; YANG, J; JEMMERSON, R.; WANG, X. Induction of apoptotic program in cell free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell.**, Cambridge, v.86, n.1, p.147-57, 1996.

MAHON, F.; DEININGER, M.W.; SCHULTHEIS, N.; CHABROL, J.; REIFFERS, J.; GOLDMAN, J.M.; MELO, J.V. Selection and characterization of Bcr-Abl positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. **Blood**, Washington, v. 96, n.3, p. 1070-1079, 2000.

MAI, W.; LIN, M. Induction of apoptosis by homoharringtonine in G1 phase human chronic myeloid leukemic cells. **Chin. Med. J.**, Beijin, v. 118, n.6, p.487-492, 2005.

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

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis **Biochem. et Biophys. Acta.**, Amsterdam v. 1477, n.1-2, p. 146-156, 2000.

MAURILLO, L.; POETA, G.D.; VENDITTI, A.; BUCCISANO, F.; BATTAGLIA, A.; SANTINELLI, S. et al. Quantitative analysis of Fas and bcl-2 expression in hematopoietic precursors. **Haematologica**, Pavia, v. 86, n.3, p. 237-243, 2001.

MELO, J.V.; BARNERS, D.J. Chronic myeloid leukemia as a model of disease evolution in human cancer. **Nature**, London, v. 7, n.6, p. 441-450, 2007.

MELO, J.V.; HUGHES, T.; APPERLEY, J.F. Chronic myeloid leukemia. **Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)**, Washington, p. 132-152, 2003.

MICHOR, F. Chronic myeloid leukemia blast crisis arises from progenitors. **Stem Cells**, New York, v. 25, n.5, p. 1114-1118, 2007.

MITELMAN, F. The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. **Leuk. Lymphoma.**, London, v. 1, n.5, p. 11-15, 1993.

NEVIANI, P.; SANTHANAM, R.; OAKS, J.J.; EIRING, A.M.; NOTARI, M.; BLASER, B.W. et al. FTY720, a new alternative for treatment blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 117, n.9, p. 2408-2421, 2007.

NGUYEN, T.K.; ATTKISSON, E.; KRAMER, L.; JORDAN, N. ; KOLLURI, N.; MUSCHEN, M.; GRANT, S. HDAC inhibitors potentiate the activity of the Bcr/Abl kinase inhibitor KW-2449 in imatinib-sensitive and resistant Bcr/Abl+ leukemia cells in vitro and in vivo. **Clin. Cancer. Res.**, Denville, 2011.

NICOLETTI, I.; RICCARDI, C.; Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nat. Prot.**, London, v.3, n.3, p.1458-1462, 2006.

NISHII, K.; KABAROWSKI, J.H.; GIBBONS, D.L.; GRIFFITHS, S.D.; TITLEY, I.; WIEDEMANN, L.M.; GREAVES, M.F. et al. BCR-ABL kinase activation confers increased resistance to genotoxic damage via cell cycle block. **Oncogene.**, Basingstoke, v. 13, n.10, p. 2222-2234, 1996.

NOWELL, P.C.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 25, p. 85-109, 1960.

PEREIRA, W.O.; AMARANTE-MENDES, G.P. Apoptosis: A programme of Cell Death Disposal? **Scand.J. Immunol.**, Oxford, v. 73, n.5, p.401-407, 2011.

POTIN, S.; BERTOGLIO, J.; BRÉAD, J. Involvement of a Rho-ROCK-JNK pathway in arsenic trioxide-induced apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells. **Febs Lett.**, Amsterdam, v.581, n.1, p. 118-124, 2007.

QUEIROZ, G.P.; PESSOA, L.A.; PORTARO, F.C.V.; TAMBOURGI, D.V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon.**, v. 52, n.8, p. 842-851, 2008.

RADICH, J.P. Chronic myeloid leukemia 2010: where are we now and where can we go? **Clin. Impact. Targeted Therapies in Myeloproliferative Neoplasms.**, Washington, v. 1, p. 122-128, 2010.

RAKSHIT, S.; MANDAL, L.; PAL, B.C. Involvement of ROS in chlorogenic acid-induced apoptosis of Bcr-Abl⁺ CML cells. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 80, n.11, p. 1662-1675, 2010.

RAMENGHI, U.; BONISSONI, S.; MIGLIARETTI, G.; DEFRANCO, S.; BOTTAREL, F.; GAMBARUTO, C. et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. **Blood.**, Washington, v.95, n.10, p.3176-82, 2000.

RAMOS, O.H.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Snake venom metalloproteases--structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp. Biochem. Physiol.**, New York, v. 142, n.3-4, p. 328-346, 2006.

RATHMELL, J.C.; THOMPSON, C.B. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis and disease. **Cell**, Cambridge, v. 109, p. S97-S107, 2002.

RAVANDI, F.; KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S.; FADERL, S.; GILES, F.J. et al. Expression of apoptosis proteins in chronic myelogenous leukemia: associations and significance. **Cancer**, New York, v. 91, n.11, p. 1964-1972, 2001.

RODRIGUES, R.S.; SILVA, J.F.; FRANÇA, B.; FONSECA, F.P.; OTAVIANO, A.R.; HENRIQUE SILVA, F. et al. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie.**, Paris, v. 91, n.4, p. 490-501, 2009.

SAKURAI, Y.; SHIMA, M.; MATSUMOTO, T.; , TAKATSUKA, H.; NISHIYA, K.; KASUDA, S. et al. Anticoagulant activity of M-LAO, L-amino acid oxidase purified from *Agkistrodon halys blomhoffi*, through selective inhibition of factor IX. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1649, n.1, p. 51-57, 2003.

SAKURAI, Y.; TAKATSUKA, H.; YOSHIOKA, A.; MATSUI, T.; SUZUKI, M.; TITANI K.; FUJIMURA, Y. Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. **Toxicon.**, Oxford, v. 39, n.12, p. 1827-1833, 2001.

SAMEL, M.; VIJA, H.; RÖNNHOLM, G.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, E. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1764, n.4, p. 707-714, 2006.

SANCHES-GARCIA, I.; MARTIN-ZANCA, D. Regulation of Bcl-2 gene expression by BCR-ABL is mediated by RAS. **J. Mol. Biol.**, New York, v. 267, n.2, p. 225-228, 1997.

SARRAY, S.; BERTHET, V.; CALVETE, J. J. SECCHI, J.; MARVALDI, J.; EL-AYEB, M.; MARRAKCHI, N.; LUIS.J. Lebectin, a novel C-type lectin from *Macrovipera lebetina* venom, inhibits integrin-mediated adhesion, migration and invasion of human tumour cells. **Lab Invest.**, New York, v. 84, n. 5, p. 573-581, 2004.

SATTLER, M.; VERMA, S.; SHRIKHANDE, G.; BYRNE, C.H.; PRIDE, Y.B.; WINKLER, T. et al. The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.275, n.32, p.24273-78, 2000.

SAWYERS, C.L. Chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. M.**, Boston, v. 340, n.17. p. 1330-1340, 1999.

SESSIONS, J. Chronic myeloid leukemia. **Am. J. Health Syst. Pharm.**, v. 64, p. 54-59, 2007.

SHAH, N. P.; NICOLL, J.M.; GORRE, M.E.; PAQUETTE, R.L.; KURIYAN, J.; SAWYERS, C.L. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. **Cancer Cell.**, Cambridge, v.2, n.2, p. 117-125, 2002.

SHARMA, K.; WANG, R.X.; ZHANG, L.Y.; YIN, D.L.; LUO, X.Y.; SOLOMON, J.C. et al. Death the faz way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 88, n.3, p. 333-347, 2000. SHARMA; WANG; ZHANG, 2000

SHERBENOU, D.W.; DRUKER, B.J. Applying the discovery of the Philadelphia chromosome. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 117, n.8, p. 2067-2074, 2007.

SHI, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. **Mol. Cell.**, Cambridge, v. 9, n.3, p. 459-470, 2002.

SKULACHEV, V.P. Programmed death phenomena: from organelle to organism. **Ann. NY. Acad. Sci.**, New York, v. 959, p. 214-237, 2002.

SMITH, D.B. Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia: The Impact of Its Effectiveness and Long-term Side. **Effects.J Natl Cancer Inst.**, London, v.103, n.7, p.527-9, 2011.

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. Bioch. Bioph.**, New York, v. 368, n.2, p. 285-290, 1999.

STABELI, R.G.; SANT'ANA, C.D.; RIBEIRO, P.H.; COSTA, T.R.; TICLI, F.K.; PIRES, M.G. et al. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. **Int. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v. 41, n.2, p. 132-140, 2007.

STILES, B.G.; SEXTON, F.W.; WEINSTEIN, S.A. Antibactericidal effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon.**, Oxford, v. 29, n.9, p. 1129- 1141, 1991.

SUDA, T.; TAKAHASHI, T.; GLODTEIN, P.; NAGATA, S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. **Cell.**, Cambridge, v. 75, n.6, p.1169-1178, 1993.

SUHR, S.M.; KIM, D.S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. **Bioch. Biop. Res. Comm.**, New York, v. 224, n.1, p. 134-139, 1996.

SUN, L.K.; YOSHII, Y.; HYODO, A.; TSURUSHIMA, H.; SAITO, A.; HARAKUNI, T. et al. Apoptotic effect in the glioma cells induced by specific protein extracted from Okinawa Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom in relation to oxidative stress. **Toxicol. In Vitro.**, Oxford, v. 17, n.2, p. 169-177, 2003.

SUN, M.; GUO, C.; TIAN, Y.; CHEN, D. Biochemical, functional and structural characterization of Akbu-LAAO: a novel snake venom L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Biochimie.**, Paris, v.92, n.4, p.343-349, 2010.

TALPAZ, M. Treatment of CML: thoughts after ASCO 2002. **Med. Gen. Med.**, New York, v. 4, n.4, p. 11, 2002.

TAN, N.H.; FUNG, S.Y. Snake venom L-amino acid oxidases and their potential biomedical applications. **Mal. J. Biochem. Mol.Biol.**, 2008.

TEMPONE, A.G.; SPENCER, P.J.; LOURENCO, C.O.; ROGERO, J.R.; NASCIMENTO, N. Bothrops moojeni venom kills Leishmania spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochem. Biophys.Res. Comm.**, New York, n.3, v.280, p.620-624.

THORNBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science.**, Washington v. 281, n.5381, p. 1312-1316, 1998.

TORII, S.; NAITO, N.; TSORUO, T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from western diamondback rattlesnake venom. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 278, n.14, p. 40097-40104, 1997.

TORRES, A.F.C.; DANTAS, R.T.; TOYAMA, M.H.; DIZ FILHO, E.; ZARA, F.J.; RODRIGUES DE QUEIROZ, M.G. et al. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. **Toxicon.**, Oxford, v. 55, n.4, p. 795-804, 2010.

TORRES, A.M.; WONG, H.Y.; DESAI, M.; MOOCHALA, S.; KUCHEL, P.W.; KINI, R.M. Identification of a novel family of proteins in snake venoms. Purification and structural characterization of najaaprin from *Naja nigricollis* snake venom. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 278, n.41, p.40097-40104, 2003.

WARREL, D.A. Snake bite. **Lancet**, London, v.375, p.77-88, 2010.

WEI, Y.; STOCKELBERG, D.; HULLBERG, S.; RICKSTEN, A.; WADENVIK, H. Changes in expression of apoptosis related genes are linked to the molecular response to imatinib treatment in Chronic Myeloid Leukemia patients. **Acta Haematol.**, Basel, v. 117, n. 2, p. 83-90, 2007.

WESTBROOK, C.A.; HOOBERMAN, A.L.; SPINO, C.; DODGE, R.K.; LARSON, R.A.; DAVEY, F.; WURSTER-HILL, D.H. et al. Clinical significance of the BCR-ABL fusion gene in adute acute lymphoblastic leukemia: a Cancer and Leukemia group B study (8762). **Blood.**, Washington, v. 80, n.12, p. 2983-2990, 1992.

WONG, S.; WITTE, O. N. Modeling philadelphia chromosome positive leukemias. **Oncogene.**, Basingstoke, v. 20, n.40, p. 5644-5659, 2001.

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, New York, v. 68, p. 251-306, 1980.

YASSIN, M. ; SOLOMON, P.; MAHAJNA, J. Substances from the medicinal mushroom *Daedalea gibbosa* inhibit kinase activity of native and T3151 mutated Bcr-Abl. **Int. J. Onc.**, Athens, v. 32, n.6, p.1197-1204, 2008.

ZHANG, L.; WU, T. Isolation and characterization of ACTX-6: a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon acutus* snake venom. **Nat. Prod. Res.**, London, v. 22, n.6, p. 554-563, 2008.

ZHANG, Y.I.; WANG, J.H.; LEE, W.H.; WANG, Q.; LIU, H.; ZHENG, Y.T.; ZHANG Y. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potencial anti-HIV activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 309, n.3, p. 598-604, 2003.

ZIVNY, J.; KLENER JR. P.; PYTLIK, R.; ANDERA, L. The role of apoptosis in cancer development and treatment: focusing on the development and treatment of hematologic malignancies. **Current Pharmaceutical Design**, Bentham, v. 16, n.1, p. 11-33, 2010.

ZULIANI, J.P.; KAYANO, A.M.; ZAQUEO, K.D.; COUTINHO NETO, A.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: some consideration about their functional characterization. **Prot & Pep. Lett.**, Bentham, v.16, n.8,p.908-912, 2009.