UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito da L- aminoácido oxidase de *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO) na indução de apoptose e modulação de microRNAs em células Bcr-Abl positivas

Sandra Mara Burin

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito da L- aminoácido oxidase de *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO)
na indução de apoptose e modulação de microRNAs em células Bcr-Abl
positivas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à
Farmácia para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia

Orientada: Sandra Mara Burin

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de
Castro

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia em 23/10/2015. A versão original encontra-se
disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2015

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

Burin, Sandra Mara

Efeito da L-aminoácido oxidase de *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO) na indução de apoptose e modulação de microRNAs em células Bcr-Abl positivas, 2015, 131 p. Il. ; 30cm

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

Orientadora: de Castro, Fabíola Attié

1. CR-LAAO. 2. Apoptose. 3. Leucemia mieloide crônica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Sandra Mara Burin

Título do trabalho: Efeito da L-aminoácido oxidase de *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO) na indução de apoptose e modulação de microRNAs em Bcr-Abl positivas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Conceição e Otaides, pelo apoio em todas as horas e por acreditarem em mim. Vocês são meus amores e o meu maior motivo para continuar nesta caminhada.

Ao Henrique, meu amor, amigo e companheiro de todos os momentos, sempre me dando forças quando mais precisei, contribuindo muito para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser o meu guia e meu porto seguro.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro, por ter me acolhido e me dado a oportunidade de realizar mais este trabalho no Laboratório de Hematologia. Agradeço imensamente pela atenção, paciência e por todos os ensinamentos, que ao longo desta trajetória, me serviram como base e inspiração para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Sandro Ghisla, da Universidade de Konstanz, Alemanha, por nos fornecer a CR-LAAO.

À Profa Dra Suely Vilela, coordenadora do Laboratório de Toxinologia, pela valiosa colaboração com este trabalho, cedendo-nos a toxina CR-LAAO e disponibilizando seu laboratório para a realização dos ensaios de atividade da CR-LAAO.

Ao Laboratório de Toxinologia, em especial à aluna Tássia, por toda dedicação no auxílio dos ensaios de atividade da CR-LAAO.

À Dra. Belinda Simões e ao Dr. Leonardo Palma, hematologistas do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP, por nos permitir a coleta do sangue dos pacientes com leucemia mielóide crônica

À Profa Dra Lusânia Antunes e ao Dr. Alexandre Ferro Aissa, do Laboratório de Nutrigenômica, pela colaboração com a realização do ensaio cometa, contribuindo muito com este trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Curti, por disponibilizar o Laboratório de Bioquímica para a realização dos ensaios de potencial de membrana mitocondrial e à aluna Amanda Ouchida, por toda dedicação, paciência e auxílio com estes ensaios.

À Fabiana, por sua colaboração com os experimentos de Citometria de Fluxo.

Ao Henrique e Guilherme pelo valioso auxílio na obtenção das imagens de microscopia.

Às amigas do laboratório de Hematologia: Ana Paula, Cíntia, Cris, Gabi, Juçara, Luciana, Maira, Natália e Thaís, pela amizade, apoio e colaboração.

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

Ao CNPq e CAPES, pela bolsa de doutorado e ao NAP-TOXAN-USP, pelo auxílio financeiro.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

*"Viver é acalantar sonhos e esperanças, fazendo da fé a nossa maior
inspiração. É buscar nas pequenas coisas, um grande motivo para ser feliz"*

Mário Quintana

RESUMO

BURIN, S.M. **Efeito da L-aminoácido oxidase de *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO) na indução de apoptose e modulação de microRNAs em células Bcr-Abl positivas.** 2015. 131f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa clonal caracterizada pela presença do cromossomo Philadelphia e o oncogene *BCR-ABL1*. Este oncogene codifica a oncoproteína Bcr-Abl com atividade tirosina-quinase constitutiva. A proteína Bcr-Abl é responsável pela resistência das células leucêmicas a apoptose. Atualmente, os pacientes com LMC são tratados com os inibidores de tirosina-quinase - mesilato de imatinibe, dasatinibe e nilotinibe. Apesar de o tratamento ser eficiente, pacientes em fases avançadas e mesmo na fase crônica da doença, apresentam resistência à terapia. Desta forma, novos fármacos devem ser investigados para melhorar o tratamento da LMC. As L-aminoácido oxidases (LAAOs) têm sido descritas como substâncias citotóxicas e indutoras de apoptose. Assim, o principal objetivo do presente estudo foi investigar o potencial antitumoral da LAAO isolada da serpente *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO) nas células Bcr-Abl positivas. Avaliou-se a citotoxicidade da CR-LAAO nas linhagens HL-60 (linhagem Bcr-Abl negativa), HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22 (linhagens Bcr-Abl positivas) e nas células mononucleares (MNC) de sangue periférico de indivíduos saudáveis, na presença ou ausência da catalase. Para investigar os mecanismos da ação citotóxica da CR-LAAO, realizou-se os ensaios de indução de apoptose por meio da quantificação das percentagens de núcleos hipodiplóides e anexina V-FITC, nas linhagens celulares e nas células MNC de indivíduos saudáveis e pacientes com LMC. Avaliou-se também os níveis de expressão das caspases 3, 8 e 9, o potencial de membrana mitocondrial, danos no DNA e o efeito apoptótico da toxina combinada com os inibidores de tirosina-quinase nas linhagens Bcr-Abl positivas. Além disso, investigamos se a CR-LAAO foi capaz de modular a expressão dos apoptomiRs miR-15a, miR-16, miR-145, miR-26a, hsa-let-7d, miR-142-3p, miR-29c, miR-146a, miR-21, miR-130a e miR-130b, assim como das proteínas pro- e anti-apoptóticas Bak, Bax, Bid, Bim, A1, Bcl-2, c-Flip, Ciap-2 e Mcl-1 nas linhagens Bcr-Abl positivas. Nossos resultados mostraram que o efeito citotóxico da CR-LAAO foi mais potente nas linhagens Bcr-Abl positivas em relação às células MNC de indivíduos saudáveis, e está associado ao peróxido de hidrogênio produzido durante a reação enzimática da CR-LAAO. Demonstrou-se também que a CR-LAAO induziu apoptose nas linhagens Bcr-Abl positivas testadas e nas células MNC de pacientes com LMC na fase crônica da doença. Em todas as linhagens celulares detectou-se danos no DNA, perda do potencial de membrana e ativação das caspases 3, 8 e 9. A percentagem de apoptose aumentou quando as células HL-60.Bcr-Abl foram tratadas com a CR-LAAO combinada com os inibidores de tirosina-quinase. A CR-LAAO modulou a expressão dos apoptomiRs miR-15a, miR-16, miR-145, miR-26a, hsa-let-7d, miR-142-3p, miR-29c, miR-21, miR-130a e miR-130b e de possíveis proteínas alvos nas linhagens Bcr-Abl positivas. Sendo assim, os resultados obtidos sugerem que a CR-LAAO apresenta uma ação antitumoral capaz de destruir as células leucêmicas.

Palavras – chave: Leucemia mielóide crônica, apoptose, inibidor de tirosina-quinase, L-aminoácido oxidase, *Calloselasma rhodostoma*, apoptomiRs.

ABSTRACT

BURIN, S.M. **L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO) apoptosis induction and microRNAs modulation effect on Bcr-Abl positive cells.** 2015. 131f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative disease characterized by the presence of Philadelphia chromosome and *BCR-ABL1* oncogene. This oncogene encodes the Bcr-Abl tyrosine kinase (TK) which presents a constitutive activity. The Bcr-Abl is responsible for leukemic cells resistance to apoptosis. The CML patients are currently treated with tyrosine kinase inhibitors (TKI) - imatinib mesylate, dasatinib and nilotinib. Although TKI are efficient for CML treatment, patients in advanced phases and even in chronic phase of the disease present resistance to therapy. Thus, potential new drugs must be investigated to improve the CML treatment. The L-amino acid oxidases (LAAOs) have been described as cytotoxic and apoptosis-inducing substances. Here, we investigated the LAAO from *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO) antitumoral potential against Bcr-Abl positive cells. We evaluated the CR-LAAO cytotoxic effect against HL-60 (Bcr-Abl negative cell line), HL-60.Bcr-Abl, K562, KCL22 (Bcr-Abl positive cell lines) and the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy subjects, in the presence or absence of catalase. To investigate the mechanisms underlying the CR-LAAO cytotoxic action, we performed the apoptosis induction assays through the hypodiploid nuclei and annexin-V quantification in the cell lines and PBMC from healthy subjects and CML patients. We also evaluated the levels of caspases 3, 8 and 9 expression, the mitochondrial membrane potential, DNA damage and the apoptotic effect of CR-LAAO combined with TKI on Bcr-Abl positive cells. In addition we investigated if CR-LAAO was capable of modulating the apoptomiRs miR-15a, miR-16, miR-29c, hsa-let-7d, miR-145, miR-146a, miR-21, miR-130a, miR-130b, miR-142-3p and miR-26a, the pro- and anti-apoptotic proteins (Bak, Bax, Bid, Bim, A1, Bcl-2, c-Flip, Ciap-2 and Mcl-1 expression in HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 and KCL22 cells. Our results showed that the CR-LAAO cytotoxic effect was more potent in Bcr-Abl positive cell lines than in PBMC from healthy subjects and it is linked to hydrogen peroxide produced during the enzymatic action of CR-LAAO. It was also demonstrated that CR-LAAO was capable of inducing apoptosis in Bcr-Abl positive cell lines and CML patient's cells in chronic phase of the disease. In all tested cell lines, the loss of mitochondrial membrane potential, DNA damage and caspases 3, 8 and 9 activation were detected. The apoptosis percentage was improved when HL-60.Bcr-Abl cells were treated with CR-LAAO combined with TKI. The CR-LAAO modulated the apoptomiRs miR-15a, miR-16, miR-145, miR-26a, hsa-let-7d, miR-142-3p, miR-29c, miR-21, miR-130a and miR-130b expression as well the predict target proteins levels on Bcr-Abl positive cells. Thus, our results suggest that CR-LAAO presents an antitumoral action capable of destroying the CML cells.

Keywords: Chronic myeloid leukemia, apoptosis, tyrosine-kinase inhibitor, L-amino acid oxidase, *Calloselasma rhodostoma*, apoptomiRs.

RESUMEN

BURIN, S.M. **Efecto de L-amino ácido oxidasa *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO) en la inducción de apoptosis y la modulación de microRNAs en las células Bcr-Abl positivas.** 2015. 131f. Tesis (Doctorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un trastorno mieloproliferativo clonal que se caracteriza por el cromosoma Philadelphia y la presencia de oncogen BCR-ABL1. Este oncogén codifica la Bcr-Abl tirosina quinasa oncogénica con actividad constitutiva. La proteína Bcr-Abl es responsable de la resistencia a la apoptosis de las células leucémicas. Actualmente, los pacientes con CML se trata con los inhibidores de la tirosina quinasa - mesilato de imatinib, nilotinib y dasatinib. Aunque el tratamiento es eficaz, los pacientes en etapas avanzadas e incluso en la fase crónica de la enfermedad son resistentes a la terapia. De este modo, los nuevos medicamentos están siendo investigados para mejorar el tratamiento de la LMC. Las L-aminoácido oxidasas de (LAAOs) se han descrito como citotóxica y sustancias inductoras de apoptosis. El objetivo principal de este estudio fue investigar el potencial antitumoral de LAAO aislado de serpiente *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO) en células de Bcr-Abl positivos. Se evaluó la citotoxicidad de CR-LAAO en HL-60 líneas (línea negativa Bcr-Abl), HL-60.Bcr-Abl, K562 y KCL22 (cepas Bcr-Abl positivos) y células mononucleares (MNC) de la sangre periférica individuos sanos, la presencia o ausencia de catalasa. Para investigar los mecanismos citotóxicos de acción de CR-LAAO, los ensayos de inducción de la apoptosis se realizaron mediante la cuantificación de los porcentajes de núcleos y hipodiplóides anexina V-FITC, las líneas celulares MNC y en células de individuos sanos y pacientes con LMC. También se evaluó los niveles de expresión de caspasa 3, 8 y 9, el potencial de membrana mitocondrial, daño del DNA y efecto apoptótico de la toxina en combinación con inhibidores de la tirosina quinasa en las cepas de Bcr-Abl positivos. Además, se investigó si el CR-LAAO fue capaz de modular la expresión de miR-15a apoptomiRs, miR-16, miR-145, miR-26a, hsa-let-7d, miR-142-3p, miR-29c, MIR -146a, miR-21, miR-130a y miR-130b, así como la pro-y anti-apoptóticos proteína Bak, Bax, Bid, Bim, A1, Bcl-2, c-flip, CIAP-2 y MCL-1 en líneas celulares Bcr-Abl positivos. Nuestros resultados mostraron que el efecto citotóxico de CR-LAAO era más potente en las cepas positivas Bcr-Abl con respecto a las células MNC de individuos sanos y se asocia con el peróxido de hidrógeno producido durante la reacción enzimática de CR-LAAO. También se demostró que la apoptosis inducida por CR-LAAO en Bcr-Abl postivas cepas ensayadas y las células MNC de pacientes con LMC en fase crónica. En todas las líneas celulares se detectó daño en el DNA, la pérdida de potencial de membrana y la activación de la caspasa 3, 8 y 9. La proporción de apoptosis aumentó cuando las células HL-60.Bcr-Abl fueron tratados con el combinado CR-LAAO con inhibidores de tirosina quinasa. El CR-LAAO modula la expresión de miR-15a apoptomiRs, miR-16, miR-145, miR-26a, hsa-let-7d, miR-142-3p, miR-29c, miR-21, miR-130a y miR -130b y possible proteínas objetivos en lãs células Bcr-Abl positivas. Por lo tanto, los resultados sugieren que el CR-LAAO tiene una acción antitumoral puede destruir las células leucêmicas.

Palabras - clave: Leucemia mielógena crónica, apoptosis, inhibidores de la tirosina quinasa, L-amino ácido oxidasa, *Calloselasma rhodostoma*, apoptomiRs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Cariótipo por bandamento G de indivíduo do sexo masculino mostrando o padrão clássico de cromossomo philadelphia 46,XY,t(9;22)(q34;q11)....	4
Figura 2 -	Representação das duas principais vias de ativação da apoptose.....	10
Figura 3 -	Esquema da biogênese, processamento e função do Mirna.....	13
Figura 4 -	Esquema representativo da reação de deaminação oxidativa catalizada pelas L-aminoácido oxidases.....	16
Figura 5 -	Efeito citotóxico da CR-LAAO associada à catalase em linhagens neoplásicas.....	42
Figura 6 -	Morfologia da linhagem celular HL-60 tratada por 24 h com CR-LAAO (µg/mL).....	43
Figura 7 -	Morfologia da linhagem celular HL-60.Bcr-Abl tratada por 24 h com CR-LAAO (µg/mL).....	44
Figura 8 -	Morfologia da linhagem celular K562 tratada por 24 h com CR-LAAO (µg/mL).....	45
Figura 9 -	Morfologia da linhagem celular KCL22 tratada por 24 h com CR-LAAO (µg/mL).....	46
Figura 10 -	Quantificação da apoptose induzida pela CR-LAAO nas linhagens (A) HL-60, (B) (HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22.....	49
Figura 11 -	Indução de apoptose pela CR-LAAO analisada pelo método de HFS nas células mononucleares.....	50
Figura 12 -	Quantificação da apoptose induzida pela CR-LAAO na linhagem K562 analisada pelas marcações de anexina V-FITC e iodeto de propídio.....	52
Figura 13 -	Quantificação de apoptose induzida pela CR-LAAO na linhagem KCL22 analisada pelas marcações com anexina V-FITC e iodeto de propídio.....	54
Figura 14 -	Quantificação da apoptose induzida pela CR-LAAO nas células mononucleares analisada pelas marcações com anexina V-FITC e iodeto de propídio.....	56
Figura 15 -	Deteção da expressão das caspases 3, 8, 9 e PARP na linhagem celular HL-60 tratada com CR-LAAO e VP-16.....	57
Figura 16 -	Deteção da expressão das caspases 3, 8, 9 e PARP na linhagem celular HL-60.Bcr-Abl tratada com CR-LAAO e VP-16.....	58

Figura 17 -	Detecção da expressão das caspases 3, 8, 9 e PARP na linhagem celular K562 tratada com CR-LAAO e VP-16.....	59
Figura 18 -	Detecção da expressão das caspases 3, 8, 9 e PARP na linhagem celular KCL22 tratada com CR-LAAO e VP-16.....	60
Figura 19 -	Potencial mitocondrial das linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 (C) e (D) KCL22.....	62
Figura 20 -	Danos no DNA celular induzidos pela CR-LAAO nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22.....	64
Figura 21 -	Imagem representativa de nucleóides da linhagem K562 após tratamentos com a CR-LAAO mostrando diferentes níveis de danos no DNA.....	65
Figura 22 -	Quantificação da apoptose na linhagem HL-60.Bcr-Abl, induzida pela CR-LAAO combinada com os TKI (A) MI, (B) DAS, (C) NIL e (D) Tratamento apenas com os TKI.....	67
Figura 23 -	Detecção da expressão de fosfotirosina e Bcr-Abl na linhagem HL-60.Bcr-Abl após 24 h de tratamento com a CR-LAAO combinada com os TKI: (A) MI, (B) DAS e (C) NIL.....	68
Figura 24 -	Expressão de miR-15a nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO.....	70
Figura 25 -	Expressão de miR-16 nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO.....	71
Figura 26 -	Expressão de miR-145 nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO.....	72
Figura 27 -	Detecção da proteína Bcl-2 nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 tratadas por 24 h com CR-LAAO.....	73
Figura 28 -	Detecção da proteína Bax nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 tratadas por 24 h com CR-LAAO.....	74
Figura 29 -	Expressão de miR-26a nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO.....	75
Figura 30 -	Detecção da proteína Bid nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 tratadas por 24 h com CR-LAAO.....	76
Figura 31 -	Detecção da proteína Bim nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 tratadas por 24 h com CR-LAAO.....	77
Figura 32 -	Expressão de hsa-let-7d nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C)	

	K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO.....	78
Figura 33 -	Detecção da proteína Bak nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 tratadas por 24 h com CR-LAAO.....	79
Figura 34 -	Detecção da proteína A1 nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 tratadas por 24 h com CR-LAAO.....	80
Figura 35 -	Expressão de miR-142-3p nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO.....	81
Figura 36 -	Detecção da da proteína c-Flip nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 tratadas por 24 h com CR-LAAO.....	82
Figura 37 -	Expressão de miR-29c nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO.....	83
Figura 38 -	Expressão de miR-146a nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO.....	84
Figura 39 -	Detecção da expressão da proteína Mcl-1 nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 tratadas por 24 h com CR-LAAO.....	85
Figura 40 -	Expressão de miR-21 nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO.....	86
Figura 41 -	Expressão de miR-130a nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO.....	87
Figura 42 -	Expressão de miR-130b nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO.....	88
Figura 43 -	Detecção da proteína Ciap-2 nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 tratadas por 24 h com CR-LAAO.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Idade, gênero, fase da doença e tratamento dos pacientes com leucemia mielóide crônica.....	24
Tabela 2 -	Idade e gênero dos indivíduos sadios do grupo controle.....	24
Tabela 3 -	MicroRNAs investigados e seus respectivos genes alvos relacionados à regulação da apoptose.....	33
Tabela 4 -	Anticorpos primários utilizados nos ensaios de <i>western blotting</i>	37
Tabela 5 -	Percentagem de viabilidade celular (médias $\pm$ SD) após tratamentos com a CR-LAAO e VP-16 ($\mu\text{g/mL}$).....	40
Tabela 6 -	Valores de Ct dos miRNAs de referência RNU 24 e RNU 44 para as linhagens celulares com e sem tratamento com a CR-LAAO ($\mu\text{g/mL}$).....	69
Tabela 7 -	Modulação dos microRNAs e respectivos alvos após tratamento com a CR-LAAO na linhagem HL-60.....	90
Tabela 8 -	Modulação dos microRNAs e respectivos alvos após tratamento com a CR-LAAO na linhagem HL-60.Bcr-Abl.....	91
Tabela 9 -	Modulação dos microRNAs e respectivos alvos após tratamento com a CR-LAAO na linhagem K562.....	92
Tabela 10 -	Modulação dos microRNAs e respectivos alvos após tratamento com a CR-LAAO na linhagem KCL22.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	Alfa
Δ	Delta
μ	Micro
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitochondrial
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
ABL	<i>Abelson leukemia</i>
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AlloSCT	Transplante alogênico de células-tronco
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma</i>
BCR	<i>Break point cluster region</i>
<i>BCR-ABL1</i>	Oncogene resultante da translocação t(9;22)q(34;11)
Bcr-Abl	Oncoproteína resultante da expressão do oncogene <i>BCR-ABL1</i>
BH	Bcl-2 homology
CB	Crise Blástica
CR-LAAO	L-aminoácido oxidase isolada de <i>Calloselasma rhodostoma</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CTRL	Controle negativo
DAS	Dasatinibe
DD	<i>Death domain</i>
DED	<i>Death effector domain</i>
DR	<i>Death receptor</i>
BSA	Albumina de soro bovino
Caspase	<i>Cysteine proteases with aspartate specificity</i>
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i>
Diablo	<i>Direct IAP binding protein with low pI</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>

DISK	<i>Death inducing signaling complex</i>
FA	Fase avançada
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FC	Fase crônica
FC/ST	Fase crônica/Sem tratamento
FC/T	Fase crônica/Tratados
Fas	<i>Tumor necrosis factor superfamily receptor 6</i>
FasL	Fas ligante
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FMN	Flavina mononucleotídeo
kDa	Quiilodaltons
JAK/STAT	<i>Janus kinase/signal transducers</i>
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HEPES	Hidroxietilpiperazina
HFS	<i>Hypotonic Fluorescent Solution</i>
LAAO	L-aminoácido oxidase
LLC	Leucemia Linfoide Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia mielóide aguda
m-bcr	<i>Minor breakpoint cluster regions</i>
M-bcr	<i>Major breakpoint cluster regions</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mg	Miligrama
MI	Mesilato de imatinibe
mL	Mililitro
mM	Milimolar
miRNA	microRNA
MM	Massa molar
MMS	Metilmetanosulfonato
MNC	Mononucleares
MO	Medula óssea

MTT	3-(4,5-dimetil-2-thiazolil-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio)
NIL	Nilotinibe
nM	Nanomolar
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	<i>o</i> -fenildianisidina
PARP	<i>Poly-(ADP-ribose)-polimerase</i>
PBMC	<i>Peripheral blood momonuclear cells</i>
PBS	Tampão de salina fosfato
Ph	Philadelphia
pH	Potencial hidrogeniônico
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI	Iodeto de propídeo
pI	Ponto isoelétrico
PI3K/AKT	Fosfatidilinositol 3 quinase/AKT
PVDF	Fluoreto de polivinílico
Py	Fosfotirosina
P190Bcr-Abl	Proteína Bcr-Abl de 190 quilodaltons
P210Bcr-Abl	Proteína Bcr-Abl de 210 quilodaltons
P230Bcr-Abl	Proteína Bcr-Abl de 230 quilodaltons
RNA	Rybonucleic acid
RNAm	RNA mensageiro
RAS	<i>Rat sarcoma vírus</i>
RISK	<i>Death-inducing signaling complex</i>
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 medium</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SMAC	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
ST	Sem tratamento
SV-LAAO	<i>Snake venoms L-amino acid oxidase</i>
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>
TMRE	Perclorato de tetrametilrodamina etil éster
TK	<i>Tyrosine kinase</i>
TKI	<i>Tyrosine kinase inhibitor</i>

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
RESUMEN.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Leucemia Mielóide Crônica.....	2
1.1.1. Características gerais, Diagnóstico e Epidemiologia.....	2
1.1.2. Fisiopatologia e tratamentos.....	3
1.2. Apoptose e Leucemia Mielóide Crônica.....	7
1.3. MicroRNAs.....	11
1.4. L-Aminoácido oxidases isoladas de peçonhas de serpentes.....	15
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivo geral.....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Casuística.....	23
3.2. Material e Métodos.....	25
3.2.1. Linhagens celulares.....	25
3.2.2. Cultivo das linhagens celulares.....	25
3.2.3. Isolamento de células mononucleares de sangue periférico de controles e pacientes com leucemia mielóide crônica.....	25
3.3.4. Obtenção da L-aminoácido oxidase isolada de <i>Calloselasma rhodostoma</i> (CR-LAAO).....	26
3.3.5. Determinação qualitativa de atividade específica de L-aminoácido oxidase.....	26
3.2.6. Avaliação do potencial citotóxico da CR-LAAO.....	27
3.2.7. Determinação da atividade citotóxica da CR-LAAO na presença de catalase.....	28
3.2.8. Avaliação morfológica das linhagens celulares após tratamento com CR- LAAO.....	28

3.2.9. Ensaio de indução de apoptose celular em linhagens celulares e células mononucleares após tratamento com CR-LAAO.....	29
3.2.9.1. Ensaio de apoptose na linhagem HL-60.Bcr-Abl tratada com CR-LAAO combinada aos inibidores de tirosina-quinase.....	30
3.2.10. Análise do potencial de membrana mitocondrial em linhagens celulares tratadas com CR-LAAO.....	30
3.2.11. Avaliação do potencial da CR-LAAO na indução de danos no DNA nas linhagens celulares tratadas com CR-LAAO.....	31
3.2.12. Quantificação da expressão de microRNAs relacionados à apoptose após tratamento das células Bcr-Abl positivas com a CR-LAAO.....	33
3.2.12.1. Extração de RNA.....	34
3.2.12.2. Quantificação da expressão dos miRNAs por PCR em tempo real	34
3.2.13. Determinação da expressão de proteínas por <i>western blotting</i>	35
3.2.14. Análise Estatística.....	37
4. RESULTADOS.....	39
4.1. Avaliação do potencial citotóxico da CR-LAAO.....	39
4.2. Avaliação do efeito do peróxido de hidrogênio na viabilidade celular.....	41
4.3. Avaliação morfológica das linhagens celulares tratadas com CR-LAAO.....	42
4.4. Quantificação da apoptose, induzida pela CR-LAAO, nas linhagens celulares e células mononucleares de controles e pacientes com LMC.....	47
4.5. Análise da ativação das caspases 3, 8, 9 e PARP por <i>western blotting</i>	56
4.6. Detecção do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	60
4.7. Avaliação de danos no DNA celular induzidos pela CR-LAAO.....	62
4.8. Detecção da apoptose na linhagem HL-60.Bcr-Abl após tratamento da CR-LAAO combinada com inibidores de tirosina-quinase.....	65
4.9. Detecção da expressão das proteínas fosfotirosina e Bcr-Abl após tratamentos com a CR-LAAO combinada aos inibidores de tirosina-quinase.....	67
4.10. Análise da expressão de microRNAs nas linhagens Bcr-Abl positivas tratadas com CR-LAAO.....	69
5. DISCUSSÃO.....	95
5.2. Efeito da CR-LAAO combinada aos inibidores de tirosina-quinase.....	102
5.3. Efeito da CR-LAAO na modulação da expressão de microRNAs reguladores de genes envolvidos na apoptose.....	104
6. CONCLUSÕES.....	110

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 112
8. APÊNDICES..... 128
9. ANEXOS..... 130

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leucemia Mielóide Crônica

1.1.1. Características gerais, Diagnóstico e Epidemiologia

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa, resultante de expansão clonal da célula tronco hematopoética alterada (SAWYERS, 1999; MELO; BARNERS, 2007; VAIDYA *et al.*, 2011). A LMC foi descrita pela primeira vez em 1845 por Rudolf Virchow e John Hughes Bennett (AN *et al.*, 2010) e representa cerca de 15 a 20 % das leucemias em adultos, com incidência anual de 1 a 2 casos para cada 100.000 pessoas. Acomete principalmente os homens, na proporção de 2:1, em relação às mulheres (THIENELT *et al.*, 2012; HÖGLUND *et al.*, 2015). A média de idade de pacientes diagnosticados é normalmente de 60 anos, contudo na África e América Latina, essa média cai para 45 anos (FERDINAND *et al.*, 2012; CHEREDA; MELO, 2015).

O único fator de risco comprovado para a LMC é a exposição à radiação ionizante em alta dosagem (CORSO *et al.*, 1995; HEHMANN *et al.*, 2007).

As características clínicas da LMC derivam da proliferação dos precursores mielóides. Laboratorialmente detecta-se aumento da produção de granulócitos maduros, culminando em leucocitose exacerbada, hepato e esplenomegalia (CHEN *et al.*, 2010; THIENELT *et al.*, 2012).

De acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2008, a evolução da LMC envolve três fases: fase crônica (FC), fase acelerada e crise blástica (CB). Cerca de 85 % dos novos casos são diagnosticados na FC, sendo que aproximadamente 40 % dos pacientes apresentam-se assintomáticos ou com sinais e sintomas inespecíficos da LMC, como fadiga, sudorese e cansaço. Nesta fase, observa-se a elevação do número de granulócitos com funções preservadas, associada ou não a hepato-esplenomegalia e trombocitose (SAWYERS, 1999; MELO; BARNERS, 2007; THIENELT *et al.*, 2012).

A doença pode progredir para a fase acelerada após meses ou anos, dependendo principalmente da resposta do paciente ao tratamento instituído na FC. A progressão da doença é definida pela contagem de blastos no sangue periférico e medula óssea (MO),

que na fase acelerada está entre 10 e 20%. Nesta fase há também um aumento de basófilos circulantes. (CHEN *et al.*, 2010; CHEREDA; MELO, 2015).

A crise blástica é caracterizada por elevação do número de blastos, com porcentagem acima de 20 % no sangue periférico e MO de pacientes. Nessa fase, ocorre falha na maturação dos precursores mielóides malignos, que frequentemente apresentam anormalidades citogenéticas que contribuem para a progressão para leucemia linfóide ou mielóide aguda (CHAUFFAILLE, 2009; CHEREDA; MELO, 2015).

Os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela progressão da FC para a fase acelerada e posteriormente para a CB são complexos e ainda pouco esclarecidos. No entanto, a progressão pode ser parcialmente explicada pelo fato de que as células leucêmicas em fase avançada da doença perdem a capacidade de diferenciação e apresentam mutações em genes reguladores da apoptose, ciclo celular, resultando na expansão de células primitivas (blastos) (MELO; BARNES, 2007; CHEREDA; MELO, 2015). Outro fator causal que pode estar envolvido na progressão é o surgimento de novas anormalidades cromossômicas nas células leucêmicas como a trissomia do cromossomo 8 e a perda da função de genes supressores de tumor o como p16 e o p53 (CHEN *et al.*, 2010).

1.1.2. Fisiopatologia e tratamentos

A LMC foi o primeiro tipo de leucemia cuja fisiopatologia foi relacionada a uma anormalidade citogenética, o cromossomo Philadelphia (Ph), descoberto em 1960 por Nowel e Hungerford (MITELMAN, 1993).

O cromossomo Philadelphia é resultante da translocação cromossômica recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22. Esta translocação envolve o proto-oncogene *ABL* (*Abelson leukemia*) localizado no cromossomo 9 região q34 e o gene *BCR* (*breakpoint cluster region*) localizado no cromossomo 22 região q11 (Figura 1).

Figura 1. Esquema representativo de cariótipo com o cromossomo philadelphia. Adaptada de Vaidya *et al.* (2011).

A partir da translocação $t(9;22)(q34;q11)$ ocorre o surgimento do neogene *BCR-ABL1*, responsável pela codificação da proteína Bcr-Abl, que possui atividade tirosina-quinase (TK) constitutiva (SCORE *et al.*, 2010; COMERT *et al.*, 2013). O gene *BCR-ABL1* é observado em todos os casos de LMC e a detecção deste gene, em conjunto com o Ph positivo, é utilizada para confirmar o diagnóstico da doença. A identificação deste gene híbrido gerado pelo cromossomo Ph foi considerada importante avanço para a compreensão da fisiopatologia da LMC (QUINTAS-CARDAMA; CORTES, 2006).

Em células normais, o gene *ABL* exerce o papel de codificar enzimas com atividade tirosina-quinase (TK – *tyrosine kinase*), que são proteínas citoplasmáticas responsáveis pela transferência de grupos fosfato da molécula de adenosina trifosfato (ATP) para um resíduo de tirosina de outras proteínas, processo chamado de fosforilação. A fosforilação é responsável por regular importantes vias de sinalização celular relacionadas à proliferação e apoptose.

O ponto de ruptura do cromossomo 9 durante a translocação do gene *ABL* ocorre sempre no exon a2 (FADERL *et al.*, 1999; VAIDYA *et al.*, 2011) enquanto o gene *BCR* apresenta três principais regiões de pontos de quebra denominadas *breakpoint cluster*

Introdução

regions. As translocações originadas destas regiões de quebra do *BCR* com a região de quebra do gene *ABL* resultam em proteínas Bcr-Abl com diferentes pesos moleculares de 190, 210 e 230 kDa.

Nos pacientes com LMC clássica, a quebra no gene *BCR* ocorre entre os exons b1 e b5, região definida como *major breakpoint cluster regions* (M-bcr) e devido aos *splicing* alternativos, surgem os transcritos b2a2 ou b3a2, originando a proteína quimérica de 210 kDa (P210Bcr-Abl).

Em pacientes com leucemia linfocítica aguda (LLA), o ponto de quebra ocorre na região entre os exons e2' e e2, chamada de *minor breakpoint cluster region* (m-bcr), resultando no transcrito e1a2, que codifica a proteína P190Bcr-Abl, associada a um pior prognóstico da doença. O terceiro ponto de quebra, identificado como *micro breakpoint cluster region* (μ -Bcr), está localizado entre os éxons 19 e 20, originando o transcrito e19a2 e a proteína P230Bcr-Abl, associados à leucemia neutrofílica crônica (VERSCHRAEGEN *et al.*, 1991; CHEREDA; MELO, 2015).

A oncoproteína Bcr-Abl exerce papel central na patogênese da LMC e dentre seus alvos estão membros das vias de sinalização celular MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), PI3K/AKT (fosfatidilinositol-3 quinase) e JAK/STAT (Janus kinase/signal transducers) (KANTARJIAN *et al.*, 2002, NEVIANI *et al.*, 2007; VAIDYA, 2011). A ativação desregulada destas vias pelo Bcr-Abl é responsável pela transformação da célula progenitora hematopoética normal em maligna por meio de três mecanismos principais: alteração da adesão das células progenitoras no estroma medular, manutenção do potencial mitogênico e resistência à apoptose. (MELO *et al.*, 2003; THIENELT *et al.*, 2012; FERDINAND *et al.*, 2012).

Por muitos anos, o tratamento da LMC foi realizado somente por meio de agentes quimioterápicos como o bussulfano e a hidroxycarbamida (TOHAMI *et al.*, 2012). Em 1970, o transplante alogênico de células-tronco (alloSCT) foi introduzido como a única terapia curativa para a LMC. No entanto, o alloSCT era bem sucedido apenas em pacientes com idade inferior a 40 anos, sendo que a média de idade entre os pacientes diagnosticados era de 60 anos, além do alto número de morbidades devido ao desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro (HAZNEDAROGLU, 2014).

O tratamento da LMC foi revolucionado em 2001 com a descoberta do mesilato de imatinibe (MI) ou Glivec[®], um inibidor da atividade TK da proteína Bcr-Abl. O MI tornou-se o medicamento de primeira linha do tratamento de LMC para a maioria dos pacientes diagnosticados na FC (TALPAZ, 2002).

O MI apresenta como mecanismo de ação, a ligação no sítio catalítico da molécula Bcr-Abl na região de ligação do ATP, bloqueando a atividade enzimática e levando a célula leucêmica à morte. Esse fármaco apresenta poucos efeitos colaterais e alta especificidade, ligando-se quase que exclusivamente a proteína Bcr-Abl (VAIDYA *et al.*, 2011). O MI demonstrou elevada atividade na FC da LMC, retardando a progressão para fases mais avançadas e induzindo a remissão hematológica, citogenética e molecular completas em 98%, 73% e 57% dos pacientes, respectivamente (KANTARJIAN *et al.*, 2002; DEFILIPP; KHOURY 2015).

Apesar dos avanços obtidos com a utilização do MI no tratamento da LMC, cerca de 70 a 80% dos pacientes em fase acelerada e CB apresentam resistência à terapia (TOHAMI *et al.*, 2012). De acordo com Soverini *et al.* (2011), as maiores taxas de resistência à terapia estão presentes em pacientes nas fases mais avançadas, contudo cerca de 25 a 30% dos pacientes em FC podem também ser resistentes ao MI.

Além das alterações que surgem com a progressão da doença, como trissomia do cromossomo 8, duplicação do Ph e a expulsão do fármaco MI pela célula leucêmica (DRUKER *et al.*, 2000; JOHN *et al.*, 2004), uma das principais causas desta resistência é a presença de mutações no sítio catalítico de Bcr-Abl, principalmente a mutação T315I, presente em cerca de 20% dos pacientes resistentes ao tratamento com o MI (RADICH *et al.*, 2010, CORTES *et al.*, 2013; BACCARANI *et al.*, 2015).

Nesse contexto, uma das estratégias usadas no tratamento de pacientes com resistência ao MI é a utilização da segunda geração de inibidores de tirosina-quinase (TKI – *tyrosine kinase inhibitors*) como o dasatinibe (DAS) ou sprycel[®] e o nilotinibe (NIL) ou tasisign[®] (BACCARANI *et al.*; 2014). Embora o DAS e o NIL sejam capazes de agir contra todas as células com o gene *BCR-ABL1*, eles não são eficazes em células que apresentam a mutação T315I (SHAMI; DEININGER, 2012; BRECCIA; ALIMENA, 2014). A terceira geração de TKI como bosutinibe ou busulif[®] e ponatinibe ou ariad[®] também foram testados para o tratamento dos pacientes resistentes ao MI. Embora sejam medicamentos mais potentes que o MI, apenas o ponatinibe mostrou-se eficaz nos pacientes portadores de clones com a mutação T315I (BACCARANI *et al.*, 2014).

De maneira geral, apesar das altas taxas de remissão da doença detectada nos pacientes com LMC tratados com os TKI, há ainda problemas que precisam ser contornados como a necessidade de uso contínuo por não serem terapias curativas. O uso

prolongado promove a diminuição da adesão ao tratamento do paciente à terapia e pode induzir o aparecimento de clones leucêmicos resistentes (BRECCIA; ALIMENA, 2014).

Assim sendo, faz-se necessária a busca por novos e mais eficazes medicamentos para o tratamento de pacientes com LMC.

1.2. Apoptose e Leucemia Mielóide Crônica

A apoptose é um processo fisiológico de morte celular programada em eucariotos, que desempenha papel fundamental durante a embriogênese e no controle do tamanho dos diferentes tecidos, do crescimento e sobrevivência celular, inclusive do sistema hematopoético (MAURILLO *et al.*, 2001). O processo de apoptose é caracterizado na célula pela condensação da cromatina celular, integridade da membrana plasmática, degradação do DNA em fragmentos oligonucleosomais, e por fim, redução no volume e fragmentação celular, formando os corpos apoptóticos. Como as células em apoptose são reconhecidas e fagocitadas pelos macrófagos, não há o surgimento de um processo inflamatório (FADOK *et al.*, 1998; NICOLETTI; RICCARDI, 2006; PEREIRA; AMARANTE-MENDES, 2011).

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

O processo de execução da apoptose acontece pela ativação das caspases, que são membros de uma família especial de proteases. Em mamíferos já foram identificados 14 tipos de caspases, sendo que nem todas estão envolvidas na apoptose. As caspases 1, 4, 5, 11, 12 e 13 estão envolvidas em processos inflamatórios (LUO *et al.*, 1998; PEREIRA; AMARANTE-MENDES, 2011).

Estruturalmente, as caspases são proteínas de cadeia simples, caracterizada por um resíduo de cisteína no sítio ativo e uma especificidade não usual para resíduos de ácido aspártico. Durante o processo de morte celular, as caspases participam tanto como iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10), como também executoras ou efetoras (caspases 3, 6 e 7).

As caspases iniciadoras promovem auto-ativação após agregação com moléculas adaptadoras como apoptossomo, complexo DISC (*Death inducing signaling complex*) e

FADD (*Fas-associated death domain*), sendo responsáveis pelas alterações bioquímicas que ocorrem na membrana plasmática, organelas, citoplasma e núcleo das células em apoptose (MARTIN *et al.*, 1996; CULLEN *et al.*, 2010). As caspases executoras, após serem ativadas, clivam substratos celulares necessários para o funcionamento normal das células, como proteínas estruturais do citoesqueleto e proteínas nucleares. Além disso, as caspases podem ativar enzimas como as DNases, que clivam o DNA, resultando em eventos bioquímicos que levam ao surgimento dos fragmentos de DNA oligossomais, uma das principais características da apoptose (RICCARDI; NICOLETTI, 2006). As proteínas chamadas IAPs (*Inhibitors of apoptosis*), como Xiap, Ciap-1 e Ciap-2, inibem a ativação das caspases (HERR; DEBATIN, 2001).

O processo de apoptose pode ser iniciado por duas vias: a via intrínseca ou mitocondrial e a via extrínseca ou de receptor de morte (Figura 2).

A apoptose ativada pela via intrínseca é iniciada por vários sinais intracelulares, tais como, rompimento do citoesqueleto, ausência de fatores de crescimento, hipóxia, infecção por vírus, bactérias e ação de drogas citotóxicas e envolve a permeabilização da membrana mitocondrial externa e esta ativação é regulada por proteínas da família Bcl-2 (AMARANTE-MENDES; GREEN 1999; ELMORE, 2007).

As proteínas desta família compartilham um ou mais domínios de homologia do tipo BH (*Bcl-2 homology*). As proteínas anti-apoptóticas, como A1, Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w e Mcl-1 contêm os quatro domínios BH1, BH2, BH3 e BH4. As proteínas pró-apoptóticas Bak, Bax e Bok possuem todos os domínios, exceto o domínio BH4. As proteínas Bad, Bid, Bik e Bim caracterizam-se apenas pelo domínio BH3 (*BH3-only*) (CHIPUK *et al.*, 2010; PARSONS; GREEN, 2010).

Após ativação da via intrínseca, fatores mitocondriais como citocromo c, Smac/Diablo (*second mitochondria-derived activator of caspases"/"direct IAP-binding protein with a low isoelectric point*) e AIF (*apoptosis-inducing factor*) são liberados para o citosol. O citocromo c, junto com a molécula Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor-1*) e pro-caspase 9 desencadeiam uma série de reações que culminam na formação de um complexo chamado apoptossomo (ZIVNY *et al.*, 2010). A caspase 9 é então clivada e ativada, promovendo a ativação das caspases executoras, que irão clivar o substrato PARP (*poly-(ADP-ribose)-polimerase*), finalizando o processo de apoptose (LIU *et al.*, 2015). A molécula Smac/Diablo tem como função paralisar os efeitos de dos IAPs, colaborando assim para a ativação das caspases. (MASTRANGELO *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015).

A via extrínseca é desencadeada pela interação dos receptores de morte (DR – *death receptors*) aos seus respectivos ligantes. Os DR (CD95, TNFRI, DR3, DR4, DR5 e DR6), são moléculas localizadas na superfície das células e apresentam um domínio extracelular rico em cisteína e um domínio intracelular denominado DD (*death domain*).

A ligação dos receptores com seus respectivos ligantes, por exemplo, Fas/FasL (CD95/CD95L), provoca a trimerização dos DR, recrutando para a membrana duas moléculas sinalizadoras: a molécula adaptadora FADD e pro-caspase 8, formando o complexo DISC. A molécula FADD possui dois domínios, o DD e o DED (*death effector domain*), sendo que o DD se liga ao DR, enquanto o domínio DED interage com a pro-caspase 8 (GOLKS *et al.*, 2005; PEREIRA; AMARANTE-MENDES, 2011).

Após o recrutamento, a pro-caspase 8 é ativada em caspase 8, que pode ativar diretamente a caspase 3 (fase executora da apoptose) ou clivar a proteína Bid, que é convertida da forma inativa para sua forma ativa, originando a proteína Bid truncada (tBid). A proteína tBid provoca a abertura dos poros e a despolarização da membrana mitocondrial, ativando a cascata de apoptose pela via intrínseca. Sendo assim a clivagem da proteína Bid representa um ponto de conexão entre as fases extrínseca e intrínseca da apoptose (HENGARTNER, 2000; ZIVNY *et al.*, 2010).

A principal molécula reguladora desta via é a proteína anti-apoptótica c-Flip (*FADD-like ICE inhibitory protein*), estruturalmente semelhante à caspase 8. Apesar da semelhança estrutural, a proteína c-Flip não possui um domínio catalítico ativo, podendo se ligar ao complexo Fas/FADD sem usar o DD, ou seja, apenas por interações DED-DED, inibindo assim o recrutamento e ativação da pro-caspase 8 (SCAFIIDI *et al.*, 1998; LI *et al.*, 1998; LUO *et al.*, 1998; BUCUR *et al.*, 2015).

Figura 2. Representação das duas principais vias de ativação da apoptose. Via extrínseca ou via de receptor de morte e via intrínseca ou mitocondrial. Adaptada de Hengartner (2000).

A LMC é um exemplo clássico de doença neoplásica na qual a resistência à apoptose contribui para a patogênese (CHEREDA; MELO, 2015).

A proteína Bcr-Abl, além de promover a proliferação das células leucêmicas, parece estar, pelo menos em parte, envolvida na inibição da morte celular, pois inibe a apoptose por vários mecanismos, como o aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como Mcl-1 e c-Flip (BUENO-DA-SILVA *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2004).

Estudos relataram que as células derivadas da MO de pacientes com LMC expressam níveis mais altos dessas proteínas anti-apoptóticas em relação aos indivíduos saudáveis (LI *et al.*, 2007). Além disso, demonstrou-se também que a oncoproteína Bcr-Abl interfere na sobrevivência da célula leucêmica por meio da desregulação de proteínas pró-apoptóticas como Bim, FasL e Bax (BRUMATTI *et al.*, 2003).

Alguns efeitos da proteína Bcr-Abl foram relacionados diretamente com o aumento das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-x_L por meio da ativação das vias PI3K e STAT5. Um estudo mostrou que a fosforilação da via PI3K/AKT aumentou a afinidade da proteína pró-apoptótica Bad por outras proteínas, restringindo sua ação como reguladora de Bcl-2 e Bcl-x_L na mitocôndria. (HORITA *et al.*, 2000; SALOMONI *et al.*, 2000; DE GROOT *et al.*, 2000; NESHAT *et al.* 2000; CHEREDA; MELO, 2015).

Apesar do aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas explicarem pelo menos em parte a razão da resistência das células leucêmicas à morte celular, os mecanismos celulares e moleculares da proteína Bcr-Abl envolvidos na apoptose não foram totalmente esclarecidos (CHEREDA; MELO, 2015).

Sendo assim, a descrição de substâncias capazes de tornar essas células mais sensíveis à apoptose podem colaborar para o aumento da eficácia do tratamento da LMC.

1.3. MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA endógenos não codificantes, contendo aproximadamente 22 nucleotídeos que regulam a expressão gênica por meio da degradação do RNA mensageiro (RNAm) ou inibindo sua tradução (VENTURINI *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2010).

Os miRNAs foram relatados pela primeira vez em *Caenorhabditis elegans* durante uma triagem da perda de mutações funcionais durante o desenvolvimento larval (LEE *et al.*, 2004). Estudos posteriores mostraram que estão expressos na maioria dos eucariotos e encontram-se envolvidos no controle de vários processos celulares como diferenciação, proliferação e apoptose celular (KERSCHER; SLASH, 2006; BEREZIKOV, 2011; BOUSQUET; LODISH, 2011).

Estima-se atualmente que o genoma humano é capaz de codificar mais de 1.000 tipos de miRNAs, e que cada um pode controlar vários genes alvos e assim regular cerca um terço dos transcritos humanos (BABASHAH *et al.*, 2012). O fato dos miRNAs modularem a expressão de um “gene alvo” ressalta o papel dessas moléculas sobre o perfil de expressão gênica e proteica nas células (KERSCHER; SLACK 2006).

A biogênese dos miRNAs tem início no núcleo e se completa no citoplasma (LEE *et al.*, 2004; BORCHERT *et al.*, 2006).

O processo inicia-se com a síntese do miRNA precursor dupla fita, chamado pri-miRNA, que contém cerca de 2kb e está localizado em regiões de íntrons e éxons. O

transcrito resultante do pri-miRNA é clivado pela enzima Drosha e a molécula DGCR8, formando uma estrutura intermediária que contém aproximadamente 70 nucleotídeos e o *loop* original, conhecida como pré-miRNA, que é exportado para o citoplasma e processado pela enzima Dicer, perdendo o *loop* e gerando o miRNA dupla fita de 22 nucleotídeos. As duplas fitas são separadas, sendo que uma delas é degradada e a outra incorporada ao complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*). Os miRNAs incorporados ao RISC reconhecem e se ligam de maneira complementar a região 3' UTR (*3' untranslated region*) de transcritos não codificantes do RNAm alvo. No RISC a molécula Argonauta 2, com função de endonuclease, cataliza a clivagem do RNA mensageiro (RNAm). Desta forma a regulação negativa da expressão gênica pode ocorrer por meio dos mecanismos: 1) o miRNA se liga com complementaridade perfeita ao RNAm alvo, que é degradado ou 2) impede a tradução do RNAm quando a complementaridade ao miRNA não for perfeita (HUTVAGNER; ZAMORE 2002; VENTURINI *et al.*, 2007) (Figura 3).

Figura 3. Esquema da biogênese, processamento e função do miRNA. Adaptada de Babashah *et al.* (2012).

Os miRNAs estão diferencialmente expressos nos diversos tecidos e na maioria das vezes com padrões de expressão dependente do contexto celular (MATTICK *et al.*, 2005). Embora os miRNAs exerçam importantes papéis nas diversas funções celulares, sua expressão anormal tem sido associada a patogênese de doenças, como tumores sólidos e neoplasias hematológicas (CALIN *et al.*, 2002; CIMMINO *et al.*, 2005; KENT; MENDELL, 2006; BABASHAH *et al.*, 2012; GORDON *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*,

2014). Devido a variedade de funções, muitos miRNAs são considerados oncogenes ou supressores de tumor. O grande desafio atualmente é a definição dos potenciais alvos destas moléculas e como modulá-los para potencial uso terapêutico (BABASHAH *et al.*, 2012; MISHRA, 2014)

A leucemia linfocítica crônica (LLC) foi a primeira doença maligna humana associada a desregulação da expressão de miRNA. Calin e colaboradores (2002), detectaram que os miR-15a e miR-16 estavam pouco expressos ou ausentes em células leucêmicas de 70% dos pacientes com LLC, sendo que em linfócitos saudáveis, esses dois miRNAs apresentam níveis de expressão elevados. Além disso, essa expressão anormal encontrada nos pacientes com LLC foi correlacionada com altos níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-2.

Na LMC, a expressão anormal de miRNAs está associada com a progressão e a fisiopatologia da doença. Venturini *et al.* (2007) reportaram um aumento da expressão do *cluster* miR-17-92 em células de pacientes com LMC na FC e associaram essa expressão diferencial com o aumento do oncogene *c-Myc* e também com as fases da doença. Posteriormente estudos identificaram outros miRNAs diferencialmente expressos na LMC como miR-10a, miR-150, miR-151, miR-7, miR-23a, miR-26a, miR-29a, miR-29c, miR-30b, miR-30c, miR-100, miR-126, miR-134, miR-141, miR-183, miR-196b, miR-199a, miR-224, miR-326, miR-422b e miR-520a. Com exceção do miR-10a, os demais miRNAs apresentaram expressões anormais associadas à atividade TK da proteína Bcr-Abl (AGIRRE *et al.*, 2008; SAN JOSÉ-ENÉRIZ *et al.*, 2009; FLAMANT *et al.*, 2010).

Tendo em vista que o efeito anti-apoptótico de Bcr-Abl nas células dos pacientes com LMC está, pelo menos em parte, relacionado ao aumento da expressão dos genes e proteínas reguladores da apoptose, Ferreira e colaboradores (2014) avaliaram a expressão dos miRNAs cujos alvos são genes reguladores do processo de apoptose (apoptomiRs) na LMC. Neste estudo foram analisados os perfis de expressão de 160 miRNAs dos quais nove estavam potencialmente associados à regulação do processo de apoptose celular: miRNAs hsa-let-7d, miR-15a, miR-16, miR-26a, miR-29c, miR-130b, miR-142-3p, miR-145 e miR-146a. Os resultados mostraram desregulação na expressão desses apoptomiRs e dos seus possíveis genes alvos reguladores da apoptose (*AI*, *BCL-2*, *c-FLIP*, *CIAP-1*, *CIAP-2* e *MCL-1*) em diferentes fases da doença e após tratamentos com o MI, DAS e NIL.

Pelo exposto, verifica-se a importância do papel dos miRNAs na fisiopatologia das neoplasias hematológicas, incluindo a LMC, tornando-se assim importante ferramenta para as pesquisas que buscam por novos alvos terapêuticos.

1.4. L-aminoácido oxidases isoladas de peçonhas de serpentes

As peçonhas das serpentes são constituídas por uma mistura complexa de substâncias tóxicas, orgânicas e inorgânicas. Dentre as toxinas presentes nas peçonhas das serpentes estão as proteínas, as quais incluem proteases, desintegrinas, oxidases (L-aminoácido oxidases), hialuronidasas e metaloproteases. As proteínas representam aproximadamente 90% do peso seco da peçonha bruta e são responsáveis por graves efeitos durante o envenenamento, como a necrose de tecidos, neurotoxicidade e hemorragias (MATSUI *et al.*, 2000, RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; CALVETE *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas, as toxinas de serpentes têm sido consideradas importantes ferramentas tanto para melhor compreensão dos mecanismos do envenenamento e tratamento de suas intoxicações (BERTAZZI *et al.*, 2005), como também para o desenvolvimento de compostos com ações farmacológicas, incluindo fármacos com potencial antitumoral. Dentre as toxinas que vem apresentando potencial farmacológico, destacam-se as L-aminoácido oxidases (LAAOs) (GUO *et al.*, 2012, COSTA *et al.*, 2014).

As L-aminoácido oxidases são consideradas flavoenzimas e estão presentes em várias espécies de seres vivos, como nas peçonhas de serpentes, insetos, fungos, bactérias e até mesmo plantas (DU; CLEMETSON, 2002).

As LAAOs isoladas de peçonhas de serpentes (SV-LAAOs – *snake venom L-aminoacid oxidases*) são glicoproteínas homodiméricas em que a massa molecular pode variar entre 110 a 150 kDa na sua forma nativa e entre 50 a 70 kDa nas suas formas monoméricas. Estas enzimas apresentam um ponto isoelétrico (pI) entre 4,4 e 8,12 (SOUZA *et al.*, 1999; DU; CLEMETSON, 2002). Cada monômero das LAAOs se liga por meio de interações fortes não covalentes, a um cofator, que pode ser o FMN (Flavina mononucleotídeo) ou o FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo), sendo o FAD comumente encontrado nas SV-LAAOs. As riboflavinas presentes nos cofatores das LAAOs são as responsáveis pela coloração amarela das peçonhas de serpentes (CISCOTTO *et al.*, 2009).

As LAAOs são enzimas que catalisam a deaminação oxidativa estereoespecífica dos substratos L-aminoácidos de forma estereoespecífica. O ciclo catalítico das LAAOs inicia-se com a meia-reação de redução, convertendo o FAD em FADH₂. Durante esta meia-reação de redução, o aminoácido substrato é oxidado em iminoácido, que sofre uma hidrólise espontânea gerando α -cetoácido e amônia. Uma nova meia reação de redução acontece com a reoxidação do FADH₂ pelo oxigênio molecular, produzindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂), completando assim o ciclo catalítico (Figura 4) (CURTI *et al.*, 1992; ALVES-PAIVA *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2014).

Figura 4. Esquema representativo da reação de deaminação oxidativa catalizada pelas L-aminoácido oxidases. Adaptado de Costa *et al.* (2014).

As SV-LAAOs representam de 1 a 9% do total de proteínas presentes nas peçonhas de serpentes das famílias *Viperidae*, *Crotalidae* e *Elapidae* e possuem elevada atividade enzimática (ALI *et al.*, 2000; SAMEL *et al.*, 2006).

Antes de 1990, os estudos com essas enzimas focavam na investigação de suas propriedades físico-químicas e enzimáticas, principalmente para a identificação de aminoácidos isômeros ópticos e preparação de α -cetoácidos. Atualmente, as SV-LAAOs vêm despertando grande interesse na área científica e médica por apresentarem ações bactericida, fungicida, leishmanicida, alto potencial citotóxico e indutor de apoptose em linhagens celulares tumorais (TORII *et al.*, 1997; ZULIANI *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2012). Nesse contexto, Araki e colaboradores (1993), reportaram pela primeira vez que toxinas isoladas de serpentes promoveram indução de apoptose em células endoteliais vasculares. Posteriormente, este dado foi confirmado e outros pesquisadores relataram que as SV-LAAOs são as responsáveis pelo efeito apoptótico observado nas células

endoteliais e em diferentes linhagens celulares tumorais (SUHR; KIM, 1996; TORII *et al.*, 1997).

A LAAO isolada de *Bothrops pirajai*, por exemplo, induziu apoptose nas linhagens tumorais S180 (tumor Ascístico Murino Sarcoma 180), SKBR-3 (câncer mama), Jurkat (leucemia T aguda humana), EAT (tumor Ascístico de Erlich), HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e HL-60.Bcr-Abl (leucemia mieloide crônica) (IZIDORO *et al.*, 2006; BURIN *et al.*, 2013).

Foi descrito também que a LAAO de *Bothrops leucurus* apresentou efeito citotóxico contra as linhagens tumorais MKN-45 (câncer de estômago), RKO (câncer colorretal), enquanto que a LAAO de *Lachesis muta* induziu citotoxicidade nas linhagens MCF-7 (câncer de mama) e AGS (adenocarcinoma gástrico) (NAUMANN *et al.*, 2011; BREGGE-SILVA *et al.*, 2012).

Embora os mecanismos pelos quais as SV-LAAOs exercem os efeitos biológicos como citotoxicidade e indução de apoptose não tenham sido totalmente esclarecidos, estudos relatam que esses efeitos estão pelo menos em parte, associados à geração de H_2O_2 . O H_2O_2 , pertence às espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*), que são responsáveis por promover desestabilização na membrana mitocondrial da célula, induzindo a morte celular (SUHR; KIM, 1996; ZHANG; WU, 2008; SOUZA *et al.*, 2009; ALVES-PAIVA *et al.*, 2011; FUNG *et al.*, 2015).

Para certificar-se do efeito do H_2O_2 produzido pela ação das LAAOs, os efeitos citotóxicos e apoptóticos das SV-LAAOs têm sido avaliados na presença da catalase (enzima que degrada o H_2O_2 em H_2O e O_2). Dessa forma é possível observar se o efeito das SV-LAAOs é total ou parcialmente dependente do H_2O_2 . Desta forma, estudos da estrutura das SV-LAAOs são importantes para melhor elucidar os mecanismos de ação destas toxinas.

A *Calloselasma rhodostoma* é uma espécie de serpente terrestre, que pertence à família Viperidae, conhecida também como Malayan pit viper, *Agkistrodon rhodostoma* ou jararaca asiática (DALTRY *et al.*, 1996; MOUSTAFA *et al.*, 2006). Esta espécie é encontrada no Vietnã, Camboja, Tailândia e Malásia, sendo responsável por grande parte dos acidentes ofídicos ocorridos nestes países (RATANABANANGKON, 2014). Os sintomas de seu envenenamento são geralmente dor intensa, edema, necrose local e alterações na coagulação sanguínea. Trata-se da primeira espécie de serpente a ter o genoma completamente sequenciado (DALTRY *et al.*, 1996; BRUSERUD, 2013).

A peçonha da *C. rhodhostoma* está bem caracterizada do ponto de vista estrutural, bioquímico e molecular. Devido ao potencial anticoagulante observado nos casos de envenenamento, foi a primeira peçonha de serpente a ser estudada por apresentar efeito biológico. A peçonha é rica em desintegrinas, lectina, LAAO, fosfolipase A2, metaloprotease, e serinoprotease. (DALTRY *et al.*, 1996; VEJAYAN *et al.*, 2014).

A grande quantidade de LAAO encontrada na peçonha desta serpente despertou o interesse para o seu isolamento, purificação e determinação da função biológica

O isolamento e purificação da LAAO isolada da peçonha da *C. rhodhostoma* (CR-LAAO) foram realizados por dois passos cromatográficos: uma coluna de exclusão molecular Sephadex G-200 seguida por uma coluna de troca iônica Mono-Q. Após a purificação observou-se que a CR-LAAO, assim como as demais SV-LAAOs, é uma enzima homodimérica, com um peso molecular de 132 kDa e pI 4,4 (PONNUDURAI *et al.*, 1994). Estudos com essa enzima permitiram observar que apesar de apresentar pH alcalino, sua estabilidade da CR-LAAO é maior em pH neutro. A enzima permanece estável por até 3 dias a -20 °C e até 5 dias com variações de temperatura entre 4 e 25 °C. Observou-se que a CR-LAAO corresponde a aproximadamente 30% do peso seco da peçonha bruta e que 4% da massa desta enzima corresponde a carboidratos, com a presença de manose e N-acetyl-D-glucosamina na poção glicano da CR-LAAO. Algumas das regiões da CR-LAAO foram sequenciadas e apresentaram 83% de identidade com as LAAOs de *Crotalus adamanteus* e *Crotalus atrox* (MACHEROUX *et al.*, 2001).

A CR-LAAO apresenta estrutura dimérica, na qual cada monômero é constituído por três domínios estruturais: ligante de FAD, ligante de substrato e helicoidal. A cristalografia do sítio ativo da estrutura da CR-LAAO com o substrato L-fenilalanina revelou formação de longa reentrância no formato de Y entre os domínios ligantes de substrato e o helicoidal, permitindo o encaixe do substrato à enzima, em que uma das porções deste canal atuaria como porta de entrada para o oxigênio molecular e a outra região atuaria na liberação de H₂O₂ para a superfície externa da proteína (PAWELEK *et al.*, 2000; MOUSTAFA *et al.*, 2006).

Estudos realizados com a CR-LAAO demonstraram que a enzima apresenta citotoxicidade e capacidade de induzir apoptose em células de levedura (ANDE *et al.*, 2008) e em linhagens tumorais como Jurkat (leucemia aguda de linfócitos T) (ANDE *et al.*, 2006).

Introdução

Diante do exposto, o presente estudo pesquisou o potencial antitumoral da LAAO de *Calloselasma rhodostoma* e contribuiu para o melhor entendimento dos mecanismos de ação desta em células Bcr-Abl positivas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Determinar a capacidade da CR-LAAO em induzir a apoptose e modular a expressão de microRNAs associados à regulação da expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas em linhagens celulares Bcr-Abl positivas.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar o potencial citotóxico da CR-LAAO nas linhagens celulares HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22, e em células mononucleares de indivíduos saudáveis;
2. Investigar a participação do peróxido de hidrogênio no potencial citotóxico da CR-LAAO;
3. Analisar o efeito indutor de apoptose da CR-LAAO nas linhagens celulares HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22, em células mononucleares de indivíduos saudáveis e de pacientes com leucemia mieloide crônica; verificar nas linhagens celulares se a apoptose é induzida pela via intrínseca ou extrínseca;
4. Avaliar se a apoptose da linhagem celular HL-60.Bcr-Abl, induzida pela CR-LAAO, é potencializada pelos inibidores de tirosina-quinase mesilato de imatinibe, dasatinibe e nilotinibe;
5. Determinar o efeito da CR-LAAO na perda de potencial de membrana mitocondrial e na capacidade de indução de danos no DNA nas linhagens celulares HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22;
6. Investigar o potencial efeito da CR-LAAO na modulação de miRNAs envolvidos na regulação da expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas nas linhagens celulares HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22.

3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram analisadas 10 amostras de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica, provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -USP, sendo seis do sexo masculino e quatro do sexo feminino, com média de idade de 40 anos. Desses 10 pacientes, cinco estavam em fase crônica (dois sem tratamento e três tratados com MI) e cinco na fase avançada da doença (três em fase acelerada e dois em crise blástica tratados com MI ou DAS) (Tabela 1).

O diagnóstico dos pacientes estudados foi realizado por meio de achados clínico-laboratoriais, detecção do cromossomo Philadelphia (Ph) e/ou do gene *BCR-ABL1*.

O grupo controle foi formado por indivíduos sadios adultos, doadores voluntários pertencentes à comunidade da Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto - USP, sendo composto seis do sexo masculino e quatro do sexo feminino, com média de idade de 40 anos (Tabela 2).

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em humanos da Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto -USP e pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, protocolo nº 243 / 2012 (Anexo A e Anexo B). Foram incluídos neste estudo os pacientes que não apresentavam histórico de outras neoplasias, doenças inflamatórias crônicas ou infecções virais e bacterianas ou doenças auto-imunes e neurodegenerativas. A seleção e o acompanhamento clínico dos pacientes foram realizados pelos hematologistas Dra. Belinda Pinto Simões e Dr. Leonardo Palma (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP).

As amostras de sangue de pacientes e controles foram coletadas somente após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Tabela 1. Idade, gênero, fase da doença e tratamento dos pacientes com leucemia mielóide crônica

Amostra	Idade	Gênero	Fase da doença	Tratamento
1	29	M	FC	ST
2	64	M	FC	ST
3	32	F	FC	MI
4	57	F	FC	MI
5	26	F	FC	MI
6	41	F	FA	MI
7	30	M	FA	DAS
8	52	M	CB	DAS
9	34	M	CB	MI
10	32	M	FA	DAS

FC: fase crônica; FA: fase acelerada; CB: crise blástica; ST: sem tratamento; F: feminino; M: masculino; MI: mesilato de imatinibe; DAS: dasatinibe.

Tabela 2. Idade e gênero dos indivíduos sadios do grupo controle

Amostra	Idade	Gênero
1	29	M
2	65	M
3	32	F
4	52	F
5	31	F
6	39	F
7	31	M
8	52	M
9	35	M
10	32	M

F: feminino; M: masculino

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Linhagens celulares

Foram utilizadas as linhagens celulares HL-60 (ATCC nº: CCL-240), HL-60.Bcr-Abl, K562 (ATCC nº: CCL 243) e KCL22. A linhagem HL-60 (ATCC: CCL-240) é derivada de pacientes com leucemia promielocítica aguda. A linhagem HL-60.Bcr-Abl foi obtida de células HL-60 infectadas com retrovírus recombinante transfectados com (ψ 2 + PA 317) contendo o plasmídeo pSR MSV p185bcr-abl tkneo contendo *BCR-ABL1* (BUENO DA SILVA *et al.*, 2003). Importante enfatizar que as células HL-60.Bcr-Abl são resistentes à morte celular induzida por diferentes indutores de apoptose quando comparadas à linhagem HL-60, Estas linhagens são bons modelos de estudo visto que a expressão ectópica de Bcr-Abl em células HL-60 confere a esta linhagem resistência à apoptose contra vários agentes apoptogênicos (BRUMATTI *et al.*, 2003; BUENO-DA-SILVA *et al.*, 2003).

As linhagens K562 e KCL22 são Bcr-Abl positivas obtidas de pacientes em crise blástica com as respectivas translocações: b3a2 e b2a2 (LOZZIO; LOZZIO, 1979; <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-519.html>). As linhagens HL-60.Bcr-Abl e KCL22 foram gentilmente cedidas pelo Dr. João P. Gustavo Amarante Mendes do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – São Paulo, Brasil.

3.2.2. Cultivo das linhagens celulares

As linhagens celulares foram cultivadas à 37 °C e 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640 medium) completo acrescido de 10 % de soro fetal bovino (SFB), glutamina 2 mM, penicilina / estreptomicina 100 unidades/mL e HEPES 25mM.

3.2.3. Isolamento de células mononucleares de sangue periférico de controles e pacientes com leucemia mielóide crônica

Foram colhidos 20 mL de sangue periférico dos indivíduos sadios (grupo controle) e dos pacientes com LMC. A colheita foi realizada em tubos de coleta à vácuo contendo

EDTA e as células mononucleares (MNC) foram isoladas do sangue periférico por meio do método de gradiente de densidade Ficoll-Hypaque[®] (Histopaque-1,077) (Sigma-Aldrich Diagnostics, Inc., Missouri, USA), conforme descrita por Boyum em 1977. Este método consiste na adição de 13 mL de Histopaque densidade 1,077 em um tubo cônico de 50 mL e na pipetagem lenta de 30 mL de sangue periférico diluído em tampão de salina-fosfato (PBS) na proporção 1:3. O tubo foi centrifugado a 500 x g durante 30 minutos a 22 °C e a camada (anel) que continha as MNC foi retirada. As células mononucleares foram lavadas uma vez com PBS, centrifugadas a 453 x g por 10 minutos a 4 °C e ressuspensas em 1 mL de PBS para determinação da viabilidade por azul de trypan e contagem das células em câmara de Neubauer. As células de pacientes e controles, para posterior utilização nos ensaios de indução de apoptose, foram armazenadas em solução de congelamento na proporção de 90% de soro bovino fetal e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO) em nitrogênio líquido. Para os ensaios de determinação de citotoxicidade celular, as células MNC dos indivíduos sadios foram utilizadas a fresco.

3.3.4. Obtenção da L-aminoácido oxidase isolada de *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO)

A enzima CR-LAAO foi gentilmente cedida pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Sandro Ghisla do Departamento de Biologia da Universidade de Konstanz, Alemanha. A purificação da toxina foi realizada de acordo com a metodologia que consta do trabalho publicado por Ponnudurai *et al.* (1994). A CR-LAAO foi purificada por meio da realização de dois passos cromatográficos usando as colunas Sephadex G-200 (cromatografia de gel de filtração) e Mono-Q (cromatografia de troca iônica de alta afinidade), em que a enzima purificada exibe pH ótimo de 9,0 e não perde a atividade enzimática após incubação em diferentes temperaturas (4 e 25 °C por 5 dias). Após purificada, a CR-LAAO foi liofilizada. Para a realização dos ensaios, a toxina foi solubilizada em PBS e armazenada a 4 °C.

3.3.5. Determinação qualitativa de atividade específica de L-aminoácido oxidase

A atividade enzimática da CR-LAAO foi avaliada antes de cada ensaio funcional, seguindo o protocolo descrito por Pessatti *et al.* (1995), com modificações. Determinou-

se a atividade em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7.2 a 25 °C, por meio do ensaio de enzima conjugada.

Para a reação utilizou-se 50 uL de solução de *o*-fenildianisidina (OPD) (10 mg/mL em metanol), 8 µL de enzima peroxidase de rabanete (1 mg/mL) e 20 µL de CR-LAAO (já ressuspendida em PBS), adicionados em 5 mL de solução com L-leucina (0,1% em 0,1 M Tris-HCl, pH 7.2). Trata-se de um ensaio qualitativo, em que a CR-LAAO, gera peróxido de hidrogênio através da deaminação oxidativa do substrato L-leucina presente na reação. A peroxidase de rabanete degrada o peróxido de hidrogênio, liberando oxigênio, que oxida o OPD. Após a oxidação é liberado o radical cátion, que entre 10 a 30 minutos gera coloração amarela, indicando que a enzima está ativa.

A determinação desta atividade foi realizada no laboratório de toxilogia da Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto – USP, coordenado pela Profa. Dra. Suely Vilela.

3.2.6. Avaliação do potencial citotóxico da CR-LAAO

As linhagens celulares e células MNC dos controles foram cultivadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5 % CO₂ em placas de 96 poços (2 x 10⁴ células por poço), contendo diferentes as concentrações de CR-LAAO, 0,05; 0,15; 0,25; 0,35; 0,5; 0,75; 1,00; 1,50 e 2.50 µg/mL. Foi usado como controle de 100 % de viabilidade as células sem tratamento. O Etoposídeo (VP-16), na concentração de 25 µM (1.50 µg/mL) foi usado como controle de morte celular. Importante ressaltar que as células Bcr-Abl positivas são resistentes à ação do VP-16, enquanto a HL-60 é sensível (BUENO-DA-SILVA *et al.*, 2003). A atividade citotóxica da CR-LAAO foi avaliada pelo método colorimétrico de citotoxicidade, descrito por Mosmann (1983), que consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Nas células vivas, as desidrogenases mitocondriais são capazes de reduzir substratos como o 3-(4,5-Dimetiltiazol-il) 2,5-Difenil brometo de tetrazolium (MTT), formando o azul de formazan. Sendo assim, após 24 horas de tratamento, foram adicionados 20 µL de MTT (3-(4,5-dimetil-2-thiazolil-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio) na concentração de 5 mg/mL. Após 3 horas, as placas foram centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos em 22 °C. O sobrenadante foi retirado e foram acrescentados 200 µL de DMSO por poço para dissolver os sais de formazan depositados no fundo da placa. Após 30 minutos, com a

dissolução dos sais de formazan, a absorbância da solução colorida foi determinada por espectrofotômetro em 570 nm.

Os testes foram realizados em três experimentos independentes avaliados em triplicatas. Calculou-se o (IC₅₀) relativo, para a obtenção da concentração responsável por matar 50% das células, por meio do software *GraphPad Prism 5* (versão 5.0; Graphpad Software, San Diego, Califórnia, EUA). O cálculo foi realizado a partir de uma curva de inibição dose-resposta, utilizando-se as médias das absorbâncias de cada experimento.

3.2.7. Determinação da atividade citotóxica da CR-LAAO na presença de catalase

Para investigar se o efeito CR-LAAO sobre as linhagens celulares está associado à liberação de H₂O₂, a porcentagem de viabilidade celular, após o tratamento das células com CR-LAAO na presença de catalase, foi determinada. Paralelamente aos ensaios de citotoxicidade e nas mesmas condições, as linhagens celulares foram cultivadas com CR-LAAO (0,05; 0,15; 0,25; 0,35; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50 e 2,50 µg/mL) e catalase na concentração de 150 U/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Foi usado como controle de 100 % de viabilidade as células sem tratamento. Utilizou-se também o controle de catalase, em que as células foram tratadas apenas com catalase na concentração de 150 U/mL. Após os tratamentos, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT descrito no item acima. Os resultados foram expressos a partir da diferença das porcentagens entre os tratamentos com e sem catalase. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes e avaliados em triplicata.

3.2.8. Avaliação morfológica das linhagens celulares após tratamento com CR-LAAO

A morfologia das linhagens celulares HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22 foi observada, após 24 h de tratamento com a CR-LAAO nas concentrações 0,05; 0,25; 0,35 e 1,00 µg/mL, em uma ampliação de 200× no microscópio invertido Olympus CKX41 (Olympus, Shinjuku, Tóquio, Japão). O etoposídeo (VP-16) na concentração de 1,50µg/mL foi usado para induzir apoptose nas linhagens celulares, sendo, portanto o controle positivo de morte celular.

3.2.9. Ensaio de indução de apoptose celular em linhagens celulares e células mononucleares após tratamento com CR-LAAO

Este ensaio foi realizado para avaliar a sensibilidade das linhagens celulares e células MNC de indivíduos saudáveis e pacientes com LMC à apoptose induzida pela CR-LAAO. A apoptose celular foi quantificada pelos métodos de solução hipotônica fluorescente (HFS - *Hypotonic fluorescent solution*), descrito por NICOLETTI, 1991 e marcação com anexina V conjugada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (VAN ENGELAND *et al.*, 1998). As análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCanto (BD, San Jose, CA, EUA), utilizando o software Diva.

- ***Ensaio de HFS***

Para a realização deste ensaio, 1×10^5 células por poço foram cultivadas em placas de 24 poços. As linhagens HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22 foram tratadas em diferentes tempos (18 e 24 h) e com diferentes concentrações de CR-LAAO: 0,05; 0,15; 0,25; 0,35; 0,5; 0,75; e 1,00 $\mu\text{g/mL}$. As células MNC de indivíduos saudáveis e pacientes com LMC foram tratadas com CR-LAAO por 12 h nas seguintes concentrações: 0,05; 0,25; 0,35 e 1,00 $\mu\text{g/mL}$. O VP-16 (1,50 $\mu\text{g/mL}$) foi usado como controle de morte celular, visto que as linhagens celulares HL-60.Bcr-Abl são resistentes à apoptose. As células sem tratamento foram usadas como controle negativo. Após os tratamentos, as células foram recolhidas em tubos FACs, centrifugadas a $240 \times g$ durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. Foram adicionados 400 μL de HFS (50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de iodeto de propídio em citrato de sódio a 0,1% e Triton X-100 a 0,1%). Incubou-se por 20 minutos no escuro a 4°C . A percentagem de morte celular foi quantificada por meio da avaliação do conteúdo de DNA genômico através da intensidade de fluorescência dos núcleos hipodiplóides. Foram adquiridos 5000 eventos e os resultados foram expressos em gráficos na forma de histograma de acordo com a intensidade de fluorescência.

- ***Ensaio de Anexina V conjugada ao fluorocromo FITC***

Para a realização deste método, 1×10^5 células por poço foram cultivadas em placas de 24 poços. As linhagens celulares K562 e KCL22 foram tratadas em diferentes tempos (12, 18 e 24 h) e com diferentes concentrações de CR-LAAO: 0,05; 0,15; 0,25; 0,35; 0,5; 0,75; e 1,0 $\mu\text{g/mL}$. As células MNC de indivíduos saudáveis e pacientes com LMC foram tratadas com CR-LAAO por 12 h nas seguintes concentrações: 0,05; 0,25; 0,35 e

1,0 µg/mL. As células tratadas com o VP-16 (1,50 µg/mL) foram utilizadas como controle positivo de morte celular e as células sem tratamento como controle negativo. Após os tratamentos, as células foram recolhidas em tubos FACs, centrifugadas por 240 x g durante 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante desprezado. As células foram ressuspensas em 100 µL de tampão de anexina (10 mM Hepes pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM KCL, 1 mM MgCl₂ e 1.8 mM CaCl₂) e centrifugadas novamente. Após a retirada do sobrenadante, as células foram incubadas em 100 µL de anexina V conjugada com FITC (diluída 1:500 em tampão de anexina) por 20 minutos no escuro em temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados à suspensão celular 100 µL de tampão de anexina e 1 µL da solução 250 µg/mL de iodeto de propídio (PI). As amostras foram analisadas por citometria de fluxo, com a aquisição de 10000 eventos. Os resultados foram expressos através das percentagens de morte celular na fase precoce de apoptose (externalização da fosfatidilserina) em que há uma marcação positiva para anexina V e negativa para o PI (anexina V⁺/PI⁻) e na fase de apoptose tardia, em que há marcação positiva tanto para anexina V e quanto para o PI (anexina V⁺/PI⁺). Os gráficos são apresentados na forma de *dot-plot*

A fosfatidilserina não é bem exposta em linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl, portanto a apoptose celular destas linhagens não foi avaliada por este método.

3.2.9.1. Ensaio de apoptose na linhagem HL-60.Bcr-Abl tratada com CR-LAAO combinada aos inibidores de tirosina-quinase

Com o objetivo de investigar se a CR-LAAO potencializa os efeitos dos TKI, células HL-60.Bcr-Abl, foram incubadas por 24 h na presença de CR-LAAO (concentrações descritas no item anterior) com mesilato de imatinibe (10 µM/poço), Dasatinibe (10 nM/poço) ou Nilotinibe (20 nM/poço). As células sem tratamento foram usadas como controle negativo. Após os tratamentos, 1 x 10⁵ células foram coletadas e avaliadas pelo método HFS, enquanto 1 x 10⁶ células foram armazenadas em tampão de fosfoproteína a – 80 °C para posterior análise das proteínas fosfotirosina, Bcr-Abl e c-abl por *western blotting* (metodologia descrita no item 3.2.13).

3.2.10. Análise do potencial de membrana mitocondrial em linhagens celulares tratadas com CR-LAAO

Este ensaio foi realizado para medir o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das linhagens HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22 após o tratamento com a CR-LAAO nas concentrações 0,05; 0,25; 0,35 e 1,00 $\mu\text{g/mL}$ por 6 h. As células também foram cultivadas com VP-16 (1,50 $\mu\text{g/mL}$), para comprovar que as linhagens Bcr-Abl positivas são resistentes à morte celular induzida por quimioterápicos. As células sem tratamento foram usadas como controle negativo. O perclorato de tetrametilrodamina etil éster (TMRE) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi utilizado para realizar a medida do $\Delta\Psi_m$. O TMRE é uma sonda catiônica lipofílica que produz fluorescência vermelha e se acumula, de forma inversamente proporcional ao $\Delta\Psi_m$.

A diminuição da fluorescência do TMRE indica despolarização da membrana, ou seja, da perda do $\Delta\Psi_m$. Para a realização do ensaio, 1×10^5 células/poço foram cultivadas com diferentes concentrações da CR-LAAO em placas de 24 poços por 6 h. Após o tratamento, as células foram coletadas, centrifugadas em $240 \times g$ por 10 minutos a 4°C .

Os sobrenadantes foram descartados, as células lavadas com PBS, ressuspendidas em 25 nM de TMRE (diluído em RPMI sem fenol RED) e incubadas por 20 minutos à 37°C ao abrigo da luz. Posteriormente, estas células foram novamente lavadas e ressuspendidas em 200 μL de PBS. A fluorescência do TMRE das células foi detectada em citômetro de fluxo, FACSCanto (Becton-Dickinson, San Jose, CA, EUA) e analisadas pelo *software* Diva no comprimento de onda de excitação de 568 nm e emissão >590 nm. Foram realizados três experimentos independentes e avaliados em triplicata e os resultados foram expressos de acordo com a percentagem de células que apresentavam perda de $\Delta\Psi_m$.

Os ensaios foram realizados em colaboração com a aluna de doutorado Amanda Tomie Ouchida e o Prof. Dr. Carlos Curti do laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto – USP.

3.2.11. Avaliação do potencial da CR-LAAO na indução de danos no DNA nas linhagens celulares tratadas com a toxina

Para analisar o potencial da CR-LAAO na indução de dano no DNA, as linhagens celulares HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22 foram tratadas por 6 h com diferentes concentrações de CR-LAAO: 0,05, 0,15, 0,25, 0,35, 0,50, 0,75 e 1,00 $\mu\text{g/mL}$. As linhagens celulares cultivadas na ausência da CR-LAAO foram usadas como controle negativo e as células tratadas com 200 μM de metilmetanosulfonato (MMS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) como controle positivo de indução de dano ao DNA.

O ensaio cometa foi realizado sob condições alcalinas de pH = 13 de acordo com o método descrito por Singh *et al.* (1988) e Tice *et al.* (2000).

As suspensões celulares (10 µL) foram misturadas com 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (Gibco, Gaithersburg, MD, Estados Unidos) e espalhadas por uma lâmina pré-coberta com agarose normal 1,5%, cobrindo-a com uma lamínula. As lâminas foram mantidas em repouso por 10 minutos a 4°C para solidificação da agarose. Em seguida, após a retirada das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, DMSO 10%, Triton X-100 1%, pH 10) por 60 minutos a 4°C. As lâminas foram tratadas com tampão alcalino de eletroforese (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH > 13, 4°C) por 20 minutos, para permitir o desnaturamento do DNA e a expressão de quebras de fita dupla e fita simples e sítios alcali-lábeis, que são nucleotídeos sem bases (apenas com fosfato e açúcar), que se manifestam como quebra quando expostos ao pH alcalino.

A eletroforese horizontal foi realizada a 25 V e 300 mA (0,74V/cm) durante 20 minutos, usando o mesmo tampão alcalino de eletroforese descrito anteriormente. Após a eletroforese, as lâminas foram mergulhadas em solução de neutralização (Tris 0,4M, pH 7,5 a 4° C) por 15 minutos. As lâminas foram secas a temperatura ambiente, fixadas em etanol absoluto por 2 minutos, e após secas, foram armazenadas a temperatura ambiente até o momento da análise. Cada lâmina foi codificada aleatoriamente, coradas com uma solução a 1:10000 (v/v) de GelRedTM (Biotium, Hayward, California, Estados Unidos) em PBS 1X e imediatamente analisadas.

Foram realizados três experimentos independentes e os nucleoides foram identificados em microscópio de fluorescência (AxioStar Plus, Carl Zeiss Axio Cam MRc - AxioVision 3.1) utilizando filtro 515-560nm, barreira de filtro de 590nm, e ampliação de 40 ×. As imagens de pelo menos 100 campos aleatórios, obtidas a partir de duas lâminas (50 nucleoides/lâmina), foram analisadas pelo sistema Comet Assay IVTM, versão 4.3 (Perceptive Instruments, Bury St. Edmunds, United Kindgom). O parâmetro selecionado para análise foi a intensidade da cauda (% DNA na cauda), que representa a porcentagem de DNA fragmentado nas caudas dos cometas.

Este ensaio foi realizado em colaboração com o Dr. Alexandre Ferro Aissa e Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes do Laboratório de Nutrigenômica da Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto – USP.

3.2.12. Quantificação da expressão de microRNAs relacionados à apoptose após tratamento das células Bcr-Abl positivas com a CR-LAAO

Para a realização destes ensaios, as linhagens celulares HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22 foram tratadas por 24 h com a CR-LAAO nas concentrações de 0,05-0,50 µg/mL. Para cada linhagem, foram selecionadas duas concentrações de CR-LAAO, sendo uma concentração subletal, em que não foi observado efeito na indução de apoptose, e uma concentração capaz de induzir apoptose, com o principal objetivo de avaliar se mesmo em doses subletais a CR-LAAO é capaz de modular a expressão de miRNAs reguladores de possíveis genes alvos envolvidos no processo de apoptose.

Os critérios utilizados para a escolha dos miRNAs empregados nesse estudo foram baseados no trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa (FERREIRA *et al.*, 2014). Nesse trabalho relatou-se que os miRNAs miR-15a, miR-16, miR-145, miR-26a, hsa-let-7d, miR-142-3p, miR-29c, miR-146a, miR-21, miR-130a e miR-130b estavam diferencialmente expressos nas células Bcr-Abl positivas e possivelmente associados a regulação de genes pró- e anti-apoptóticos, consequentemente associados ao perfil de resistência dessas células a apoptose. Estes miRNAs, chamados apoptomiRs, investigados no presente estudo e os possíveis genes alvos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. MicroRNAs investigados e seus respectivos genes alvos relacionados à regulação da apoptose

microRNA	Possíveis genes alvos
miR-15a	<i>Bcl-2</i>
miR-16	<i>Bcl2</i>
miR-145	<i>Bax e Bcl-2</i>
miR-26a	<i>Bid, Bim</i>
hsa-let-7d	<i>Bak e A1</i>
miR-142-3p	<i>c-Flip</i>
miR-29c	<i>Mcl-1</i>
miR-146a	<i>Mcl-1</i>
miR-21	<i>Ciap-2</i>
miR-130a	<i>Ciap-2</i>
miR-130b	<i>Ciap-2</i>

3.2.12.1. Extração de RNA

As linhagens celulares tratadas com a CR-LAAO foram armazenadas na concentração de 3×10^6 células em 1 ml de Trizol[®] a -80°C e submetidas à extração do RNA total conforme protocolo do fabricante (Life Technologies, Carlsbad, EUA), que consiste na recuperação do RNA da fase aquosa pela adição de clorofórmio seguida de vigorosa agitação e centrifugação. Em seguida, a fase aquosa contendo o RNA foi submetida à precipitação com isopropanol a -20°C *overnight*, com posterior centrifugação a $12000 \times g$ por 15 minutos a 4°C . O precipitado final de RNA foi lavado com etanol 70 % e ressuspensão em 13 μL de água destilada ultrapura livre de RNases e DNases (água DEPC) (Life Technologies, Carlsbad, EUA). A concentração de RNA total foi quantificada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm no equipamento NanoVue (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, EUA).

Para determinação da integridade do RNA extraído das células, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando-se o corante GelRed (Biotium, Hayward, EUA), em que a corrida foi realizada com corrente elétrica de 80 Volts durante 50 minutos. As bandas 28S e 18S, cujas presenças determinam a integridade do RNA obtido das amostras, foram visualizadas em um transiluminador UV.

3.2.12.2. Quantificação da expressão dos miRNAs por PCR em tempo real

Foi utilizado o RNA extraído das amostras de linhagens celulares tratadas pela CR-LAAO. O RNA na concentração de 2,5 ng/ μL foi pipetado com inibidor de RNase e aos reagentes do kit High Capacity cDNA reverse transcription[®] (Applied Biosystems, Foster City, EUA) conforme especificações do fabricante. Foram utilizados os *looped-primers*[®], que são oligonucleotídeos específicos para a transcrição dos miRNAs investigados. Preparou-se a mistura da reação utilizando-se 0,5 μL de RT *buffer* (10x); 0,05 μL de dNTP (100 nM); 0,063 μL de RNase *inhibitor* (RNase out); 0,33 μL de MultiScribe[™] Reverse Transcriptase; 2,39 μL de água DEPC e 1,0 μL de *looped-primer* específico.

A reação para transcrição foi realizada através da cadeia da polimerase (PCR) convencional em que as amostras foram incubadas e submetidas ao seguinte ciclo: a 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos no equipamento Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha). Após esta etapa, os

cDNAs foram diluídos na proporção 1:4 (v/v) em água DEPC. Posteriormente foi realizada a PCR em Tempo Real para quantificação dos miRNAs utilizando-se o Kit TaqMan[®] microRNA assay Human (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

A mistura da reação foi preparada utilizando-se 5 µL do reagente TaqMan[®] (10x); 0,5 µL de sonda (20x) (marcada com fluorocromo FAM e específica para cada miRNA); 0,5 µL de água DEPC e 4 µL do cDNA (diluído 1:4). A reação foi submentida a um ciclo de 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto. Devido à atividade 5' → 3" exonuclease da enzima Taq, a cada ciclo da reação, há a degradação da sonda, permitindo a emissão de fluorescência através do fluorocromo FAM, detectado pelo equipamento Step One Plus (Applied Biosystems, Foster City, EUA) no comprimento de onda de 520 nm.

Os valores da expressão dos miRNAs foram obtidos com base no Ct (*cycle threshold*), utilizando-se a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*fold change*). Como miRNAs de referência (miRNAs endógenos) foram utilizados o RNU 24 e RNU 44.

3.2.13. Determinação da expressão de proteínas por *western blotting*

Esta metodologia foi utilizada para avaliar os níveis das proteínas:

A) caspases 3, 8, 9 e PARP clivado para checar se a apoptose induzida pela CR-LAAO foi ativada pela via intrínseca ou extrínseca nas linhagens HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22;

B) fosfotirosina, c-abl e Bcr-Abl para avaliar o efeito da CR-LAAO combinada com os TKI na linhagem HL-60.Bcr-Abl;

C) Bax, Bim, Bid, Bak, A1, Bcl-2, Ciap-2, c-Flip e Mcl-1 para avaliar o efeito da modulação dos apoptomiRs que regula a expressão dos RNA relacionados às proteínas pró- e anti-apoptóticas nas linhagens HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22 .

Para a realização dos ensaios, 1×10^6 células foram tratadas por 24 h com diferentes concentrações de CR-LAAO (0,05-1,00 µg/mL). Em todos os experimentos as células sem tratamento foram usadas como controle negativo.

Nos ensaios de detecção das caspases 3, 8, 9 e PARP clivado, o VP-16 (1,50 µg/mL) foi usado como controle de morte celular.

Para avaliar os níveis de fosfotirosina, c-abl e Bcr-Abl, a linhagem HL-60.Bcr-Abl foi tratada com a CR-LAAO na presença do MI (10 µM/poço), DAS (10 nM/poço) ou NIL (20 nM/poço).

Nos ensaios realizados para avaliar os níveis das proteínas Bax, Bim, Bid, Bak, A1, Bcl-2, Ciap-2, c-Flip e Mcl-1, as linhagens celulares foram tratadas com uma dose de CR-LAAO subletal e uma capaz de induzir apoptose.

Após os devidos tratamentos, as células foram coletadas, centrifugadas a 240 x g durante 10 minutos a 4 °C, ressuspensas em tampão de lise (20 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA pH 7.4, 150 mM NaCl, Igepal CA 630 1 %, inibidores de fosfatase e protease) e armazenadas a -80 °C para posterior quantificação das proteínas totais.

As concentrações totais das proteínas foram determinadas através do kit BCA protein assay[®] (Thermo Fischer Scientific – Waltham, MA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Quantidades iguais de proteínas (25 µg) foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Amersham ECL Plus[®], GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, EUA). As membranas foram bloqueadas por 2 horas em solução de bloqueio (0,01 % azida) com 5 % de leite desnatado ou 5 % de albumina sérica bovina (BSA) (para proteínas fosforiladas) e subsequentemente incubadas à 18 °C entre 16 e 84 h com os anticorpos primários de interesse. As diluições destes anticorpos foram realizadas em solução de bloqueio nas devidas concentrações. Após a retirada dos anticorpos primários, as membranas foram lavadas com tampão TBS-T (100 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl e 1 % Tween 20) e incubadas com o respectivo anticorpo secundário (anti-camundongo ou anti-coelho) (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) conjugado à peroxidase, na diluição 1:5000, por uma hora em temperatura ambiente.

A revelação das membranas foi realizada pelo método de quimioluminescência, conforme as recomendações dos fabricantes (Amersham ECL Plus[®], GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, EUA). A proteína tubulina foi usada para a normalização entre as amostras.

As informações sobre os anticorpos utilizados e as respectivas diluições estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4. Anticorpos primários utilizados nos ensaios de *western blotting*

Anticorpos (MM)	Marca	Origem	Diluição
anti-caspase3 (32 kDa)	Calbiochem®	policlonal de coelho	1:1000
anti-caspase 8 (55 kDa)	BD Pharmigen®	monoclonal de coelho	1:1000
anti-caspase 9 (47 kDa)	BD Pharmigen®	monoclonal de coelho	1:250
anti-A1 (BFL1) (29 kDa)	Sigma-Aldrich®	policlonal de coelho	1:1000
anti-Bak (24 kDa)	Cell Signaling®	policlonal de coelho	1:500
anti-Bax (20 kDa)	BD Pharmigen®	policlonal de coelho	1:1000
anti-Bcl-2 (26 kDa)	Cell Signaling®	monoclonal de coelho	1:1000
anti-Bid (23 kDa)	BD Pharmigen®	monoclonal de camundongo	1:1000
anti-Bim (23 kDa)	BD Pharmigen®	policlonal de coelho	1:1000
anti-c-abl (120 kDa)	Milipore®	monoclonal de camundongo	1:1000
anti-Ciap-2 (70 kDa)	Cell Signaling®	monoclonal de coelho	1:1000
anti-c-Flip (55 kDa)	Cell Signaling®	policlonal de coelho	1:1000
anti-fosfotirosina (py)	Upstate Biotech®	policlonal de camundongo	1:1000
anti-Mcl-1 (40 kDa)	Santa Cruz®	policlonal de coelho	1:1000
anti-PARP (89 kDa)	Cell Signaling®	policlonal de coelho	1:1000
anti-tubulina (48 kDa)	Sigma-Aldrich®	policlonal de coelho	1:5000

MM: massa molecular

3.2.14. Análise Estatística

As análises comparativas dos resultados obtidos das percentagens das células tratadas e não tratadas nos ensaios de citotoxicidade, apoptose (com as linhagens), perda do potencial de membrana e danos no DNA foram analisadas pelo teste One Way Anova seguido pelo *post-test* de Dunnett's. O teste t (Student's *t*-test) foi usado para analisar os resultados obtidos nos ensaios de tratamentos das linhagens celulares com a CR-LAAO na presença e ausência de catalase e combinada com os TKI.

O software utilizado para as análises foi o Prisma versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do potencial citotóxico da CR-LAAO

A avaliação do potencial citotóxico da enzima CR-LAAO foi realizada nas linhagens celulares HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562, KCL22 e nas células mononucleares (MNC) de 10 indivíduos saudáveis. As células foram tratadas com CR-LAAO nas concentrações: 0,05; 0,15; 0,25; 0,35; 0,5; 0,75; 1,00; 1,50 e 2,50 $\mu\text{g/mL}$ e com o VP-16 na concentração de 1,50 $\mu\text{g/mL}$.

Na linhagem HL-60 foi observado diminuição da viabilidade celular após o tratamento com CR-LAAO a partir da concentração de 0,50 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) (Tabela 5). O valor do IC_{50} relativo para esta célula foi de 0,26 $\mu\text{g/mL}$. (intervalo de confiança de 95 % = 0,07843 a 0,8793).

Nas células HL-60.Bcr-Abl e K562 a diminuição da viabilidade celular ocorreu a partir do tratamento com CR-LAAO na concentração de 0,75 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) (Tabela 5). Os valores de IC_{50} relativos para estas células foi de 0,70 $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confiança de 95 % = 0,1521 a 3,265) e 1,81 (intervalo de confiança de 95 % = 0,8309 a 3,966), respectivamente.

Na linhagem KCL22, a diminuição da viabilidade celular foi observada apenas na maior concentração testada, 2,50 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) (Tabela 5). O valor de IC_{50} relativo para esta linhagem foi de 9,83 $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confiança de 95 % = 0,06492 a 14,90). Nenhuma das concentrações utilizadas de CR-LAAO foi capaz de provocar diminuição da viabilidade celular as células MNC em mais de 20%.

O etoposídeo (VP-16) diminuiu a viabilidade celular em aproximadamente 70% na linhagem HL-60, enquanto que nas células mononucleares, linhagens HL-60.Bcr-Abl / KCL22 e K562 a diminuição da viabilidade ocorreu entre 30% e 50%. (Tabela 5).

Tabela 5. Percentagem de viabilidade celular (médias ± SD) após tratamentos com a CR-LAAO e VP-16 (µg/mL)

	CTRL	CR-LAAO (µg/mL)									VP-16
		0,05	0,15	0,25	0,35	0,50	0,75	1,00	1,50	2,50	1,50
HL-60	100 ±0,0	93,0 ±7,6	87,3 ±5,8	73,2 ±11,6	91,6 ±9,6	52,3 ±1,5*	42,3 ±6,7*	37,7 ±4,9*	36,9 ±2,7*	44 ±8,7*	30 ±8,6*
HL-60.Bcr-Abl	100 ±0,0	98,6 ±10,4	91,1 ±13,1	95,9 ±5,26	86,26 ±0,7	67,4 ±17,0	38,9 ±15,0*	36,4 ±13,8*	33,3 ±13,3*	34,5 ±6,3*	73,1 ±11,9
K562	100 ±0,0	96,6 ±3,7	93,8 ±2,6	91,1 ±6,8	86,8 ±2,1	80,5 ±4,3	60,9 ±1,3*	52,4±10,6*	34,6 ±1,8*	28,1,±2,5*	54 ±2,23*
KCL22	100 ±0,0	99,6 ±0,4	100,4 ±1,2	99,6 ±0,4	99,6 ±0,4	99,9 ±1,3	83,8 ±13,0	85,8 ±8,9	68,5 ±15,1	50,2 ±20,9*	73,6 ±17,4
MNC	100 ±0,0	100,5 ±3,1	92,3 ±10,4	87,0 ±11,2	89,1 ±12,6	84,5 ±12,4	85,9 ±12,4	79,8 ±17,3	75,1 ±11,8	78,7,± 14,5	49,7 ± 23,9

CTRL: células sem tratamento; MNC: células mononucleares; VP-16: etoposideo; SD: desvio padrão. Análise estatística: * p<0,05 vs. CTRL (one-way ANOVA seguido pelo *post-test* de Dunnett's).

4.2. Avaliação do efeito do peróxido de hidrogênio na viabilidade celular

Para avaliar se o efeito citotóxico da CR-LAAO estava associado com a liberação de H_2O_2 , as quatro linhagens celulares tumorais foram tratadas com a toxina nas concentrações 0,05; 0,15; 0,25; 0,35; 0,50; 0,75; 1,00; 1,5 e 2,50 $\mu\text{g/mL}$ e catalase na concentração de 150 U/mL. Foi possível observar mudança no perfil de citotoxicidade da CR-LAAO em todas as linhagens celulares, pois a viabilidade celular aumentou na presença da catalase, ficando entre 80-100% (Figura 5-D). Comparando os resultados entre os tratamentos com e sem catalase, na linhagem HL-60, a viabilidade aumentou cerca de 40-50% nas concentrações de 0,50-2,50 $\mu\text{g/mL}$ após adição de catalase ($p < 0,05$) (Figura 5A). Nas linhagens celulares HL-60.Bcr-Abl e K562 a viabilidade celular aumentou cerca de 30-50% após a adição da catalase nas concentrações de 0,75-2,50 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) (Figura 5B-C). Na linhagem KCL22, o aumento da viabilidade celular foi de aproximadamente 35% na concentração de 2,50 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) (Figura 5D).

Os resultados obtidos indicam que a citotoxicidade da CR-LAAO nas linhagens Bcr-Abl positivas está associada à liberação do H_2O_2 produzido durante a reação enzimática da CR-LAAO. Interessante notar que as linhagens apresentam sensibilidade diferente ao H_2O_2 .

Figura 5. Efeito citotóxico da CR-LAAO associada à catalase em linhagens neoplásicas. Os gráficos representam as percentagens de viabilidade das linhagens celulares (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22. Resultados expressos pela média $\pm$ SD de três experimentos independentes analisados em triplicata. CTRL: células sem tratamento; CC: controle catalase (células tratadas apenas com catalase); SD: desvio padrão. Análise estatística: * $p < 0,05$ vs. catalase (-) (Student's *t*-teste).

4.3. Avaliação morfológica das linhagens celulares tratadas com CR-LAAO

Os aspectos morfológicos das linhagens celulares HL-60 (Figura 6), HL-60.Bcr-Abl (Figura 7), K562 (Figura 8) e KCL22 (Figura 9), após 24h de cultivo com a CR-LAAO nas concentrações: 0,05; 0,25; 0,35 e 1,00 µg/mL apresentaram alterações como: diminuição de tamanho, pregas de membrana e “debris”. O tratamento com VP-16 provocou efeito similar ao da CR-LAAO apenas na linhagem HL-60, As linhagens Bcr-Abl positivas mantiveram suas características morfológicas após o tratamento com o VP-16.

Figura 6. Morfologia da linhagem celular HL-60 tratada por 24 h com CR-LAAO ($\mu\text{g/mL}$), (A) CTRL (células sem tratamento), (B-E) HL-60 cultivada com CR-LAAO em diferentes concentrações: (B) 0,05, (C) 0,25, (D) 0,35, (E) 1,00, (F) HL-60 cultivada com Etoposídeo (VP-16; 1,50 $\mu\text{g/mL}$). A morfologia celular foi analisada na ampliação de 200 $\times$ em microscópio invertido Olympus CKX41.

Figura 7. Morfologia da linhagem celular HL-60.Bcr-Abl tratada por 24 h com CR-LAAO ($\mu\text{g/mL}$). (A) CTRL (células sem tratamento), (B-E) HL-60.Bcr-Abl tratada com CR-LAAO em diferentes concentrações: (B) 0,05, (C) 0,25, (D) 0,35, (E) 1,00, (F) HL-60.Bcr-Abl tratada com Etoposídeo (VP-16; 1,50 $\mu\text{g/mL}$). A morfologia celular foi analisada na ampliação de 200 $\times$ usando microscópio invertido Olympus CKX41.

Figura 8. Morfologia da linhagem celular K562 tratada por 24 h com CR-LAAO ($\mu\text{g/mL}$). (A) CTRL (células sem tratamento), (B-E) K562 tratadas com CR-LAAO em diferentes concentrações: (B) 0,05, (C) 0,25, (D) 0,35, (E) 1,00, (F) K562 tratadas com Etoposídeo (VP-16; 1,50 $\mu\text{g/mL}$). A morfologia celular foi analisada na ampliação de 200 $\times$ usando microscópio invertido Olympus CKX41.

Figura 9. Morfologia da linhagem celular KCL22 tratada por 24 h com CR-LAAO ($\mu\text{g/mL}$). (A) CTRL (células sem tratamento), (B-E) KCL22 tratada com CR-LAAO em diferentes concentrações: (B) 0,05, (C) 0,25, (D) 0,35, (E) 1,00, (F) KCL22 tratada com Etoposídeo (VP-16; 1,50 $\mu\text{g/mL}$). A morfologia celular foi analisada na ampliação de 200 $\times$ usando microscópio invertido Olympus CKX41.

4.4. Quantificação da apoptose, induzida pela CR-LAAO, nas linhagens celulares e células mononucleares de controles e pacientes com LMC

- ***Resultados da quantificação da apoptose induzida por CR-LAAO nas linhagens celulares***

A indução de apoptose foi avaliada pelo método de HFS nas linhagens celulares HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22 tratadas com CR-LAAO nas concentrações: 0,05; 0,15; 0,25; 0,35; 0,50; 0,75 e 1,00 $\mu\text{g/mL}$ e com o VP-16 (1,50 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados foram expressos pela percentagem de núcleos hipodiplóides, comparando-se as células tratadas com os respectivos controles negativos (células sem tratamento).

Os resultados obtidos na linhagem HL-60 mostraram aumento da percentagem de núcleos hipodiplóides após os tratamentos com 18 e 24 h. Nos dois tempos analisados e nas concentrações de 0,25-1,00 $\mu\text{g/mL}$ de CR-LAAO, as percentagens de núcleos hipodiplóides aumentaram em torno de 50 e 90%. Os tratamentos com o VP-16 mostraram aumento das percentagens de núcleos hipodiplóides em cerca de 80-90% ($p<0,05$), nos dois tempos analisados (Figura 10A).

Na linhagem HL-60.Bcr-Abl, os resultados obtidos mostraram aumento de 45% da percentagem de núcleos hipodiplóides após 18 h com o tratamento de 0,50 $\mu\text{g/mL}$ de CR-LAAO ($p<0,05$). A partir das demais concentrações testadas (0,75-1,00 $\mu\text{g/mL}$), a percentagem de núcleos hipodiplóides atingiu o patamar de 80%. Após 24 h, o tratamento com 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de CR-LAAO aumentou a percentagem em aproximadamente 35% ($p<0,05$). Nas demais concentrações (0,35-1,00), o aumento permaneceu entre 60-90%. Os tratamentos com o VP-16 mostraram aumento das percentagem de núcleos hipodiplóides em 7% e 10% para 18 h e 24 h respectivamente (Figura 10B).

Os resultados obtidos do tratamento da linhagem K562 pela CR-LAAO demonstraram aumento das percentagens de núcleos hipodiplóides em todos os tempos analisados. Após 18 h e 24 h, os tratamentos com 0,25 $\mu\text{g/mL}$ aumentaram as percentagens de núcleos hipodiploides em cerca de 20% ($p<0,05$). Nas demais concentrações (0,35-1,00 $\mu\text{g/mL}$), o aumento dos núcleos hipodiplóides ficou entre 25-30% (18 h) e 40-70% (24 h). O VP-16 induziu aumento dos núcleos hipodiplóides de aproximadamente 9% e 18%, após 18 h e 24 h, respectivamente (Figura 10C).

A análise da linhagem KCL22 mostrou que houve aumento em torno de 8% e 25% nas percentagens dos núcleos hipodiplóides nos tempos de 18 h e 24 h, respectivamente, com 0,35 $\mu\text{g/mL}$ de CR-LAAO ($p<0,05$). Nas demais concentrações (0,50-1,00 $\mu\text{g/mL}$), o

Resultados

aumento permaneceu entre 28-40% (18 h) e 45-70% (24 h). O tratamento com VP-16 não induziu apoptose nas células Bcr-Abl positivas em 18 e 24h (Figura 10D).

Figura 10. Quantificação da apoptose induzida pela CR-LAAO nas linhagens (A) HL-60, (B) (HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22. Os gráficos representam as percentagens de núcleos hipodiploides após 18 h e 24 h de tratamento. Resultados expressos pela média $\pm$ SD de três experimentos independentes. CTRL: células sem tratamento. SD: desvio padrão; VP-16: etoposídeo. Análise estatística: * $p < 0,05$ vs. CTRL (one-way ANOVA seguido pelo *post-test* de Dunnett's).

• **Resultados da quantificação de apoptose induzida por CR-LAAO nas células mononucleares**

A indução de apoptose também foi avaliada, pelo método de HFS, nas células mononucleares de indivíduos saudáveis e pacientes com LMC tratadas com CR-LAAO nas concentrações: 0,05; 0,25; 0,35 e 1,00 $\mu\text{g/mL}$, sendo que o VP-16 (1,50 $\mu\text{g/mL}$) foi usado como indutor de apoptose no controle positivo de morte celular. Os resultados foram expressos pela percentagem de núcleos hipodiplóides presentes nas células tratadas subtraídos.

Nas células MNC de indivíduos saudáveis, a CR-LAAO não induziu aumento nas percentagens de núcleos hipodiplóides (Figura 11). As células MNC de pacientes com LMC em FC sem tratamento mostraram aumento de núcleos hipodiplóides de 30% desde a menor concentração de CR-LAAO (0,05 $\mu\text{g/mL}$) e entre 40-50% nas demais concentrações (0,25-1,00 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 11). Não foi observado aumento das percentagens de núcleos hipodiplóides nas células MNC de pacientes com LMC em FC tratados e em FA (Figura 11). O VP-16 induziu um aumento de aproximadamente 6% células MNC de pacientes em FC sem tratamento (Figura 11).

Figura 11. Indução de apoptose pela CR-LAAO analisada pelo método de HFS nas células mononucleares. As células MNC foram obtidas de indivíduos saudáveis (grupo controle, $n=10$) e pacientes com LMC em fase crônica sem tratamento (FC/ST, $n=2$), fase crônica tratados (FC/T, $n=3$) e em fases avançadas (FA, $n=5$). CTRL: células sem tratamento. VP-16: etoposídeo.

- ***Resultados da quantificação de apoptose, por Anexina V-FITC, das linhagens celulares tratadas com CR-LAAO***

A indução de apoptose foi avaliada pelo método de Anexina V-FITC nas linhagens celulares K562 e KCL22 tratadas com CR-LAAO nas concentrações: 0,05; 0,15; 0,25; 0,35; 0,50; 0,75 e 1,00 $\mu\text{g/mL}$, sendo o VP-16 (1,50 $\mu\text{g/mL}$) foi usado como indutor de morte convencional, como controle de morte celular. Os resultados foram expressos pela quantificação das percentagens de anexina V^+/PI^- e anexina V^+/PI^+ .

A linhagem K562 após os tratamentos com a CR-LAAO por 12 h, 18 h e 24 h, não apresentou aumento da marcação de anexina V^+/PI^- (Figura 12A-D, $p < 0,05$) (Figura 12D). Com relação a marcação de anexina V^+/PI^+ , após 12 h e 18 h de tratamento da K562 com a CR-LAAO, observou-se aumento em torno de 20% na concentração de 0,15 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) e entre 30-80% nas demais concentrações 0,25-1,00 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 12A-B). Após 24 h, houve aumento de anexina V^+/PI^+ em 45% na concentração de 0,35 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) e entre 60-80% nas demais concentrações de 0,50-1,00 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 12C). O VP-16 induziu aumento da marcação de anexina V^+/PI^- de aproximadamente 25% após 12 h de tratamento ($p < 0,05$) e aumento da marcação de anexina V^+/PI^+ de aproximadamente 13% e 75% após 18 h e 24 h ($p < 0,05$), respectivamente (Figura 12A-C).

Figura 12. Quantificação da apoptose induzida pela CR-LAAO na linhagem K562 analisada pelas marcações de anexina V-FITC e iodeto de propídio. Os gráficos representam as percentagens de células marcadas com anexina V⁺/PI⁻ e anexina V⁺/PI⁺ após (A) 12 h, (B) 18 h e (C) 24 h de tratamento. Resultados expressos pela média $\pm$ desvio padrão para três experimentos independentes. CTRL: células sem tratamento; SD: desvio padrão; VP-16: etoposídeo. Análise estatística: * $p < 0,05$ vs. CTRL (one-way ANOVA seguido pelo *post-test* de Dunnett's).

Resultados

Na linhagem KCL22 foi observado que após os tratamentos com a CR-LAAO por 12 h, 18 h e 24 h, não houve aumento das percentagens de células marcadas com anexina V⁺/PI (Figura 13A-C). As análises das percentagens de células marcadas com anexina V⁺/PI⁺ mostraram que após 12 h e 18 h de tratamento da KCL22 com CR-LAAO nas concentrações de 0,25-1,00 µg/mL houve aumento de apoptose em torno de 30-80% ($p < 0,05$) (Figura 13A-C). O VP-16 induziu aumento nas percentagens de células nas percentagens de células anexina V⁺/PI⁺ de aproximadamente 64%, 20% e 80% após 12 h, 18 h e 24 h respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 13A-D).

Figura 13. Quantificação de apoptose induzida pela CR-LAAO na linhagem KCL22 analisada pelas marcações com anexina V-FITC e iodeto de propídio. Os gráficos representam as percentagens de anexina V⁺/PI⁻ e anexina V⁺/PI⁺ após (A) 12 h, (B) 18 h e (C) 24 h de tratamento. Resultados expressos pela média ± desvio padrão para três experimentos independentes. CTRL: células sem tratamento; SD: desvio padrão; VP-16: etoposídeo. Análise estatística: *p < 0,05 vs. CTRL (one-way ANOVA seguido pelo *post-test* de Dunnett's).

- ***Resultados da quantificação da apoptose por Anexina V-FITC nas células mononucleares***

A indução de apoptose também foi avaliada pelo método de Anexina V-FITC nas células mononucleares de indivíduos saudáveis e pacientes com LMC tratadas com CR-LAAO nas concentrações: 0,05; 0,25; 0,35 e 1,00 $\mu\text{g/mL}$, sendo o VP-16 (1,50 $\mu\text{g/mL}$) usado como potencial indutor de apoptose, controle positivo de morte celular.

Nas células MNC de indivíduos saudáveis a CR-LAAO induziu aumento nas percentagens de células marcadas com anexina V^+/PI^- de aproximadamente 12% em todas as concentrações (0,05-1,00 $\mu\text{g/mL}$) e aumento de 10-30% nas percentagens de células marcadas com anexina V^+/PI^+ nas concentrações de 0,25-1,00 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 14A). Os resultados obtidos para as células MNC de pacientes em FC sem tratamento mostraram aumento nas percentagens de células marcadas com anexina V^+/PI^- que variou de 12-55% nas concentrações de 0,05-1,00 $\mu\text{g/mL}$ e aumento de 23% nas percentagens de células marcadas com anexina V^+/PI^+ nas concentrações de 0,25-1,00 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 14B). Nas células MNC de pacientes em FC tratados, a CR-LAAO aumentou as percentagens de células marcadas com anexina V^+/PI^- em torno de 7% nas concentrações de 0,25-1,00 $\mu\text{g/mL}$. Nas percentagens de células marcadas com anexina V^+/PI^+ houve aumento de 10% na concentração de 0,05 $\mu\text{g/mL}$ e 32% nas demais concentrações (0,25-1,00 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 14C). Nas células MNC dos pacientes em FA, o aumento nas percentagens de células marcadas com anexina V^+/PI^- foi em torno de 13-16% nas concentrações de 0,25-1,00 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que nas percentagens de células marcadas com anexina V^+/PI^+ , o aumento foi entre 10-20% nas concentrações de 0,05-1,00 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 14D). O VP-16 não induziu aumento nas percentagens de anexina V^+/PI^- em nenhum dos grupos analisados, porém o aumento nas percentagens de anexina V^+/PI^+ foi de aproximadamente 44% nos indivíduos saudáveis e em células MNC de pacientes em FC sem tratamento; 20% e 38% nos pacientes em FC tratados e FA respectivamente (Figura 14A-D).

Figura 14. Quantificação da apoptose induzida pela CR-LAAO nas células mononucleares analisada pelas marcações com anexina V-FITC e iodeto de propídio. Os gráficos representam as percentagens de células mononucleares marcadas com anexina V⁺/PI⁻ e anexina V⁺/PI⁺ após 12 h. As células MNC foram obtidas de: (A) indivíduos saudáveis (grupo controle, $n=5$); (B) pacientes com LMC em fase crônica sem tratamento com inibidores de tirosina-quinase (FC/ST, $n=2$); (C) pacientes em fase crônica tratados com inibidores de tirosina-quinase (FC/T, $n=3$) e (D) pacientes em fases avançadas (FA, $n=5$). CTRL: células sem tratamento; VP-16: etoposídeo.

4.5. Análise da ativação das caspases 3, 8, 9 e PARP por *western blotting*

A detecção da ativação das caspases 3, 8 e 9 e do PARP clivado foi realizada por *western blotting* com a finalidade de (1) checar a indução da apoptose pela CR-LAAO nas linhagens HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22 e (2) avaliar se a apoptose foi ativada pela via intrínseca ou extrínseca. Para este ensaio, as células foram tratadas com CR-LAAO nas concentrações: 0,05; 0,15; 0,25; 0,35; 0,5; 0,75 e 1,00 $\mu\text{g/mL}$ e com VP-16 (1,50 $\mu\text{g/mL}$). A ativação das caspases foi determinada pela diminuição da intensidade das bandas das pro-caspases e aumento das bandas da caspase 3 e PARP clivados.

- **Resultado do western blotting para a linhagem HL-60**

As análises na linhagem HL-60 tratadas com CR-LAAO mostraram diminuição da pro-caspase 3 nas concentrações de 0,35-1,00 $\mu\text{g/mL}$; pro-caspase 8 nas concentrações de 0,25-100 $\mu\text{g/mL}$ e pro-caspase-9 nas concentrações de 0,35-1,00 $\mu\text{g/mL}$. Houve o aumento de caspase 3 e PARP clivados nas concentrações de 0,15-0,25 $\mu\text{g/mL}$ e 0,25-0,35 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O VP-16 também induziu diminuição das caspases 3, 8 e 9 e aumento de caspase 3 e PARP clivado (Figura 15).

Figura 15. Detecção da expressão das caspases 3, 8, 9 e PARP na linhagem celular HL-60 tratada com CR-LAAO e VP-16. CTRL: células sem tratamento; VP-16: etoposídeo.

- **Resultado do western blotting para a linhagem HL-60.Bcr-Abl**

Na linhagem HL-60.Bcr-Abl tratada com CR-LAAO houve diminuição de pro-caspase 3 nas concentrações de 0,75 a 1,00 $\mu\text{g/mL}$, das pro-caspases 8 e -9 nas concentrações de 0,35 a 1,00 $\mu\text{g/mL}$. Houve o aumento de caspase 3 e PARP clivados nas concentrações de 0,25 e 0,35 $\mu\text{g/mL}$. Nas células tratadas com o VP-16 foram detectadas a caspase 3 e PARP clivados (Figura 16).

Figura 16. Detecção da expressão das caspases 3, 8, 9 e PARP na linhagem celular HL-60.Bcr-Abl tratada com CR-LAAO e VP-16. CTRL: células sem tratamento; VP-16: etoposídeo.

• **Resultado do western blotting para a linhagem K562**

O perfil proteico na linhagem K562 tratada com CR-LAAO mostrou diminuição de pro-caspase 3 nas concentrações de 0,35 a 1,00 µg/mL; pro-caspase 8 nas concentrações de 0,50 a 1,00 µg/mL e pro-caspase-9 nas concentrações de 0,15-1,00 µg/mL. Houve também aumento de caspase 3 e PARP clivados nas concentrações de 0,25 a 1,00 µg/mL. O tratamento com VP-16 não induziu a diminuição das pro-caspases 3, 8 e 9 assim como não aumentou os níveis de caspase 3 clivada, porém induziu o aumento de PARP clivado (Figura 17).

Figura 17. Detecção da expressão das caspases 3, 8, 9 e PARP na linhagem celular K562 tratada com CR-LAAO e VP-16. CTRL: células sem tratamento; VP-16: etoposídeo.

- **Resultado do western blotting para a linhagem KCL22**

Na linhagem KCL22 houve diminuição da pro-caspase 3 nas concentrações de 0,50 a 1,00 µg/mL; pro-caspase 8 nas concentrações de 0,35-1,00 µg/mL e pro-caspase-9 nas concentrações de 0,35-1,00 µg/mL. Não foi detectada caspase 3 clivada. O aumento de PARP clivado foi mais consistentemente observado na concentração de 0,25 µg/mL. Após tratamento com VP-16, não houve diminuição das pro-caspases 3, 8 e 9; apenas o aumento de PARP clivado foi observado (Figura 18).

Figura 18. Detecção da expressão das caspases 3, 8, 9 e PARP na linhagem celular KCL22 tratada com CR-LAAO e VP-16. CTRL: células sem tratamento; VP-16: etoposídeo.

Os resultados obtidos da expressão das caspases 3, 8, 9 e PARP a partir dos tratamentos indicam ativação da apoptose em todas as linhagens testadas pelas vias intrínseca e extrínseca. Os resultados obtidos com o VP-16 reforçam que as linhagens Bcr-Abl positivas são mais resistentes à morte celular quando comparadas com a linhagem HL-60 (Bcr-Abl negativa).

4.6. Detecção do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Sabendo-se que as mitocôndrias desempenham papel essencial na cascata apoptótica, este ensaio avaliou a perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) induzido pela CR-LAAO nas linhagens neoplásicas. Neste ensaio, foram utilizadas as linhagens celulares HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22 tratadas com CR-LAAO nas concentrações: 0,05; 0,25; 0,35 e 1,00 µg/mL e com VP-16 (1,50 µg/mL).

Houve aumento de despolarização da membrana mitocondrial em todas as linhagens analisadas, indicando perda do $\Delta\Psi_m$. Esta perda foi observada a partir da concentração de 0,25 µg/mL ($p < 0,05$) de maneira dose dependente nas linhagens HL-60, HL-60.Bcr-Abl e KCL22. Na K562 tratada com a CR-LAAO houve a perda do $\Delta\Psi_m$, porém não de forma dose dependente.

Resultados

Na linhagem HL-60 o aumento de despolarização da membrana mitocondrial foi de aproximadamente 25%, 55% e 90% nos tratamentos com as concentrações de 0,25; 0,35 e 1,00 $\mu\text{g/mL}$ de CR-LAAO, respectivamente (Figura 19A). Nas mesmas concentrações citadas acima, as percentagens de despolarização aumentaram em aproximadamente 35%, 55% e 80% na linhagem HL-60.Bcr-Abl (Figura 19B); cerca de 25% na linhagem K562 (Figura 19C) e em aproximadamente 18%, 25% e 82% na linhagem KCL22 (Figura 19D). O tratamento com o VP-16 induziu maior perda de $\Delta\Psi_m$ na linhagem HL-60 do que nas linhagens Bcr-Abl positivas (HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22).

Figura 19. Potencial mitocondrial das linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 (C) e (D) KCL22. Os gráficos representam as percentagens de despolarização celular após 6 h de tratamento com CR-LAAO. Resultados expressos pela média $\pm$ SD de três experimentos independentes analisados em triplicata. CTRL: células sem tratamento; SD: desvio padrão; VP-16: etoposídeo. Análise estatística: * $p < 0,05$ vs. CTRL (one-way ANOVA seguido pelo *post-test* de Dunnett's).

4.7. Avaliação de danos no DNA celular induzidos pela CR-LAAO

A avaliação dos danos no DNA nas linhagens HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22 causados pela CR-LAAO nas concentrações: 0,05; 0,15; 0,25; 0,35; 0,50; 0,75 e 1,00 $\mu\text{g/mL}$, foi realizado pelo ensaio cometa. A CR-LAAO, nas concentrações 0,75 e 1,00 $\mu\text{g/mL}$, foram altamente genotóxicas em todas as linhagens, tornando-se inviáveis para as análises. Na HL-60, a concentração de 0,50 $\mu\text{g/mL}$, também foi inviável para as

Resultados

análises. Para todas as linhagens o controle positivo, o metilmetanosulfonato (MMS), foi eficiente, demonstrando a eficácia do método.

Na linhagem HL-60, as concentrações 0,15, 0,25 e 0,35 µg/mL induziram genotoxicidade ($p < 0,05$), quando comparadas com as células não tratadas (Figura 20A).

Nas linhagens HL-60.Bcr-Abl (Figura 20B) e K562 (Figura 20C) foi observado um efeito genotóxico dose-resposta. O aumento do dano no DNA foi diretamente proporcional à concentração de CR-LAAO utilizada. As concentrações 0,25, 0,35 e 0,50 µg/mL foram genotóxicas ($p < 0,05$) tendo como valores médios das percentagens de dano no DNA 19 %, 30 % e 50 % para HL-60.Bcr-Abl e 20 %, 30 % e 40 % para a K562 respectivamente.

Na linhagem celular KCL22 todas as concentrações de CR-LAAO testadas (0,05-0,50 µg/mL) induziram genotoxicidade ($p < 0,05$). No entanto, nesta linhagem o efeito dose-resposta não foi observado. Nesse caso, as concentrações 0,05-0,25 µg/mL apresentaram cerca de 9,0 % de dano no DNA e as concentrações 0,35-0,50 µg/mL 14 % e 20 % de dano ao DNA, respectivamente (Figura 20D).

Comparando os resultados das diferentes linhagens celulares, observa-se que os danos ao DNA foram maiores na HL-60.Bcr-Abl, do que na K562, do que na, HL-60 e do que a KCL22, ou seja a CR-LAAO induziu maior dano na linhagem HL-60.Bcr-Abl e menor dano na KCL22. A figura 21 exemplifica como a análise de dano ao DNA foi realizada nesse estudo, usando como protótipo o tratamento da linhagem celular K562 tratada com a CR-LAAO.

Figura 20. Danos no DNA celular induzidos pela CR-LAAO nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22. Os gráficos representam as percentagens de danos no DNA após 4 h de tratamento. Resultados expressos pela média $\pm$ SD de três experimentos independentes. CTRL: células sem tratamento; SD: desvio padrão; MMS: metilmetanosulfonato. Análise estatística: * $p < 0,05$ vs. CTRL (one-way ANOVA seguido pelo *post-test* de Dunnett's).

Figura 21. Imagem representativa de nucleóides da linhagem K562 após tratamentos com a CR-LAAO mostrando diferentes níveis de danos no DNA. Os nucleóides foram identificados em microscópio de fluorescência (AxioStar Plus, Carl Zeiss Axio Cam MRc - AxioVision 3.1), utilizando-se a amplificação de 40 $\times$. CTRL: células sem tratamento; MMS: metilmetanosulfonato (controle positivo).

4.8. Detecção da apoptose na linhagem HL-60.Bcr-Abl após tratamento da CR-LAAO combinada com inibidores de tirosina-quinase

Este ensaio foi realizado para avaliar o efeito na apoptose (núcleos hipodiplóides) a partir da combinação da CR-LAAO nas concentrações: 0,05; 0,15; 0,25; 0,35; 0,50; 0,75 e 1,00 $\mu\text{g/mL}$ com os TKI: MI (10 μM) ou DAS (20 nM) ou NIL (10nM).

Os resultados obtidos a partir da comparação das percentagens de apoptose entre os tratamentos realizados apenas com a CR-LAAO e a CR-LAAO combinada com o MI,

Resultados

mostraram que após os tratamentos com as concentrações 0,05, 0,15-0,25 µg/mL de CR-LAAO, houve aumento nas percentagens de apoptose de aproximadamente 9% e 20% respectivamente ($p<0.05$) (Figura 22A).

A partir da mesma comparação entre os tratamentos realizados apenas com a CR-LAAO e a CR-LAAO combinada com o DAS, observou-se que com 0,25 µg/mL de CR-LAAO houve aumento de aproximadamente 10% na percentagem de apoptose ($p<0.05$) (Figura 22B).

Os resultados obtidos comparando-se os tratamentos com a CR-LAAO e CR-LAAO combinada com o NIL, mostraram que com os tratamentos nas concentrações de 0,25-0,35 µg/mL houve aumento de aproximadamente 15% nas percentagens de apoptose ($p<0.05$) (Figura 22C).

Comparando-se o efeito na apoptose de cada TKI em relação as células sem tratamento, observou-se aumento de aproximadamente 8% e 5% das percentagens de apoptose nas células tratadas apenas com o MI ou DAS ($p<0.05$) (Figura 22D).

Figura 22. Quantificação da apoptose na linhagem HL-60.Bcr-Abl, induzida pela CR-LAAO combinada com os TKI (A) MI, (B) DAS, (C) NIL e (D) Tratamento apenas com os TKI. Os gráficos representam as percentagens de núcleos hipodiploides após 24 h de tratamento. Resultados expressos pela média $\pm$ SD de três experimentos independentes. CTRL: células sem tratamento; SD: desvio padrão; TKI: inibidores de tirosina-quinase; MI: mesilato de imatinibe; DAS: dasatinibe; NIL: nilotinibe. Análise estatística: (A-C): * $p < 0,05$, vs. células tratadas apenas com CR-LAAO (Student's *t*-test); (D): * $p < 0,05$ vs. CTRL (one-way ANOVA seguido pelo *post-test* de Dunnett's).

4.9. Detecção da expressão das proteínas fosfotirosina e Bcr-Abl após tratamentos com a CR-LAAO combinada aos inibidores de tirosina-quinase

Para melhor elucidar os efeitos da combinação da CR-LAAO com os TKI, os níveis das proteínas fosfotirosina (Py) e Bcr-Abl foram avaliadas na linhagem HL-60.Bcr-Abl. As análises por *western blotting* indicaram que a combinação de CR-LAAO com MI (Figura 23A) ou DAS (Figura 23B) ou NIL (Figura 23C) diminuiu os níveis de fosfotirosina e Bcr-Abl nas concentrações de 0,35-1,00 µg/mL.

Figura 23. Detecção da expressão de fosfotirosina e Bcr-Abl na linhagem HL-60. Bcr-Abl após 24 h de tratamento com a CR-LAAO combinada com os TKI: (A) MI, (B) DAS e (C) NIL. CTRL: células sem tratamento; TKI: inibidores de tirosina-quinase; MI: mesilato de imatinibe; DAS: dasatinibe; NIL: nilotinibe.

4.10. Análise da expressão de microRNAs nas linhagens Bcr-Abl positivas tratadas com CR-LAAO

Para investigar o efeito da CR-LAAO na expressão de miRNAs que regulam a expressão de genes que controlam a apoptose, foram quantificados os miRNAs: miR-15a, miR-16, miR-145, miR-26a, hsa-let-7d, miR-142-3p, miR-29c, miR-146a, miR-21, miR-130a e miR-130b; e as proteínas codificadas por seus respectivos alvos: Bcl-2, Bax, Bid, Bim, Bak, A1, Ciap-2, c-Flip e Mcl-1. Os ensaios foram realizados nas linhagens HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22 com as concentrações 0,05 a 050 µg/mL de CR-LAAO por 24 horas. Foram usados como miRNAs de referência (miRNAs endógenos) o RNU 24 e RNU 44, cujos valores de Ct para cada amostra estão mostrados na tabela 6. As expressões dos miRNAs foram obtidas pelo cálculo dos valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (*fold change*) a partir da média de três experimentos independentes. Os valores de *fold change* de cada miRNA, para avaliar se estavam mais ou menos expressos após os tratamentos com a CR-LAAO, foram obtidos em relação as células não tratadas.

Tabela 6. Valores de Ct dos miRNAs de referência RNU 24 e RNU 44 para as linhagens celulares com e sem tratamento com a CR-LAAO (µg/mL)

Amostras	Ct (RNU 24)	Ct (RNU 44)
HL-60 (CTRL)	24.39	24.42
HL-60 (0.05 µg/mL)	23.38	23.04
HL-60 (0.25 µg/mL)	23.77	23.24
HL-60.Bcr-Abl (CTRL)	24.43	24.08
HL-60.Bcr-Abl (0.05 µg/mL)	25.64	25.43
HL-60.Bcr-Abl (0.35 µg/mL)	25.54	25.07
K562 (CTRL)	21.78	20.50
K562 (0.15 µg/mL)	20.97	19.70
K562 (0.50 µg/mL)	25.77	24.61
KCL22 (CTRL)	24.94	24.26
KCL22 (0.15 µg/mL)	24.18	23.41
KCL22 (0.50 µg/mL)	24.69	23.90

CTRL: células sem tratamento; Ct: *cycle threshold*.

Resultados da expressão dos microRNAs e das proteínas pró- e anti-apoptóticas

- *miR-15a e miR-16 e possível gene alvo: Bcl-2*

Após os tratamentos com a CR-LAAO, a expressão do miR-15a aumentou 0,3 e 1,3 vezes nas concentrações 0,05 e 0,25 µg/mL, respectivamente em HL-60. Em HL-60.Bcr-Abl, estava o dobro aumentado em 0,35 µg/mL, enquanto em KCL22, a expressão aumentou 0,6 vezes nas concentrações de 0,15 e 0,50 µg/mL. Entretanto, observou-se que em K562 a expressão diminuiu na concentração de 0,50 µg/mL (*fold change* = 0,3) (Figura 24A–D).

Figura 24. Expressão de miR-15a nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

Resultados

Já a expressão do miR-16 aumentou 0,7 e 0,4 vezes em HL-60 e KCL22 nas concentrações de 0,25 e 0,50 µg/mL, respectivamente. Houve diminuição da expressão em K562 na concentração de 0,50 µg/mL (*fold change* = 0,5) (Figura 25A–D).

Figura 25. Expressão de miR-16 nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

- **miR-145 e possíveis genes alvos: Bax e Bcl-2**

O miR-145 estava 0,3 e 1,5 vezes mais expresso em HL-60 tratadas com CR-LAAO nas concentrações de 0,05 e 0,25 µg/mL respectivamente; em HL-60.Bcr-Abl e KCL22 estava 0,3 vezes mais expresso nas concentrações de 0,35 e 0,15 µg/mL respectivamente, e menos expresso em K562 e KCL22, na concentração de 0,50 µg/mL (*fold change* = 0,2 e 0,6, respectivamente) (Figura 26A–D).

Figura 26. Expressão de miR-145 nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

A análise da proteína anti-apoptótica Bcl-2 mostrou diminuição na linhagem HL-60.Bcr-Abl na concentração de 0,35 μg/mL de CR-LAAO. Nas linhagens HL-60, K562 e KCL22 não houve diferença de expressão desta proteína após os tratamentos com CR-LAAO (Figura 27A-D).

Figura 27. Detecção da proteína Bcl-2 nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 tratadas por 24 h com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

Os resultados mostraram aumento da proteína pró-apoptótica Bax em K562 (0,15 µg/mL) e KCL22 nas duas concentrações testadas (0,15-0,50 µg/mL). Nas linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl não houve diferença na expressão de Bax após tratamento com a CR-LAAO (Figura 28A-D).

Figura 28. Detecção da proteína Bax nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 tratadas por 24 h com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

- ***miR-26a com possíveis genes alvo: Bid e Bim***

As expressão do miR-26a estava 0,6 e 1,4 vezes aumentada em HL-60 nas concentrações de 0,05 e 0,25 µg/mL, respectivamente. Em HL-60.Bcr-Abl e K562 a expressão aumentou 0,6 e 0,3 vezes nas concentrações de 0,35 e 0,15 µg/mL, respectivamente. Em KCL22, a expressão aumentou 0,6 e 0,4 vezes nas concentrações de 0,15 e 0,50 µg/mL, respectivamente. Na K562 o miR-26a estava menos expresso após o tratamento com 0,50 µg/mL de CR-LAAO (*fold change* = 0,6) (Figura 29A-D).

Figura 29. Expressão de miR-26a nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

A proteína pró-apoptótica Bid estava menos expressa na HL-60.Bcr-Abl tratada com CR-LAAO nas concentrações de 0,05 e 0,35 μg/mL e na K562 nas concentrações 0,15 e 0,50 μg/mL (Figura 30A-D).

Figura 30. Detecção da proteína Bid nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 tratadas por 24 h com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

A análise da proteína pró-apoptótica Bim mostrou aumento na linhagem KCL22 tratada com LAAO nas concentrações de 0,15 e 0,50 µg/mL. Nas linhagens HL-60, HL-60.Bcr-Abl e K562 não houve diferença de expressão desta proteína após os tratamentos com a CR-LAAO (Figura 31A-D).

Figura 31. Detecção da proteína Bim nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 tratadas por 24 h com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

- ***hsa-let-7d e possíveis genes alvos: Bak e A1***

Após os tratamentos com a CR-LAAO, o miR hsa-let-7d estava 0,7 vezes mais expresso em HL-60 tratada com LAAO na concentração de 0,25 µg/mL. Em HL-60.Bcr-Abl, a expressão aumentou 0,3 e 0,4 vezes após os tratamentos com CR-LAAO nas concentrações 0,05 e 0,35 µg/mL da toxina, respectivamente. A expressão deste miR diminuiu em K562 tratada com CR-LAAO na concentração de 0,50 µg/mL (*fold change* = 0,6) (Figura 32A-D).

Figura 32. Expressão de hsa-let-7d nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

Os resultados mostraram aumento da proteína pró-apotótica Bak em HL-60 tratada com CR-LAAO nas concentrações de 0,05 e 0,25 μg/mL e KCL22, na concentração de 0,50 μg/mL. Nas linhagens HL-60.Bcr-Abl e K562 não houve diferença nos níveis desta proteína após o tratamento com CR-LAAO (Figura 33A-D).

Não se detectou diferença nos níveis da proteína anti-apotótica A1 em nenhuma das linhagens avaliadas após os tratamentos com a CR-LAAO (Figura 34A-D).

Figura 33. Detecção da proteína Bak nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 tratadas por 24 h com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

Figura 34. Detecção da proteína A1 nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 tratadas por 24 h com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

- ***miR-142-3p e possível gene alvo: c-Flip***

O miR-142-3p estava 0,5 vezes mais expresso em HL-60 e HL-60.Bcr-Abl tratadas com CR-LAAO na concentração de 0,05 µg/mL e 0,3 vezes mais expresso em KCL22, após o tratamento com 0,50 µg/mL de CR-LAAO. A expressão do miR-142-3p diminuiu em K562 após tratamento com 0,50 µg/mL de CR-LAAO (*fold change* = 0,3) (Figura 35A-D).

Figura 35. Expressão de miR-142-3p nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

Observou-se que não houve diferença nos níveis da proteína anti-apoptótica c-Flip em nenhuma das linhagens avaliadas (Figura 36A-D).

Figura 36. Detecção da da proteína c-Flip nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 tratadas por 24 h com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

- ***miR-29c e miR-146a e possível gene alvo: Mcl-1***

O miR-29c estava 0,5 vezes mais expresso em HL-60 e HL-60.Bcr-Abl nas concentrações de 0,25 e 0,35, respectivamente. Em KCL22, a expressão aumentou 0,3 e 0,6 vezes nas concentrações de 0,15 e 0,50 µg/mL, respectivamente. Em K562, a expressão diminuiu na concentração de 0,50 µg/mL (*fold change* = 0,7) (Figura 37A-D).

Figura 37. Expressão de miR-29c nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

O miR-146a estava 0,75 e 6.5 vezes mais expresso em HL-60 tratada com CR-LAAO nas concentrações de 0,05 e 0,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Em KCL22 tratada com CR-LAAO a expressão estava 0,7 vezes maior na concentração de 0,50 $\mu\text{g/mL}$. A expressão do miR-146a diminuiu em HL-60.Bcr-Abl e K562 tratadas com CR-LAAO nas concentrações de 0,05 e 0,50 $\mu\text{g/mL}$ de CR-LAAO, respectivamente (*fold change* = 0,5) (Figura 38A-D).

Figura 38. Expressão de miR-146a nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

Não houve diferença nos níveis de Mcl-1 nas linhagens Bcr-Abl positivas (Figura 39A-D).

Figura 39. Detecção da expressão da proteína Mcl-1 nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 tratadas por 24 h com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

- ***miR-21/ miR-130a / miR-130b e possível gene alvo: Ciap-2***

A expressão do miR-21 aumentou 0,4 e 1,8 vezes em HL-60 tratada com CR-LAAO nas duas concentrações testadas 0,05 e 0,25 µg/mL, respectivamente. Em HL-60.Bcr-Abl e KCL22 a expressão deste miR aumentou 0,4 e 0,3 vezes após os tratamentos com 0,35 e 0,50 µg/mL, respectivamente, de CR-LAAO. Em K562 a expressão diminuiu na concentração de 0,50 µg/mL (*fold change* = 0,7) (Figura 40A-D).

Figura 40. Expressão de miR-21 nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

A expressão do miR-130a estava o dobro e 1,5 vezes aumentada em HL-60 tratada com CR-LAAO nas duas concentrações testadas (0,05 e 0,25 μg/mL, respectivamente). Na HL-60.Bcr-Abl a expressão aumentou cerca de 1,6 vezes na concentração de 0,35 μg/mL. Nas linhagens K562 e KCL22 tratadas com CR-LAAO a expressão de miR-130a aumentou cerca de 0,3 na concentração de 0,50 μg/mL. Em K562 tratada com CR-LAAO a expressão diminuiu na concentração de 0,50 μg/mL (*fold change* = 0,7) (Figura 41A-D)

Figura 41. Expressão de miR-130a nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

O miR-130b também estava 0,3 e 0,5 vezes mais expresso na HL-60 tratada com CR-LAAO nas concentrações 0,05 e 0,25 μg/mL, respectivamente e 0,3 vezes mais expresso na HL-60.Bcr-Abl e KCL22 nas concentrações de 0,35 e 0,50 μg/mL, respectivamente. No entanto, em K562, a expressão diminuiu (*fold change* = 0,5), após o tratamento com 0,50 μg/mL de CR-LAAO (Figura 42A-D).

Figura 42. Expressão de miR-130b nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 após 24 h de tratamento com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

Não houve diferença nos níveis da proteína anti-apoptótica Ciap-2 nas linhagens avaliadas após os tratamentos com a CR-LAAO (Figura 43A-D).

Figura 43. Detecção da proteína Ciap-2 nas linhagens (A) HL-60, (B) HL-60.Bcr-Abl, (C) K562 e (D) KCL22 tratadas por 24 h com CR-LAAO. CTRL: células sem tratamento.

As tabelas 7, 8, 9 e 10 compilam os resultados da modulação dos miRNAs e dos possíveis alvos (proteínas pró- e anti-apoptóticas) nas linhagens HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22, após os tratamentos com a CR-LAAO.

Tabela 7. Modulação dos microRNAs e respectivos alvos após tratamento com a CR-LAAO na linhagem HL-60

HL-60							
Efeito da CR-LAAO							
0,05 µg/mL				0,25 µg/mL			
MicroRNA		Alvo		MicroRNA		Alvo	
miR-15a	↑	Bcl-2	NM	miR-15a	↑	Bcl-2	NM
miR-16	NM	Bcl-2	NM	miR-16	↑	Bcl-2	NM
miR-145	↑	Bax	NM	miR-145	↑	Bax	NM
		Bcl-2	NM			Bcl-2	NM
miR-26a	↑	Bid	NM	miR-26a	↑	Bid	NM
		Bim	NM			Bim	NM
hsa-let-7d	NM	Bak	↑	hsa-let-7d	↑	Bak	↑
		A1	NM			A1	NM
miR-142-3p	↑	c-Flip	NM	miR-142-3p	NM	c-Flip	NM
miR-29c	NM	Mcl-1	↑	miR-29c	↑	Mcl-1	↑
miR-146a	↑	Mcl-1	↑	miR-146a	↑	Mcl-1	↑
miR-21	↑	Ciap-2	NM	miR-21	↑	Ciap-2	NM
miR-130a	↑	Ciap-2	NM	miR-130a	↑	Ciap-2	NM
miR130b	↑	Ciap-2	NM	miR130b	↑	Ciap-2	NM

↑: aumento da expressão; ↓: diminuição da expressão; NM: não modulou a expressão

Tabela 8. Modulação dos microRNAs e respectivos alvos após tratamento com a CR-LAAO na linhagem HL-60.Bcr-Abl

HL-60.Bcr-Abl							
Efeito da CR-LAAO							
0,05 µg/mL				0,35 µg/mL			
MicroRNA		Alvo		MicroRNA		Alvo	
miR-15a	↑	Bcl-2	NM	miR-15a	↑	Bcl-2	↓
miR-16	NM	Bcl-2	NM	miR-16	NM	Bcl-2	NM
miR-145	NM	Bax	NM	miR-145	↑	Bax	NM
		Bcl-2	NM			Bcl-2	↓
miR-26a	NM	Bid	NM	miR-26a	↑	Bid	↓
		Bim	NM			Bim	NM
hsa-let-7d	↑	Bak	NM	hsa-let-7d	↑	Bak	NM
		A1	NM			A1	NM
miR-142-3p	↑	c-Flip	NM	miR-142-3p	NM	c-Flip	NM
miR-29c	NM	Mcl-1	NM	miR-29c	↑	Mcl-1	NM
miR-146a	↓	Mcl-1	NM	miR-146a	NM	Mcl-1	NM
miR-21	NM	Ciap-2	NM	miR-21	↑	Ciap-2	NM
miR-130a	NM	Ciap-2	NM	miR-130a	↑	Ciap-2	NM
miR130b	NM	Ciap-2	NM	miR130b	↑	Ciap-2	NM

↑: aumento da expressão; ↓: diminuição da expressão; NM: não modulou a expressão.

Tabela 9. Modulação dos microRNAs e respectivos alvos após tratamento com a CR-LAAO na linhagem K562

K562							
Efeito da CR-LAAO							
0,15 µg/mL				0,50 µg/mL			
MicroRNA		Alvo		MicroRNA		Alvo	
miR-15a	NM	Bcl-2	NM	miR-15a	↓	Bcl-2	NM
miR-16	NM	Bcl-2	NM	miR-16	↓	Bcl-2	NM
miR-145	NM	Bax	↑	miR-145	↓	Bax	NM
		Bcl-2	NM			Bcl-2	NM
miR-26a	↑	Bid	↓	miR-26a	↓	Bid	↓
		Bim	NM			Bim	NM
hsa-let-7d	NM	Bak	NM	hsa-let-7d	↓	Bak	NM
		A1	NM			A1	NM
miR-142-3p	NM	c-Flip	NM	miR-142-3p	↓	c-Flip	NM
miR-29c	NM	Mcl-1	NM	miR-29c	NM	Mcl-1	NM
miR-146a	NM	Mcl-1	NM	miR-146a	↓	Mcl-1	NM
miR-21	NM	Ciap-2	NM	miR-21	↓	Ciap-2	NM
miR-130a	↑	Ciap-2	NM	miR-130a	↓	Ciap-2	NM
miR130b	NM	Ciap-2	NM	miR130b	↓	Ciap-2	NM

↑: aumento da expressão; ↓: diminuição da expressão; NM: não modulou a expressão.

Tabela 10. Modulação dos microRNAs e respectivos alvos após tratamento com a CR-LAAO na linhagem KCL22

KCL22							
Efeito da CR-LAAO							
0,15 µg/mL				0,50 µg/mL			
MicroRNA		Alvo		MicroRNA		Alvo	
miR-15a	↑	Bcl-2	NM	miR-15a	↑	Bcl-2	NM
miR-16	NM	Bcl-2	NM	miR-16	↑	Bcl-2	NM
miR-145	↑	Bax	↑	miR-145	↓	Bax	↑
		Bcl-2	NM			Bcl-2	NM
miR-26a	↑	Bid	NM	miR-26a	↑	Bid	NM
		Bim	↑			Bim	↑
hsa-let-7d	NM	Bak	NM	hsa-let-7d	NM	Bak	↑
		A1	NM			A1	NM
miR-142-3p	NM	c-Flip	NM	miR-142-3p	↑	c-Flip	NM
miR-29c	↑	Mcl-1	NM	miR-29c	↑	Mcl-1	NM
miR-146a	NM	Mcl-1	NM	miR-146a	↑	Mcl-1	NM
miR-21	NM	Ciap-2	NM	miR-21	↑	Ciap-2	NM
miR-130a	NM	Ciap-2	NM	miR-130a	↑	Ciap-2	NM
miR130b	NM	Ciap-2	NM	miR130b	↑	Ciap-2	NM

↑: aumento da expressão; ↓: diminuição da expressão; NM: não modulou a expressão.

5. DISCUSSÃO

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa, caracterizada pela expansão de células mielóides maduras no sangue periférico e medula óssea. (VAIDYA *et al.*, 2011). Sem intervenção terapêutica bem sucedida, os pacientes progridem para fases mais avançadas da doença, nas quais a doença assume fenótipo mais agressivo, quase sempre fatal (CHEREDA; MELO, 2015). Apesar dos avanços no tratamento da LMC ainda faz-se necessária à busca por novas terapias curativas e mais eficientes capazes de contornar o problema da resistência dos pacientes aos medicamentos atuais e refratariedade dos pacientes em fases avançadas da doença (WEISBERG *et al.*, 2007; BALABANOV *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, compostos naturais como as SV-LAAOs (*snake venom L-amino acid oxidases*) têm se destacado como potentes agentes antitumorais (IZIDORO *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2010; ALVES-PAIVA *et al.*, 2011; GUO *et al.* 2012; COSTA *et al.*, 2014). Assim sendo, o presente estudo investigou o potencial antitumoral da L-aminoácido oxidase isolada da peçonha da serpente *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO), em células Bcr-Abl positivas. As linhagens Bcr-Abl positivas, empregadas nesse estudo, se caracterizam por apresentar resistência a apoptose induzida pelos agentes quimioterápicos convencionais (BRUMATTI *et al.*, 2003; BUENO-DA-SILVA *et al.*, 2003).

O potencial citotóxico da CR-LAAO nas linhagens celulares tumorais HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22 foi determinado e os resultados indicaram atividade contra todas as linhagens celulares estudadas. Considerando os valores de IC_{50} , a CR-LAAO foi mais citotóxica para a HL-60 ($IC_{50} = 0,26 \mu\text{g/mL}$), seguida pela HL-60.Bcr-Abl ($IC_{50} = 0,70 \mu\text{g/mL}$), K562 ($IC_{50} = 1,81 \mu\text{g/mL}$) e KCL22 ($IC_{50} = 9,83 \mu\text{g/mL}$). Dentre as linhagens Bcr-Abl positivas, a KCL22 foi a menos sensível ao efeito citotóxico da CR-LAAO, indicando que o contexto celular interfere nos efeitos da toxina, já que a linhagem KCL22 foi obtida de paciente que apresentava o transcrito de Bcr-Abl do tipo b2a2, enquanto a K562 foi obtida de paciente com o transcrito b3a2.

Em pacientes com LMC, dependendo da localização do ponto de quebra na região M-bcr (*major breakpoint cluster region*) no cromossomo 22, o gene híbrido *BCR-ABL* origina os transcritos b2a2 e b3a2, que codificam a proteína Bcr-Abl de 210 kDa (PEREGO *et al.*, 2000).

Os nossos resultados indicaram que a CR-LAAO foi mais eficiente para induzir apoptose na linhagem K562 que tem o transcrito b3a2. Diferentes trabalhos da literatura têm relatado o papel dos diferentes transcritos na evolução clínica da LMC, porém os resultados são controversos (LEE, *et al.*, 1992; VEGA-RUIZ, *et al.*, 2007; SHARMA, *et al.*, 2010).

Vega-Ruiz *et al.* (2007) avaliaram o impacto dos transcritos b3a2 e b2a2 na resposta molecular em pacientes com LMC submetidos à terapia com MI. As maiores taxas de respostas ao MI foram observadas em pacientes que apresentavam o transcrito b3a2, reforçando a hipótese de que as células com o transcrito b2a2 são mais resistentes ao tratamento. Por outro lado, Lee *et al.* (1992) e Sharma e colaboradores (2010), relataram maiores taxas de remissão citogenética em pacientes sob tratamento com interferon-alfa e MI, portadores do transcrito b2a2.

Está descrito que há uma mudança conformacional no ponto de fusão da proteína Bcr-Abl. devido à presença do aminoácido lisina no transcrito b3a2 e do ácido glutâmico em b2a2. Essa mudança conformacional está associada a diferentes evoluções clínicas da LMC e a resposta dos pacientes ao tratamento (KUMAR, 2006, SHARMA *et al.*, 2010).

A citotoxicidade de CR-LAAO parece ser seletiva para linhagens tumorais, já que as células MNC de indivíduos sadios cultivadas na presença de CR-LAAO são mais resistentes à ação dessa enzima do que as linhagens celulares. Estes resultados podem ter implicações clínicas importantes, uma vez que encontrar novos compostos com menor toxicidade para células normais é um dos principais objetivos da terapia antitumoral.

Como esperado, os tratamentos com o VP-16 mostraram que esta droga foi altamente citotóxica apenas para a linhagem HL-60, reforçando a resistência das células Bcr-Abl positivas à ação de quimioterápicos comercialmente utilizados. Além disso, este composto mostrou-se com baixa seletividade para células tumorais, visto que diminuiu cerca de 50% a viabilidade das células MNC normais.

Outros estudos relataram que as LAAOs obtidas das serpentes *Ophiophagus Hannah* e *Agkistrodon contortrix laticinctus* foram citotóxicas contra as linhagens celulares SNU-1 (tumor de estômago), B16/F10 (melanoma), HL-60 (AHN, *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 1999), A549 (adenocarcinoma de pulmão) e MCF-7 (câncer de mama) (LEE *et al.*, 2014).

Alves *et al.* (2008) avaliaram os efeitos citotóxicos da LAAO isolada de *Bothrops atrox* (BatroxLAAO) nas linhagens tumorais HL-60 (IC₅₀ = 25 µg/mL), B16/F10 (IC₅₀ = 25 µg/mL) e Jurkat (IC₅₀ 25 µg/mL), assim como nas células MNC de indivíduos

saudáveis (IC_{50} 50 $\mu\text{g/mL}$). Outros estudos mostraram que as LAAOs isoladas das serpentes *Agkistrodon acutus* (ACTX-6) e *Bungarus fasciatus* (BF-LAAO) foram citotóxicas contra as células A549 (adenocarcinoma de pulmão) (IC_{50} = 20 $\mu\text{g/mL}$) (ZHANG; WU, 2008; WEI, *et al.*, 2009).

O efeito citotóxico das SV-LAAOs tem sido atribuído ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido durante a reação enzimática das LAAOs com seus substratos e posteriormente liberado para o meio. O H_2O_2 pertence à família das espécies reativas de oxigênio (ROS), responsáveis por causar estresse oxidativo na célula e promover a morte (TORII, *et al.*, 1997; CISCOTTO, *et al.*, 2008., RODRIGUES, *et al.*, 2009; ALVES-PAIVA, *et al.*, 2011).

Para investigar se o H_2O_2 estava relacionado ao efeito citotóxico induzido pela CR-LAAO, avaliou-se o efeito da toxina nas linhagens celulares na presença da catalase. A adição da catalase nos ensaios de quantificação da citotoxicidade proporcionou aumento da viabilidade das linhagens celulares. Em todas as concentrações e linhagens analisadas, a viabilidade permaneceu entre 80 e 100%, indicando que o H_2O_2 contribuiu para a ação citotóxica da CR-LAAO nas linhagens Bcr-Abl positivas.

Izidoro e colaboradores (2006), relataram que o efeito citotóxico da BpirLAAO-I na linhagem tumoral SBKR-3 foi totalmente abolido na presença de catalase (100 mg/mL). ALVES-PAIVA *et al.* (2011) também demonstraram que os efeitos citotóxicos da BatroxLAAO nas linhagens tumorais Jurkat e B16/F10 diminuíram na presença da catalase. Da mesma forma, a citotoxicidade da LAAO isolada de *Lachesis muta* (Lm-LAAO) foi inibida na linhagem tumoral MCF-7 (câncer de mama) na presença de catalase (100 mg/mL) (BREGGE-SILVA *et al.* 2012).

Contudo, o efeito citotóxico induzido pela LAAO de *Bothrops leucurus* (Bl-LAAO) na linhagem tumoral MKN-45 (tumor de estômago), foi inibido apenas em 25% na presença de 100 mg/mL de catalase (NAUMANN *et al.*, 2011). Nossos achados corroboraram com os estudos acima descritos, indicando que o H_2O_2 é o principal responsável pelo efeito citotóxico da CR-LAAO.

Em geral, as SV-LAAOs apresentam maior citotoxicidade em células tumorais do que em células MNC normais de sangue periférico (IZIDORO *et al.*, 2006; BURIN *et al.*, 2013). Como o H_2O_2 provoca danos em lipídeos (MITTAL *et al.*, 2014) e considerando que as membranas das células tumorais possuem maior concentração de lipídeo em relação às células normais (BONIFACIO *et al.*, 2012), sugerimos que o H_2O_2 produzido durante a reação enzimática das SV-LAAOs tenha maior afinidade pela membrana das

células tumorais. Essa hipótese explicaria a atividade antitumoral mais pronunciada da CR-LAAO em células leucêmicas.

Acredita-se que a porção glicana das SV-LAAO favoreça a ancoragem destas enzimas nas células, elevando a concentração de H_2O_2 no local, causando o dano oxidativo nas células tumorais e indução de apoptose (MOUSTAFA *et al.*, 2006). A CR-LAAO possui uma porção glicana adicional ligada ao aminoácido Asn172 na região N-terminal da enzima (MACHEROUX *et al.*, 2001) o que provavelmente contribui para sua ancoragem nos lipídeos das células leucêmicas e o direcionamento da ação do H_2O_2 na superfície celular. Além disso, o mecanismo pelo qual as SV-LAAO induz apoptose celular parece ser diferente do H_2O_2 adicionado exogenamente, o que sugere ainda mais a especulação de que o direcionamento do H_2O_2 é importante para sua ação citotóxica e indutora de apoptose (SURH; KIM, 1999; GEYER *et al.*, 2001; MACHEROUX *et al.*, 2001).

A apoptose é um processo fisiológico de morte, cujas falhas podem resultar no desenvolvimento de tumores, incluindo as neoplasias hematológicas (ELMORE, 2007; ZIVNY *et al.*, 2010; POON *et al.*, 2010). O processo de desenvolvimento de fármacos eficazes para a terapia anticâncer visa à erradicação de células neoplásicas que pode ocorrer pelo processo de indução da apoptose.

Assim sendo, a detecção do perfil de sensibilidade a apoptose celular induzida pela CR-LAAO foi realizada nas linhagens tumorais Bcr-Abl positivas e em células MNC de pacientes com leucemia mielóide crônica.

Após o tratamento das linhagens celulares HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22 com a CR-LAAO por 24 h foram observadas mudanças morfológicas nas células, como diminuição no tamanho e aspecto mais fragmentado em relação às células não tratadas com a CR-LAAO.

Apesar das mudanças morfológicas celulares não serem conclusivas sobre a apoptose e o estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio nas células, tais dados aliados aos outros resultados obtidos indicaram o efeito citotóxico e indutor de apoptose da CR-LAAO nestas linhagens.

As células em apoptose podem ser detectadas quando o processo está em fase inicial ou tardia. No estágio inicial, a membrana plasmática permanece íntegra e ocorre a exposição de fosfolípidos, como a fosfatidilserina (PS) que medeia o reconhecimento das células pelos fagócitos. As células em estágio inicial de apoptose podem progredir

para o estágio tardio, no qual a apoptose se caracteriza pela perda de integridade da membrana plasmática (VAN ENGELAND 1998; ELMORE 2007, POON *et al.*, 2010).

Desta forma, a quantificação das percentagens de apoptose neste estudo foi realizada por meio de dois métodos, HFS e anexina V-FITC, ambos analisados por citometria de fluxo.

Nossos resultados obtidos pelo método de HFS para as linhagens celulares mostraram aumento das percentagens de núcleos hipodiplóides em todas as linhagens tratadas com a CR-LAAO nos tempos analisados de 18 e 24 h. O tratamento com o VP-16 induziu a apoptose em aproximadamente 90% na HL-60 e de 10 a 18% nas diferentes linhagens Bcr-Abl positivas estudadas, reforçando que as células Bcr-Abl positivas são resistentes a apoptose induzida pelos quimioterápicos convencionais. Dessa forma, os resultados sugerem que a CR-LAAO foi mais eficiente na sensibilização das linhagens Bcr-Abl positivas a apoptose do que o quimioterápico VP-16.

As análises dos ensaios de anexina V-FITC confirmaram os dados do ensaio de HFS, ou seja, a CR-LAAO foi capaz de induzir apoptose tardia em linhagens K562 e KCL22 após 12, 18 e 24 h.

O termo apoptose tardia está em debate (CVETANOVIC; UCKER, 2004). De acordo com WU *et al* (2001), as células em apoptose tardia se comportariam como células em necrose. No entanto, Patel e Colaboradores (2005), mostraram que as células em apoptose tardia possuem fenótipo e função similares as células em apoptose inicial.

Outras publicações descreveram a indução de apoptose pelas SV-LAAOs em diferentes tipos de células tumorais, como por exemplo, o estudo de TORII *et al.*, (1997) que demonstrou que 10 µg/mL da LAAO isolada de *Crotalus atrox* (Apoxin-I) induziu a fragmentação da cromatina nas linhagens HL-60, A2780 (câncer de ovário), células umbilicais humanas e endoteliais de rato.

Souza *et al.*, (1999) reportou que a LAAO isolada de *Agkistrodon contortrix laticinctus* causou fragmentação de DNA na linhagem HL-60 na concentração de 25 µg/mL após 24 h de tratamento. Outro estudo demonstrou que a LAAO isolada de *Vipera berus berus* (VB-LAAO) induziu apoptose na linhagem tumoral HeLa (carcinoma epitelial humano) e K562, utilizando-se concentrações de 2,5 a 10 µg/mL (SAMEL *et al.*, 2006). Também foi descrito que a BatroxLAAO e a LAAO isolada de *Bungarus fasciatus* (BF-LAAO) induziram apoptose nas linhagens HL-60, Jurkat, B16/F10 e A549 (ALVES *et al.*, 2008; WEI *et al.*, 2009; ALVES-PAIVA *et al.*, 2011).

O potencial indutor de apoptose da CR-LAAO foi pouco explorado pela literatura, há apenas um trabalho sobre a ação antitumoral na linhagem Jurkat (ANDE *et al.*, 2006).

Sabendo-se que a apoptose é um processo dinâmico em que os eventos acontecem em curto espaço de tempo, diferentes métodos devem ser realizados para a confirmação deste processo. Assim sendo, a ativação das caspases 3, 8 e 9 foram investigadas nas linhagens celulares HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22 tratadas com CR-LAAO.

Nossos resultados demonstraram ativação das caspases 3, 8 e 9. A ativação das caspases 3, 8 e 9 sugere que a morte celular induzida por CR-LAAO está sendo desencadeada pelas vias extrínseca e intrínseca da apoptose.

Foi demonstrado, por outros pesquisadores, que LAAOs isoladas de *Agkistrodon acutus*, as ACTX-8 e ACTX-6, induziram a ativação de caspases em linhagens tumorais. A ACTX-8 induziu a ativação das caspases 3, 9 e clivagem de PARP na linhagem tumoral cervical HeLa, enquanto que a ACTX-6 ativou as caspases 3, 8 e 9 de maneira tempo-dependente após 12, 24 e 48 h na linhagem de tumor de pulmão A549 (ZHANG; WEI, 2006; ZHANG; CUI, 2007).

Também já foi observada a ativação das caspases 3 e 9 nas linhagens HL-60, Jurkat e B16/F10 após tratamento com a BatroxLAAO e nas linhagens MCF-7 e A549 pelo tratamento com a LAAO isolada da serpente *Ophiophagus Hannah*. (ALVES *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2013). Fung e colaboradores (2015), reportaram que o estresse oxidativo gerado pelo H₂O₂ durante a reação enzimática da LAAO isolada de *Ophiophagus Hannah*, alterou a expressão de 27 genes envolvidos na apoptose na linhagem MCF-7, reforçando assim a participação do H₂O₂ na ação das LAAO.

Ainda nesse contexto, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a LAAO isolada de *Bothrops pirajai* (BpirLAAO-I) induz ativação das caspases 3, 8 e 9 nas linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl, sugerindo a participação das vias intrínseca e extrínseca no processo de indução de apoptose (BURIN *et al.*, 2013).

Muitos fármacos podem induzir apoptose direta ou indiretamente por meio da interação com a mitocôndria, o que aumenta a permeabilidade da membrana mitocondrial interna, liberando fatores como o citocromo c para o citosol, ativando a caspase 9 e promovendo a apoptose. Essa redução na perda do potencial da membrana ocorre possivelmente pela abertura dos poros da membrana mitocondrial (NUNES *et al.*, 2011; DONG; ZHI-QIANG; YING, 2012).

É descrito que perturbações causadas na membrana mitocondrial estão associadas com as ROS, que podem ser geradas a partir de fontes endógenas (produzidas

pela mitocôndria), ou a partir de fontes exógenas (YING-TANG *et al.*, 2006; MARCHI *et al.*, 2007; PIEME *et al.*, 2013). Considerando o papel fundamental que a mitocôndria exerce na apoptose e sabendo-se que o H_2O_2 , liberado durante a reação da CR-LAAO com seu substrato, está associado à indução de apoptose, avaliou-se o potencial de membrana mitocondrial após tratamento das linhagens celulares HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22 com a CR-LAAO.

Nossos resultados mostraram que a CR-LAAO promove a perda do potencial de membrana mitocondrial de maneira dose-dependente nas linhagens celulares, HL-60, HL-60.Bcr-Abl e KCL22, mas não na K562. O tratamento com o etoposídeo (VP-16) provocou a perda do potencial de membrana na linhagem, mas não nas linhagens Bcr-Abl positivas, mostrando que os agentes quimioterápicos convencionais não são capazes de induzir apoptose nas linhagens K562, KCL22 e HL-60.Bcr-Abl.

Apesar de poucos relatos na literatura, foi descrito que outras SV-LAAOs induzem perda de potencial de membrana em linhagens tumorais. Zhang e colaboradores (2006 e 2007) e Nunes *et al.*, (2012), demonstraram as LAAOs ACTX-8, ACTX-6 e de *Bothrops leucurus* promovem perda do potencial de membrana mitocondrial de linhagens tumorais. Além disso, esses estudos demonstraram o H_2O_2 gerado por essas LAAOs estava envolvido na perda de potencial de membrana. Dentre as ROS, o peróxido de hidrogênio é descrito como a espécie menos reativa, porém se difunde pela membrana celular, o que lhe permite reagir e induzir danos no DNA (VAN LOON *et al.*, 2010).

O ensaio cometa ou eletroforese em gel de célula única foi empregado para quantificar a genotoxicidade da CR-LAAO nas linhagens celulares HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22. Trata-se de um método rápido e sensível para a detecção de danos no DNA (SINGH *et al.*, 1988; KUMARAVEL *et al.*, 2009).

A CR-LAAO apresentou genotoxicidade maior na linhagem HL-60.Bcr-Abl, seguida pela K562, HL-60 e KCL22. A resposta celular a danos oxidativos envolve vários processos, tais como a reparação de DNA, interrupção do ciclo celular e apoptose (SEE; LOEFFLER, 2001; VAN LOON *et al.*, 2010).

É importante ressaltar que a quantidade de danos no DNA detectadas no ensaio cometa, não pode ser a princípio, definida como apoptose, visto que a apoptose é um processo resultante de danos irreversíveis, enquanto os danos no DNA podem ser reparados e as células com o DNA danificado não entrar em apoptose (COLLINS, 2004). Como nossos resultados descritos anteriormente nos ensaios de indução de apoptose e detecção de caspases mostraram que a CR-LAAO induziu apoptose nas linhagens

celulares após 24 h de tratamento, pode-se inferir que os danos no DNA já observados após 4 h pelo ensaio cometa, podem ter sido um dos fatores que conduziram as células à morte por apoptose.

O potencial indutor de apoptose da CR-LAAO foi também testado para células MNC normais e Bcr-Abl positivas de pacientes com LMC em diferentes fases da doença, com e sem tratamento com o mesilato de imatinibe. A CR-LAAO induziu apoptose nas células MNC de pacientes em fase crônica com e sem tratamento do MI, porém pouco efeito foi observado nas células mononucleares de pacientes em fase acelerada. Cabe ressaltar que nas células MNC dos indivíduos saudáveis o efeito induzido pela CR-LAAO foi inferior aos efeitos observados nas células MNC dos pacientes, sugerindo a seletividade da ação desta enzima em células leucêmicas.

Na LMC, a progressão da doença para as fases mais avançadas é acompanhada por alterações moleculares como o aparecimento da trissomia do cromossomo 8, a duplicação do cromossomo Ph, aumento da expressão do gene *BCR-ABL1*, expulsão do fármaco MI pela célula leucêmica e a presença de mutações no sítio catalítico da proteína Bcr-Abl (DRUKER *et al.*, 2000; JOHN *et al.*, 2004; BACCARANI *et al.*, 2015). Como o MI, a CR-LAAO parece ter efeito limitado nas células leucêmica dos pacientes nas fases avançadas da doença. Todavia, nossos resultados são de grande importância, visto que indicam a CR-LAAO como uma substância promissora para atuar na fase inicial da LMC, impedindo a progressão da doença.

5.2. Efeito da CR-LAAO combinada aos inibidores de tirosina-quinase

Os pacientes com LMC são tratados principalmente com os inibidores de tirosina quinase, que apesar de eficientes, raramente promovem remissão da doença em pacientes em fases avançadas e já há relatos de resistência em de alguns na fase crônica da doença. A resistência dos pacientes ao MI é mediada principalmente por mutações genéticas no domínio da proteína Bcr-Abl. Dentre as mutações que causam diferentes graus de resistência ao tratamento nos pacientes com LMC, a mutação T315I é a mais resistente, visto que nem mesmo a geração mais potente de TKI, como o DAS e NIL são eficientes contra essa mutação (TOHAMI *et al.*, 2012, BACCARANI *et al.*, 2015).

Uma nova abordagem terapêutica seria o tratamento dos pacientes com LMC empregando compostos naturais associados aos inibidores de tirosina-quinase. Sendo assim, a CR-LAAO combinada a um TKI foi testado contra as células Bcr-Abl positivas.

A CR-LAAO combinada aos TKI MI, DAS e NIL aumentou as percentagens de apoptose na linhagem celular Bcr-Abl positiva estudada. Esses dados indicam que os TKI potencializaram a ação apoptótica da CR-LAAO nas células Bcr-Abl positivas. Na tentativa de melhor esclarecer os efeitos da combinação da CR-LAAO com os TKI, os níveis das proteínas fosfotirosina (py), Bcr-Abl e c-abl na linhagem HL-60.Bcr-Abl foram detectadas. Após os tratamentos com cada TKI, houve redução das proteínas fosforiladas (fosfotirosina) e Bcr-Abl nas concentrações de 0,35 a 1,00 µg/mL.

Juntos, os resultados obtidos indicam que os tratamentos com a CR-LAAO nas concentrações mais baixas (0,05 a 0,25 µg/mL), combinada com os TKI, aumentaram a sensibilidade das células Bcr-Abl positivas à apoptose. Nas concentrações mais elevadas de CR-LAAO (0,35 a 1,00 µg/mL) combinada aos TKI, houve redução dos níveis de Bcr-Abl o que implica na diminuição da fosforilação de outras proteínas. Importante ressaltar que nas concentrações mais elevadas de CR-LAAO há apoptose, o que poderia explicar, pelo menos em parte, a diminuição nos níveis de Bcr-Abl.

O inibidor de tirosina quinase, MI, inibe de forma eficiente a proliferação dos progenitores da linhagem granulocítica-monocítica em pacientes com LMC em fase crônica, suprimindo a proliferação das células Bcr-Abl positivas, levando-as a morte por apoptose (DEININGER *et al.*, 1997; TIPPING *et al.*, 2002; PISKIN *et al.*, 2007). O mecanismo pelo qual o MI induz apoptose nas células Bcr-Abl positivas parece estar associado à dependência da célula leucêmica a atividade constitutiva da tirosina-quinase e não de seu efeito direto na maquinaria apoptótica celular (BUENO-DA-SILVA *et al.*, 2003).

O efeito do MI combinado ao sulfito de arsênio (As₄S₄) na linhagem K562 promoveu indução da apoptose e diminuição dos níveis de Bcr-Abl de forma sinérgica. O As₄S₄ induziu o estresse oxidativo, que provocou a ubiquitinação de resíduos de lisina na estrutura de Bcr-Abl, induzindo a sua degradação proteossomal (ZHANG *et al.*, 2008).

O DAS atua tanto na inibição da atividade de Bcr-Abl como das enzimas da família Src-quinases. Estas quinases são reguladores da proliferação e sobrevivência celular. A desregulação destas proteínas está associada com a transformação de células normais em malignas e seu aumento já foi descrito na LMC (HOCHHAUS *et al.*, 2007). O estudo realizado com o composto oxaliplatina combinado com o DAS para o tratamento de câncer colorretal, mostrou que a geração de H₂O₂ pelo oxaliplatina inibiu a atividade da família Src-quinases, potencializando o efeito do DAS na inibição destas proteínas. Além disso, este estudo mostrou que a combinação destes compostos inibiu a

proliferação celular e promoveu a ativação de caspase 3 nas células tumorais (KOPETZ *et al.*, 2009).

O mecanismo pelo qual o DAS induz apoptose nas células Bcr-Abl positivas também é pouco esclarecido, mas se especula que o DAS iniba a via de sinalização STAT5, fosforilada pela proteína Bcr-Abl, contribuindo para a inibição da proliferação celular e indução de apoptose (NAM *et al.*, 2007; VELDURTHY *et al.*, 2008). Diante destas evidências, é possível que a CR-LAAO, novamente pela produção de H₂O₂ durante a reação enzimática, atue na inibição ou regulação da família Src-quinases, assim como em vias de sinalização celular como a STAT5, potencializando o efeito do DAS na indução de apoptose e principalmente na redução da proteína Bcr-Abl.

O NIL foi desenvolvido para superar a resistência de pacientes com LMC ao MI por meio da inibição de Bcr-Abl de forma mais eficiente que o MI e DAS. Belloc *et al.* (2007) descreveram que o NIL induz apoptose em células Bcr-Abl positivas por meio do aumento da proteína pró-apoptótica Bim, o que levaria a inibição da atividade de Bcr-Abl e indução da apoptose.

Especulamos que efeito combinado da CR-LAAO e inibidores de TK, está na capacidade da CR-LAAO em promover a sensibilidade das células Bcr-Abl positiva a apoptose por meio da liberação do H₂O₂ e no inibidor de TK bloqueando a ação da tirosina-quinase Bcr-Abl.

5.3. Efeito da CR-LAAO na modulação da expressão de microRNAs reguladores de genes envolvidos na apoptose

Os miRNAs pertencem à classe de pequenos RNAs endógenos não codificantes, que regulam a expressão gênica por meio da degradação ou inibição da tradução de RNAm alvos. A expressão anormal dos miRNAs tem sido amplamente relacionada com o desenvolvimento de neoplasias hematológicas, incluindo as leucemias (YENDAMURI; CALIN, 2009; BABASHAH *et al.*, 2012). A primeira evidência de envolvimento dos miRNAs em neoplasias foi descrita na leucemia linfocítica crônica (LLC), em que a deleção de uma região cromossômica (13q14) foi associada com a baixa expressão de miR-15a (CALIN *et al.*, 2002). Posteriormente foi demonstrado que o miR-15a e miR-16 regulavam negativamente a expressão da proteína Bcl-2 em nível pós-transcricional, induzindo apoptose em células leucêmicas, ou seja, quanto maior a expressão destes miRNAs, menor a expressão de Bcl-2 (CIMINO *et al.*, 2005).

Foi constatado que alterações nos perfis de expressão de miRNAs podem fornecer informações sobre a sensibilidade ou resistência de tumores a diferentes tratamentos. Além disso, investigar a modulação na expressão dos miRNAs durante a terapia, pode ser uma ferramenta importante para auxiliar o tratamento (CALIN; CROCE, 2006; HUMMEL *et al.*, 2010).

Na LMC, a expressão de muitos genes relacionados ao controle da apoptose está desregulada, o que pode ser explicado pelo menos em parte, por alterações na expressão dos miRNAs (FERREIRA *et al.*, 2014).

Neste contexto, o presente estudo avaliou o potencial da CR-LAAO em modular a expressão dos miRNAs (apoptomiRs): miR-15a, miR-16, miR-145, miR-26a, hsa-let-7d, miR-142-3p, miR-29c, miR-146a, miR-21, miR-130a e miR-130b, nas linhagens HL-60, HL-60.Bcr-Abl, K562 e KCL22.

A CR-LAAO aumentou a expressão de miR-15a e miR-16 e diminuiu os níveis proteicos do respectivo alvo, a proteína Bcl-2, na linhagem HL60.Bcr-Abl.

Ferreira *et al.* (2014), avaliaram a expressão de miR-15a e miR-16 nas linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl e observaram menor expressão destes miRNAs na linhagem Bcr-Abl positiva. Este estudo demonstrou que os miR-15a e miR-16 estavam menos expressos nos pacientes em fases mais avançadas da doença com maior expressão de Bcl-2.

A proteína anti-apoptótica Bcl-2 exerce sua função pela inibição do complexo Bax/Bak e sequestro de proteínas da família *BH3-only*, como Bid e Bim. Foi descrito também que a inibição de Bcl-2 ativa o complexo Bax/Bak, induzindo o processo de apoptose (CHIPUK *et al.*, 2010; PARSONS; GREEN, 2010). Na LMC, a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl está associada à inibição da apoptose por aumento das proteínas anti-apoptóticas (BUENO- DA-SILVA 2003; DEMING *et al.*, 2004; RAKSHIT *et al.*, 2010). Proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, Bcl-w e A1 estão criticamente envolvidas na via mitocondrial da apoptose (YOULE; STRASSER, 2008).

O fato da CR-LAAO modular positivamente a expressão de miR-15a e miR-16 é de grande relevância, visto que diminuir os níveis de Bcl-2 torna as células leucêmicas mais sensíveis a morte celular.

Outros miRNAs em que a baixa expressão está associada a pior prognóstico nas neoplasias têm chamado a atenção. Dentre eles estão os miR-145, miR-26a, hsa-let-7d, miR-142-3p, miR-29c e miR-146a. O efeito antitumoral do miR-145 foi descrito em neoplasias, como hepatocarcinoma, adenocarcinoma, leucemia de células T humana vírus tipo I (HTLV-1), linfoma e leucemia mielóide aguda (LMA) (CHO *et al.*, 2011;

STARCZYNOWSKI *et al.*, 2011; XIA *et al.*, 2014). Ferreira *et al.* (2014) descreveram que na LMC foram observados baixos níveis destes miRNAs nas fases avançadas em relação a fase crônica.

A CR-LAAO aumentou a expressão de miR-145 e seu respectivo alvo, a proteína Bax, aumentou na KCL22, sugerindo que a modulação de miR-145 pela CR-LAAO nesta linhagem, também sensibiliza as células à apoptose.

A expressão do miR-26a aumentou em todas as linhagens analisadas após o tratamento com a CR-LAAO. Ao avaliar os níveis das proteínas alvos Bid (inativa) e Bim, observou-se a diminuição dos níveis de Bid na HL-60.Bcr-Abl e K562, e aumento de Bim na KCL22.

Sabe-se que no processo de apoptose, a caspase 8 pode ativar diretamente a fase executora da apoptose, pela ativação da caspase 3 ou agir na clivagem da proteína Bid (inativa), originando a proteína Bid truncada (tBid), a qual se dirige à mitocôndria, ativando a via intrínseca (HENGARTNER, 2000; ZIVNY *et al.*, 2010).

Nossos achados demonstraram que a CR-LAAO induziu a apoptose pela ativação das vias extrínseca e intrínseca. Diante dos resultados da diminuição de Bid na sua forma inativa, pode-se sugerir que a ativação da caspase 8 pela CR-LAAO induz a clivagem de Bid e a ativação da via intrínseca. Contudo, para confirmar esta hipótese, seria necessário avaliar a expressão da proteína tBid. Corroborando com nossos resultados, Havelange *et al.* (2011), demonstraram que o aumento da expressão de miR-26a está relacionado a elevação dos níveis da proteína pró-apoptótica Bim em células de LMA e na linhagem K562, sensibilizando essas células à apoptose.

Após o tratamento com CR-LAAO, houve aumento do hsa-let-7d. A avaliação dos níveis das proteínas Bak e A1, proteínas cuja expressão possivelmente é regulada pelo hsa-let-7d, mostrou elevação dos níveis de Bak em HL-60 e KCL22.

Johnson *et al.* (2005), relataram que o hsa-let-7d, por meio da repressão pós-transcricional, diminuiu a expressão do oncogene *RAS*, que é ativado na LMC pela proteína Bcr-Abl, contribuindo para a progressão da doença. O aumento da expressão do hsa-let-7d foi associado ao melhor prognóstico de câncer de cabeça e pescoço, câncer de ovário e indução de apoptose regulada por Fas em linhagem celular de carcinoma colorectal (WALLER, 2010; GENG *et al.*, 2011; CHANG *et al.*, 2011).

A CR-LAAO também foi capaz de elevar a expressão de miR-142-3p, miR-29c e de miR-146a. Embora a CR-LAAO tenha modulado a expressão destes miRNAs nas

linhagens Bcr-Abl positivas, os níveis proteico de seus alvos Mcl-1 e C-Flip permaneceram estáveis.

Spinello *et al.* (2011) demonstraram que na linhagem U937 (leucemia mielóide aguda), o miR-146a tem como alvo a proteína CXCR4, descrita como inibidora de apoptose nestas células. Sendo assim, o aumento da expressão de miR-146a foi capaz de diminuir a expressão da proteína CXCR4 e elevar a sensibilidade da linhagem U937 à apoptose. Zhao e Starczynowski (2014) relataram que na MO de pacientes com síndrome mielodisplásica, a menor expressão de miR-146a estava associada à patogênese de neoplasias hematológicas devido a alterações funcionais da célula tronco hematopoética, provocando desregulação na produção de citocinas e elevação do número de plaquetas.

A expressão alterada de membros da família miR-29 também tem sido associada a progressão de neoplasias como LMA, LLC e alguns tumores sólido (LI *et al.*, 2013).

Além disso, Ferreira *et al.* (2014), demonstraram que os miRNAs hsa-let-7d, 142-3p e miR-29c são pouco expressos na linhagem HL-60.Bcr-Abl. Assim, a capacidade da CR-LAAO em modular a expressão destes miRNAs nas linhagens Bcr-Abl positivas, reforça o potencial desta enzima de atuar em mecanismos antitumorais.

Nosso estudo demonstrou que a CR-LAAO foi capaz de diminuir a expressão do miR-21 na linhagem K562. O miR-21 é considerado um miRNA com alto potencial oncogênico, que está associado com o bloqueio do processo de apoptose, sendo um dos fatores a inibição da atividade de caspases (CHAN *et al.*, 2005). Elevada expressão de miR-21 foi descrita em diversos tumores, como hepatocarcinoma, câncer gástrico, carcinoma cervical, LLC e linfoma de células B (KRICHEVSKY; GABRIELLY, 2009; SICARDI, *et al.*, 2012; LEI *et al.*, 2014).

Chan *et al.* (2005) demonstraram que em células de glioblastoma humano *Knockdown* de miR-21 promoveu ativação de caspases efetoras e apoptose, sugerindo que a expressão elevada deste miRNA bloqueia a expressão de genes reguladores da apoptose.

Sicardi e colaboradores (2012), relataram que a elevada expressão de miR-21 em adenocarcinoma pancreático promoveu proliferação celular e inibição da apoptose.

A expressão de miR-130a aumentou em todas as linhagens analisadas após tratamento com a CR-LAAO. No entanto, a expressão de miR-130b aumentou nas linhagens HL-60, HL-60.Bcr-Abl e KCL22 e diminuiu na K562.

O aumento da expressão de miR-130a, em outros trabalhos da literatura, foi associado ao estímulo da apoptose na linhagem A2780, por regulação direta no gene anti-apoptótico *XIAP* (ZHANG *et al.*, 2013). O aumento da expressão deste miRNA também

foi associado à indução de apoptose e interrupção no ciclo celular em células de tumor de próstata (BOLL *et al.*, 2013).

A modulação na expressão de miR-130b parece exercer diferentes papéis no desenvolvimento e progressão de neoplasias.

Em alguns casos o miR-130b foi reportado como um promotor de proliferação celular e associado com a progressão de tumor e resistência a quimioterápicos (YANG *et al.*, 2012). Em estudos realizados com o miR-130b em células de leucemia de células T, câncer de endométrio e tumor gástrico, observaram que o aumento da expressão deste miRNA, diminuía a indução de apoptose nestas células tumorais (YEUNG *et al.*, 2008; LAI *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2012).

Contudo, Zhao e colaboradores (2013), avaliaram o aumento da expressão de miR-130b em células de tumor de pâncreas e detectaram que este miRNA foi capaz de induzir a apoptose e interromper o ciclo celular na fase S, diminuindo assim a progressão e o poder invasivo destas células tumorais.

Apesar da modulação observada no miR-21, miR-130a e miR-130b, os níveis da proteína Ciap-2 não foram alterados.

Diante dos resultados apresentados, cabe ressaltar que outros possíveis genes alvos como *BIK*, *CIAP-1* e *FASL* também foram descritos para os miRNAs miR-142-3p, miR-29c, miR-146a, miR-130a, miR-130b e miR-21 (FERREIRA *et al.*, 2014). Sendo assim, a avaliação do efeito da CR-LAAO na modulação de outros possíveis alvos poderia auxiliar no entendimento dos mecanismos exercidos pela toxina na modulação destes miRNAs.

Tendo em vista que o presente estudo avaliou pela primeira vez o potencial da CR-LAAO na modulação dos principais miRNAs que regulam os genes e proteínas envolvidos na apoptose, e diante da complexidade da regulação exercida por estes miRNAs nas neoplasias, mais estudos são necessários para a descrição de possíveis mecanismos pelos quais a CR-LAAO é capaz de modular a expressão destes miRNAs envolvidos na LMC.

6. CONCLUSÕES

- A CR-LAAO apresentou maior atividade citotóxica nas linhagens celulares Bcr-Abl positivas do que nas células mononucleares de indivíduos saudáveis;
- O peróxido de hidrogênio é o principal responsável pelo efeito citotóxico da CR-LAAO nas linhagens Bcr-Abl positivas;
- A CR-LAAO possui potencial para 1) ativação da apoptose em todas as linhagens celulares analisadas por meio das vias intrínseca e extrínseca da apoptose; 2) indução de dano no DNA; 3) promover perda do potencial de membrana mitocondrial;
- As células mononucleares de pacientes em fase crônica da LMC são mais sensíveis à CR-LAAO do que os indivíduos saudáveis e pacientes em fases avançadas, reforçando a seletividade da ação desta enzima para as células leucêmicas e sugerindo que a CR-LAAO possa atuar em fases mais iniciais da doença;
- A CR-LAAO combinada com os inibidores de tirosina-quinase MI, DAS e NIL induziu aumento da apoptose na linhagem HL-60.Bcr-Abl. Após os tratamentos com cada TKI, houve redução dos níveis das proteínas fosforiladas (fosfotirosina) e Bcr-Abl;
- A CR-LAAO modulou a expressão dos apoptomiRs miR-15a, miR-16, miR-145, miR-26a, hsa-let-7d, miR-142-3p, miR-29c, miR-21, miR-130a e miR-130b e das proteínas Bak, Bim, Bid e Bcl-2 nas linhagens Bcr-Abl positivas.
- Sendo assim, nossos resultados indicam que a CR-LAAO possui uma ação antitumoral capaz de destruir as células Bcr-Abl positivas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGIRRE, X.; JIMÉNEZ-VELASCO, A.; SAN JOSÉ-ENÉRIZ, E. *et al.* Down-regulation of hsa-miR-10a in chronic myeloid leukemia CD34+ cells increases USF2-mediated cell growth. **Mol Cancer Res**, v. 6, n.12, p.1830-1840, 2008.
- AHN, M.Y.; LEE, B.M.; KIM, Y.S. Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). **Int. J. Biochem. Cell. Biol**, v. 29, n.6, p. 911-919, 1997.
- ALI, M.Y.; STOEVA, S.; ABBASE, A. *et al.* Isolation, structural and a functional characterization of na apoptosis inducing L-amino aid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. **Arch. Biochem. Biophy**, v. 384, n.2, p. 216-226, 2000.
- ALVES, R.M.; ANTONUCCI, G.A.; PAIVA, H.H. *et al.* Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* venom. **Comparative Biochem. And Physiology, part A**, v. 151, n.4, p. 542-550, 2008.
- ALVES-PAIVA, R. M.; De FREITAS FIGUEIREDO, R.; ANTONUCCI, G. A. *et al.* V. Cell cycle arrest evidence, parasitocidal and bactericidal properties induced by l-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochimie**, v. 93. p. 941-947, 2011.
- AMARANTE-MENDES, G.P.; GREEN, D.R. The regulation of apoptotic cell death. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 32, n.9, p. 1053-1061, 1999.
- AN, X.; TIWARI, A.K.; SUN, Y. *et al.* BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. **Leuk Res**, v. 34, n. 10, p. 1255-1268, 2010.
- ANDE, S.R.; ANDE, S.R.; KOMMOJU, P.R. *et al.* Induction of apoptosis in yeast by L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodossoma*. **YEAST**, v. 25, n. 5, p. 349-57, 2008.
- ANDE, S.R.; KOMMOJU, P.R.; DRA.XL, S. *et al.* Mechanism cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, v. 11, n. 8, p. 1439-51, 2006.
- ARAKI, S.; ISHIDA, T.; YAMAMOTO, T.; KAJI, K.; HAYASHI, H.. Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venom in vascular endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res.Commun**, v. 190, p. 148-153, 1993.
- BABASHAH, S.; SADEGHIZADEH, M.; TAVIRANI, M.R *et al.* Aberrant microRNA expression and its implications in the pathogenesis of leukemias. **Cell Oncol (Dordr)**, v. 35, n. 5, p. 317-34, 2012.
- BACCARANI, M.; CASTAGNETTI, F.; GUGLIOTTA, G. *et al.* A review of the European Leukemia Net recommendations for the management of CML. **Ann Hematol**, v. 94, Suppl. 2, p. 141-147, 2015.

BACCARANI, M.; CASTAGNETTI, F.; GUGLIOTTA, G. *et al.* Treatment recommendations for chronic myeloid leukemia. **Mediterr J Hematol Infect Dis**, v. 6, e2014005, 2014.

BALABANOV, S.; BRAIG, M.; BRUMMENDORF, T.H. Current aspects in resistance against tyrosine kinase inhibitors in chronic myelogenous leukemia. **Drug Discov Today Technol.** v.11, p.89–99, 2014.

BELLOC, F.; MOREAU-GAUDRY, F.; UHALDE, M. *et al.* Imatinib and nilotinib induce apoptosis of chronic myeloid leukemia cells through a Bim-dependant pathway modulated by cytokines. **Cancer Biol Ther**, v. 6, n. 6, p. 912-919, 2007.

BEREZIKOV, E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, p. 846–860, 2011.

BERTAZZI, D.T.; DE ASSIS-PANDOCHI, A.I.; TALHAFFERRO, V.L. *et al.* Activation of the complement system and leukocyte recruitment by Tityus serrulatus scorpion venom. **Int Immunopharmacol**, v. 5, n. 6, p. 1077-1084, 2005.

BOLL, K.; REICHE, K.; KASACK, K. MiR-130a, miR-203 and miR-205 jointly repress key oncogenic pathways and are downregulated in prostate carcinoma. **Oncogene**, v. 32, p. 277-285, 2013.

BONIFACIO, M.; RIGO, A.; GUARDALBEN, E. *et al.* α -bisabolol is an effective proapoptotic agent against BCR ABL(+) cells in synergism with Imatinib and Nilotinib. **PLoS One**, v. 7, n.10, doi: 10.1371/journal.pone.0046674, 2012.

BORCHERT, G.M.; LANIER, W.; DAVIDSON, B.L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1097–1101 (2006).

BOUSQUET, M.; LODISH, H.F. MicroRNAs: the primary cause or a determinant of progression in leukemia? **Expert Rev Hematol**, v. 4, n. 2, p.121–123, 2011.

BOYUM, A. Separation of lymphocytes, lymphocyte subgroups and monocytes: a review. **Lymphology**, v.10, n. 2, p. 71-76, 1977.

BRECCIA, M.; ALIMENA G. Second-Generation Tyrosine Kinase Inhibitors (Tki) as Salvage Therapy for Resistant or intolerant Patients to Prior TKIs. **Mediterr J Hematol Infect Dis**, v. 6, n. 1, 2014.

BREGGE-SILVA C.; NONATO M. C.; DE ALBUQUERQUE S. *et al.* Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. **Toxicon**, v. 60, p. 1263-1276, 2012.

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

BUCUR, O.; GAIDOS, G.; YATAWARA, A. *et al.* A novel caspase 8 selective small molecule potentiates TRAIL-induced cell death. **Sci Rep**, v.5, n. 9893, doi: 10.1038/srep09893, 2015.

BUENO-DA-SILVA, A.E.B.; BRUMATTI, G.; RUSSO, F.O. *et al.* Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis is independent of constant tyrosine-kinase activity. **Cell Death and Differ**, v. 10, n. 5, p. 592-98, 2003.

BURIN, S.M.; AYRES, L.R.; NEVES R.P. *et al.* L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* induces apoptosis in BCR-ABL-positive cells and potentiates imatinib mesylate effect. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 113, n. 2, p. 103-12, 2013.

CALIN, G.A.; CROCE, C.M. MicroRNA signatures in human cancers. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, p. 857–866, 2006.

CALIN, G.A.; DUMITRU, C.D.; SHIMIZU, M. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n.24, p.15524-15529, 2002.

CALVETE, J.J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **J. Mass Spectrom.**, v. 42, p. 1405-1414, 2007.

CASTRO, F.A.; JACYSYN, J.F.; ULBRICH, A.G. *et al.* Upregulation of c-flip and bcl-xL mRNA in chronic myelogenous leukemia patients. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 26, p.123, 2004.

CHAN, J.A.; KRICHEVSKY, A.M.; KOSIK, K.S. MicroRNA-21 is na antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. **Cancer Res**, v. 65, n. 14, p. 6029-33, 2005.

CHANG, C.J.; HSU, C.C.; CHANG, C.H. *et al.* Let-7d functions as novel regulator of epithelial-mesenchymal transition and chemoresistant property in oral cancer. **Oncol Rep**, v. 26, n. 4, p.1003-1010, 2011.

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

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

CHEREDA, B.; MELO, J.V. Natural course and biology of CML. **Ann Hematol**, v.94, Suppl 2, p. 107–121, 2015.

CHIPUK, J.; MOLDOVEANU, T.; LLAMBI, F. *et al.* The BCL-2 family reunion. **Mol Cell**, v. 37, p. 299–310, 2010.

CHO, W.C.; CHOW, A.S.; AU, J.S. MiR-145 inhibits cell proliferation of human lung adenocarcinoma by targeting EGFR and NUDT1. **RNA Biol**, v. 8, n. 1, p. 125-31, 2011.

CIMMINO, A.; CALIN, G.A.; FABBRI, M. *et al.* MiR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102, n.39, p.13944-13949, 2005.

COLLINS, A.R, The Comet Assay for DNA Damage and Repair. **Principles, Applications, and Limitations Mol Biotechnol**; v. 26, n.3, p.249-261, 2004.

COMERT, M.; BARAN, Y.; SAYDAM, G. Changes in molecular biology of chronic myelogenous leukaemia in tyrosine-kinase inhibitor era. **Am J Blood Res**, v. 9, Suppl 3, p. 191-200, 2013.

CORSO, A.; LAZZARINO, M.; MORRA, E. *et al.* Chronic myelogenous leukemia and exposure to ionizing radiation a retrospective study of 443 patients. **Ann Hematol**, v. 70, n. 2, p. 79–82, 1995.

COSTA, T.R.; BURIN, S.M.; MENALDO, D.L. *et al.* Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 20, eCollection, 2014.

CULLEN, S.; BRUNET, M.; MARTIN, S. Granzymes in cancer and immunity. **Cell Death Differ**, v.17, p.616–623, 2010.

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

CVETANOVIC, M.; UCKER, D. S. Innate immune discrimination of apoptotic cells: repression of proinflammatory macrophage transcription is coupled directly to specific recognition. **J. Immunol**, v. 172, p. 880–889, 2004.

DALTRY, J.C.; PONNUDURAI, G.; SHIN, C.K. *et al.* Electrophoretic profiles and biological activities: intraspecific variation in the venom of the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). **Toxicon**, v. 34, n. 1, p. 67-79, 1996.

DALTRY, J.C.; PONNUDURAI, G.; SHIN, C.K. *et al.* Electrophoretic profiles and biological activities: intraspecific variation in the venom of the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). **Toxicon**, v. 34, n. 1, p. 67-79, 1996.

DE GROOT, R.P.; RAAIJMAKERS, J.A.; LAMMERS, J.W. *et al.* STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abltransformed cells. **Mol Cell Biol Res Commun**, v.3, n.5, p.:299–305, 2000.

DEFILIPP Z, KHOURY HJ. Management of advanced-phase chronic myeloid leukemia. **Curr Hematol Malig Rep**, v. 10, n. 2, p.173-181, 2015.

DEININGER, M.W.N.; GOLDMAN, J.M.; LYDON, N.B. *et al.* The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL positive cells. **Blood**, v. 90, p. 3691–3698, 1997.

DONG X.C.; BIN, Q.; ZHI-QIANG, G.: Comparison of burst of reactive oxygen species and activation of caspase-3 in apoptosis of K562 and HL-60 cells induced by docetaxel. **Cancer Lett**, v. 214, p.103–113, 2012.

DRUKER, B.J.; LYDON, N.B. Lessons learned from the development of abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. **J Clin Invest**, v. 105, n.1, p.3-7, 2000.

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

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, 495-4516, 2007.

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

FADOK, V.A.; BRATTON, D.L.; KONOWAL, A. *et al.* Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **J Clin Invest**, v.101, n.4, p.890-898, 1998.

FERDINAND, R.; MITCHELL, S.A.; BATSON, L. *et al.* Treatments for chronic myelogenous leukaemia: a qualitative systematic review. **J Blood Med**, v. 3, p. 51-76, 2012.

FERREIRA, A.F.; MOURA, L.G.; TOJAL, I. *et al.* ApoptomiRs expression modulated by BCR-ABL is linked to CML progression and imatinib resistance. **Blood Cells Mol Dis**, v. 53, n. 1-2, p. 47-55, 2014.

FLAMANT, S.; RITCHIE, W.; GUILHOT, J. *et al.* Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. **Haematologica**, v.95, n. 8, p. 1325-1333, 2010.

FUNG, S.Y.; LEE, M.L.; TAN NH. Molecular mechanism of cell death induced by king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 96, n. 38-40, 2015.

GENG, L.; ZHU, B.; DAI, B.H. *et al.* A let-7/Fas double-negative feedback loop regulates human colon carcinoma cells sensitivity to Fas-related apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 408, n.3, p. 494-499, 2011.

GEYER, A.; FITZPATRICK, T. B.; PAWELEK, P. D. *et al.* Structure and characterization of the glycan moiety of L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 4044-4053, 2001.

GOLKS, A.; BRENNER, D.; FRITSCH, C. *et al.* c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. **J Biol Chem**, v. 280, n.15, p.14507-14513, 2005.

GUO, C.; LIU, S.; YAO, Y.; ZHANG, Q. *et al.* Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 60, p. 302-311, 2012. Review.

HAVELANGE, V.; STAUFFER, N.; HEAPHY, C.C. *et al.* Functional implications of microRNAs in acute myeloid leukemia by integrating microRNA and messenger RNA expression profiling. **Cancer**, 2011.

HAZNEDAROGLU, I.C. Monitoring the Response to Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI) Treatment in Chronic Myeloid Leukemia (CML). **Mediterr J Hematol Infect Dis**, v. 6, n. 1, e2014009, 2014.

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

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HERR, I.; DEBATIN, K.M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood**, v. 98, n. 9, p. 2603-2614, 2001.

HOCHHAUS, A.; KANTARJIAN, H.M.; BACCARANI, M. *et al.* Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy. **Blood**, v.109, n.6, 2303-2309, 2007.

HÖGLUND, M.; SANDIN, F.; SIMONSSON, B. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. **Ann Hematol**, v.94, Suppl 2, p. 241-247, 2015.

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

HUMMEL, R.; HUSSEY, D.J.; HAIER, J. MicroRNAs: predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types. **Eur. J. Cancer**, v. 46, p. 298–311, 2010.

HUTVAGNER, G.; ZAMORE, P.D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. **Science**, v. 297, p.2056–2060 (2002).

IZIDORO, L.F.M.; RIBEIRO, M.C.; SOUZA, G.R. *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.

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

JOHNSON SM, GROSSHANS, H.; SHINGARA, J. *et al.* RAS is regulated by the let-7 microRNA family. **Cell**, v. 120, n. 5, p. 635-647, 2005.

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

KENT, O.A.; MENDELL, J.T. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. **Oncogene**, v. 25, p. 6188–6196, 2006.

KERSCHER, A.; SLACK, F.J. Oncomirs, microRNAs with a role in cancer. **Nature**, v. 6, p. 259–69, 2006.

KOPETZ, S.; LESSLIE, D.P.; DALLAS, N.A. Synergistic Activity of the Src Family Kinase Inhibitor Dasatinib and Oxaliplatin in Colon Carcinoma Cells Is Mediated by Oxidative Stress. **Cancer Res**, v. 69, n. 9, p. 3842–3849, 2009.

KRICHEVSKY, A.M.; GABRIELY, G. miR-21: a small multi-faceted RNA. **J Cell Mol Med**, v. 13, n.1, p. 39–53, 2009.

KUMAR, L. Chronic myelogenous leukemia (CML): an update. **Nat Med J India**, v. 19, p. 255–263, 2006.

KUMARAVEL, T.S.; VILHAR, B.; FAUX, S.P. *et al.* Comet Assay measurements: a perspective. **Cell Biol Toxicol**, v. 25, n.1, p.53–64, 2009.

LAI, K.W.; KOH, K.X.; LOH, M. *et al.* MicroRNA-130b regulates the tumour suppressor RUNX3 in gastric cancer. **Eur J Cancer**, v. 46, n. 8, p. 1456–1463, 2010.

LEE, M. L.; CHUNG, I.; FUNG, S. Y. *et al.* Anti-Proliferative Activity of King Cobra (*Ophiophagus hannah*) Venom L-Amino Acid Oxidase. **Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol**, v.114, p.336–343, 2014.

LEE, M.; KANTARJIAN, H.; TALPAZ, M. *et al.* Association of the responsiveness to interferon therapy with the bcr/abl splicing pattern in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 80, Suppl.I, :210a, 1992.

LEE, Y.; KIM, M.; HAN, J. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J**, v.23, p. 4051–4060, 2004.

LEI, B.X.; LIU, Z.H.; LI, Z.J.. miR-21 induces cell proliferation and suppresses the chemosensitivity in glioblastoma cells via downregulation of FOXO1. **Int J Clin Exp Med**, v. 7, n. 8, p. 2060–2066, 2014.

LI, H.; ZHU, H.; XU, C. *et al.* Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. **Cell**, v. 94, p.491–501, 1998.

LI, Q.F.; HUANG, W.R.; DUAN, H.F. *et al.* Sphingosine kinase-1 mediates BCR/ABL-induced upregulation of Mcl-1 in chronic myeloid leukemia cells. **Oncogene**, v.26, n. 57, p.7904–7908, 2007.

LI, Y.; WANG, H.; TAO, K. *et al.* miR29b suppresses CML cell proliferation and induces apoptosis via regulation of Bcr-Abl protein. **Exp Cell Res**, v.319, p. 1094–1101, 2013.

LIU, L.; LING, X.; TANG, H. *et al.* Poly(ADP-ribosyl)ation enhances H-RAS protein stability and causes abnormal cell cycle progression in human TK6 lymphoblastoid cells

Referências Bibliográficas

treated with hydroquinone. *Chem Biol Interact*, v. 238, n.1-8, doi: 10.1016/j.cbi.2015.05.019, 2015.

LOZZIO, B.B.; LOZZIO, C.B. Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. **Leuk Res**, v. 3, n. 6, p. 363-370, 1979.

LUO X, BUDIHARDJO I, ZOU H *et al.* Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. **Cell**; v. 94, n.481–490, 1998.

MACHEROUX, P.; SETH, O.; BOLLSCHWEILER, C. L-amino-acid oxidase from Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. Comparative sequence analysis and characterization of active and inactive forms of the enzyme. **Eur J Biochem**, v. 268, p. 1679-86, 2001.

MARCHI ,S.; GIORGI, C.; SUSKI, M.J. *et al.* Mitochondria-ROS crosstalk in the control of cell death and aging. **J Signal Transd**, p. 1–17, 2007.

MARTIN, S.; AMARANTE-MENDES, G.; SHI, L. *et al.* The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE / CED-3 family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism. **EMBO J**, v. 15, n. 2407–2416, 1996.

MASTRANGELO, E.; VACHETTE, P.; COSSU, F. *et al.* The activator of apoptosis Smac-DIABLO acts as a tetramer in solution. **Biophys J**, v.108, n.3, p. 714-723, 2015.

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

MATTICK, J.S.; MAKUNIN, I.V. Small regulatory RNAs in mammals. **Hum Mol Genet**, Spec No 1, R.121-132, 2005.

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**, 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**, 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.

MISHRA, P.J. MicroRNAs as promising biomarkers in cancer diagnostics. **Biomark Res**, eCollection 2014, doi: 10.1186/2050-7771-2-19, 2014.

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

MITTAL, S.; PANDEY, A.K. Cerium oxide nanoparticles induced toxicity in human lung cells: role of ROS mediated DNA damage and apoptosis. **Biomed Res Int**, v. 58, doi: 10.1155/2014/891934, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, n. 65, p. 55–63, 1983.

MOUSTAFA, I. M.; FOSTER, S.; LYUBIMOV, A. Y. *et al.* Crystal structure of laao from *Calloselasma rhodostoma* with an l-phenylalanine substrate: insights into structure and mechanism. **J. Mol. Biol.**, v. 364, p. 991–1002, 2006.

NAM, S.; WILLIAMS, A.; VULTUR, A. *et al.* Dasatinib (BMS-354825) inhibits Stat5 signaling associated with apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells. **Mol Cancer Ther**, v.6, p.1400-1405, 2007.

NAUMANN, G. B.; SILVA, L. F.; RICHARDSON, M. *et al.* Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochim Biophys.Acta.**, v. 1810, p. 683-694, 2011.

NESHAT, M.S.; RAITANO, A.B.; WANG, H.G. The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Baddependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf *et al.* **Mol Cell Biol**, v.20, n.4, p.1179–1186, 2000.

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

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

NICOLETTI, L.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M.C. *et al.* A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods**, v. 139, p. 271–279, 1991.

NUNES, C.; BARBOSA, M.R.L.; LARANJINHA, J: Nitric oxide and DOPAC-induced cell death: From GSH depletion to mitochondrial energy crisis. **Mol Cell Neurosci**, v. 48, p.94–103, 2011.

NUNES, E.S.; SOUZA, M.A.; VAZ, A.F. *et al.* Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**, v. 59, n.7-8, p. 667-671, 2012.

PARSONS M, GREEN D. Mitochondria in cell death. **Essays Biochem**, v. 47, p. 99–114, 2010.

PARSONS, M.; GREEN, D. Mitochondria in cell death. **Essays Biochem**, v. 47, p. 99–114, 2010.

PATEL, V.A.; LONGACRE, A.; HSIAO, K. *et al.* Apoptotic cells, at all stages of the death process, trigger characteristic signalling events that are divergent from and

dominant over those triggered by necrotic cells: implications for the delayed clearance model of autoimmunity. **J Biol Chem**, v. 281, p.4663-4670, 2006.

PAWELEK, P.D.; CHEAH, J.; COULOMBE, R. A. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. **Embo J**, v. 19, p. 4204-4215, 2000.

PEREGO, R.A.; COSTANTINI, M.; CORNACCHINI, G. The possible influences of B2A2 and B3A2 BCR/ABL protein structure on thrombopoiesis in chronic myeloid leukaemia. **Eur J Cancer**, v. 36, n.11, p.1395-1401, 2000.

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

PESSATTI, M.; FONTANA, J.D.; FURTADO, M.F. *et al.* Screening of Bothrops snake venoms for L-amino acid oxidase activity. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 51, p. 197–210, 1995.

PIEME, C.A.; GURU, SK.; AMBASSA, P. *et al.* Induction of mitochondrial dependent apoptosis and cell cycle arrest in human promyelocytic leukemia HL-60 cells by an extract from *Dorstenia silurus*: a spice from Cameroon. **BMC Complement Altern Med**; v.13, p.223-231. 2013.

PIŞKIN, O.; ÖZCAN, A.; ÖZSAN, H. *et al.* Synergistic effect of imatinib mesylate and fludarabine combination on Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia cell lines. **Turk J Hematol**, v. 24, p. 23-27, 2007.

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

POON, I.K.; HULETT, M.D.; PARISH, C.R. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. **Cell Death Differ**, v.17, p.381-397, 2010.

QUINTAS-CARDAMA, A.; CORTES, J.E. Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. **Mayo Clin Proc**, v. 81, n.7, p. 973–988, 2006.

RADICH, J.P. Chronic myeloid leukemia 2010: where are we now and where can we go? **Clin. Impact. Targeted Therapies in Myeloproliferative Neoplasms**, 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.**, v. 80, n.11, p. 1662-1675, 2010.

RAMENGHI, U.; BONISSONI, S.; MIGLIARETTI, G. *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**, 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**, v. 142, n.34, p. 328-346, 2006.

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

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

SALOMONI, P.; CONDORELLI, F.; SWEENEY, S.M. *et al.* Versatility of BCR/ABL-expressing leukemic cells in circumventing proapoptotic BAD effects. **Blood**, v. 96, n.2, p.676–684, 2000.

SAMEL, M.; VIJA, H.; RÖNNHOLM, G. *et al.* Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus* *berus* (common viper) venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1764, n. 4, p. 707–14, 2006.

SAN JOSE-ENERIZ, J.; ROMAN-GOMEZ, A.; JIMENEZ-VELASCO, L. *et al.* MicroRNA expression profiling in Imatinib-resistant Chronic Myeloid Leukemia patients without clinically significant ABL1-mutations. **Mol Cancer**, v.8, n.69, doi: 10.1186/1476-4598-8-69, 2009.

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

SCAFFIDI, C.; FULDA, S.; Srinivasan, A. *et al.* Two CD95 (APO-1 / Fas) signaling pathways. **EMBO J**, v. 17, p.1675–1687,1998.

SCORE, J.; CALASANZ, M.J.; OTTMAN, O. *et al.* Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR-ABL indicate distinct mechanisms of formation. **Leukemia**, v. 24, n. 10, p. 1742–1750, 2010.

SEE, V.; LOEFFLER, J.P. Oxidative stress induces neuronal death by recruiting a protease and phosphatase-gated mechanism, **J. Biol. Chem**, v. 276, p.35049–35059, 2001.

SHAMI, P.J.; DEININGER, M. Evolving treatment strategies for patients newly diagnosed with chronic myeloid leukemia: the role of second-generation BCR-ABL inhibitors as first-line therapy. **Leukemia**, v. 26, p. 214-24, 2012.

SHARMA, P.; KUMAR, L.; MOHANTY, S. *et al.* Response to Imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients with variant BCR-ABL fusion transcripts. **Ann Hematol**, v. 89, p.241–247, 2010.

SICARD, F.; GAYRAL, M.; LULKA, H. Targeting miR-21 for the Therapy ofPancreatic Cancer. **Mol Ther**, v. 21, n. 5, p. 986-994, 2013.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R. *et al.* A simple technique for quantitation of low-levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, v. 175, p.184-191, 1988.

SOUZA, D.H.; EUGENIO, L.M.; FLETCHER, J.E. *et al.* 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.

SOVERINI, S.; HOCHHAUS, A.; NICOLINI, F.E. *et al.* BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European Leukemia. Net. **Blood**, v. 118, n. 5, p.1208–1215, 2011.

SPINELLO, I.; QUARANTA, M.T.; RICCIONI R. *et al.* MicroRNA-146a and AMD3100, two ways to control CXCR4 expression in acute myeloid leukemias. **Blood Cancer J**, v.1, n. 6, doi: 10.1038/bcj.2011.24, 2011.

STARCZYNOWSKI, D.T.; MORIN, R.; MCPHERSON, A. *et al.* Genome-wide identification of human microRNAs located in leukemia-associated genomic alterations. **Blood**, v. 117, n. 2, p. 595-607, 2011.

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

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

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

THIENELT, C.D.; GREEN, K.; BOWLES, D.W. New and established tyrosine-kinase inhibitors for chronic myelogenous leukaemia. **Drugs Today (Barc)**, v. 48, p. 601–613, 2012.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D. *et al.* Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TIPPING, A.J.; MAHON, F.X.; ZAFIRIDES, G. *et al.* Drug responses of imatinib mesylate-resistant cells: synergism of imatinib with other chemotherapeutic drugs. **Leukemia**, v.16, p. 2349–2357, 2002.

TOHAMI, T.; NAGLER, A.; AMARIGLIO, N. Laboratory tools for diagnosis and monitoring response in patients with chronic myeloid leukemia. **Isr Med Assoc J**, v. 14, n. 8, p. 501-507, 2012.

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**, v. 278, p. 40097-104, 1997.

VAIDYA, S.; GHOSH, K.; VUNDINTI, B.R. Recent developments in drug resistance mechanism in chronic myeloid leukemia: a review. **Eur J Haematol**, v. 87, p. 381–93, 2011.

VAN ENGELAND, M.; NIELAND, L.J.; RAMAEKERS, F.C. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, p.1-9, 1998.

VAN LOON B, MARKKANEN E, HÜBSCHER U. Oxygen as a friend and enemy: how to combat the mutational potential of 8-oxoguanine. **DNA Repair**, v. 9, n. 6, p. 604-616, 2010.

VEGA-RUIZ, A.; KANTARJIAN, H.; SHAN, J. *et al.* Better molecular response to imatinib for patients (pts) with chronic myeloid leukemia (cml) in chronic phase (cp) carrying the b3a2 transcript compared to b2a2. **Blood**, v.110, Suppl.: abstract 1939, 2007.

VEJAYAN, J.; KHOON, T. L.; IBRAHIM, H. Comparative analysis of the venom proteome of four important Malaysian snake species. **J. Venom. Animals and Toxins:including Tropical Diseases**, v. 20, 2014.

VELDURTHY, A.; MICHAELA-PATZ, I.; HAGIST, S. The kinase inhibitor dasatinib induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro with preference for a subgroup of patients with unmutated IgVH genes. **Blood**, v. 12, n. 4, p. 1443-52, 2008.

VENTURINI, L.; BATTMER, K.; CASTOLDI, M. *et al.* Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia CD34+ cells. **Blood**, v.109, n. 10, p. 4399-405, 2007.

VERSCHRAEGEN, C.F.; KANTARJIAN, H.M.; HIRSCH-GINSBERG, C. *et al.* The breakpoint cluster region site in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. Clinical, laboratory, and prognostic correlations. **Cancer**, v. 76, n. 6, p. 992–997,1995.

WALLER, C.F. Imatinib mesylate. **Recent Results Cancer Res**, v.184, p.3-20, 2010.

WEISBERG, E.; MANLEY, P.W.; COWAN-JACOB, S.W. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. **Nat RevCancer**, v. 7, n.5, p.345–356, 2007.

WU, X.; MOLINARO, C.; JOHNSON, N. *et al.* Secondary necrosis is a source of proteolytically modified forms of specific intracellular autoantigens: implications for systemic autoimmunity. **Arthritis Rheum**, v.44, p. 2642–2652, 2001.

XIA, H.; YAMADA, S.; AOYAMA, M. *et al.* Prognostic impact of microRNA-145 downregulation in adult T-cell leukemia/lymphoma. **Human Pathology**, v.45, p. 1192–1198, 2014.

YANG, C.; CAI, J.; WANG, Q. *et al.* . Epigenetic silencing of miR-130b in ovarian cancer promotes the development of multidrug resistance by targeting colony-stimulating factor 1. **Gynecol Oncol**, v. 124, p. 325–34, 2012.

YENDAMURI, S.; CALIN, G.A. The role of microRNA in human leukemia: a review. **Leukemia**, v. 23, p. 1257–1263, 2009.

YEUNG, M.L.; YASUNAGA, J.; BENNASSER, Y. *et al.* Roles for MicroRNAs, miR-93 and miR-130b, and Tumor Protein 53–Induced Nuclear Protein 1 Tumor Suppressor in Cell Growth Dysregulation by Human T-Cell Lymphotropic Virus 1. **Cancer Res**, v. 68, n. 21, p. 8976-8985, 2008.

YING-TANG, H.; YI-HSUAN, H.; TZHY-CHYUAN, H. *et al.* Apoptosis-inducing active components from *Corbicula fluminea* through activation of caspase-2 and production of reactive oxygen species in human leukemia HL-60 cells. **Food Chem Toxicol**, v. 44, p.1261–1272, 2006.

YOULE. R.J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, p. 47–59, 2008.

ZHANG, L.; CUI, L. A cytotoxin isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom induces apoptosis via Fas pathway in A549 cells. **Toxicol In Vitro**, v. 21, p.1095-103, 2007.

ZHANG, L.; WEI, L. J. ACTX-8, a cytotoxic L-amino acid oxidase isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom, induces apoptosis in Hela cervical cancer cells. **Life Sci.**, v. 80, p. 1189-1197, 2007.

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

ZHANG, Q.Y.; MAOA, J-H.; LIUA, P. A systems biology understanding of the synergistic effects of arsenic sulfide and Imatinib in BCR/ABL-associated leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 9, p. 3378-83, 2009.

ZHANG, X.; HUANG, L.; ZHAO, Y. Downregulation of miR-130a contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells by targeting X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) directly. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 45, p. 995–1001, 2013.

ZHANG, Y.; HAO, Y.; SUN, Q. *et al.* Role of Smac in apoptosis of lung cancer cells A549 induced by Taxol. **Clin Lab**, v. 61, n.1-2, p.17-21, 2015.

ZHAO H, WANG D, DU W *et al.* MicroRNA and leukemia: tiny molecule, great function. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 74, n.3, p.149-155, 2010.

ZHAO, G.; ZHANG, J.G.; SHI, Y. MiR-130b is a Prognostic Marker and Inhibits Cell Proliferation and Invasion in Pancreatic Cancer through Targeting STAT3. **Plos One**, v. 8, n.9, eCollection 2013, 2013.

Referências Bibliográficas

ZHAO, J.M.; STARCZYNOWSKI, D.T. Role of microRNA-146 abnormal and malignant hematopoietic stem cell function. **Front Genet**, v.5, eCollection 2014, 2014.

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

ZULIANI, J.P.; KAYANO, A.M.; ZAQUEO, K.D. *et al.* Snake venom L-amino acid oxidases: some consideration about their functional characterization. **Prot & Pep. Lett**, v.16, n. 8, p. 908-12, 2009.

Apêndice 1.

Apêndice 1. Gel de RNA: gel de agarose 1 % corado com GelRed. Visualização das bandas 28 S e 18 S.

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

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

Of. CEP/FCFRP nº. 025/2012
kms

Ribeirão Preto, 15 de março de 2012.

À
Pós-graduanda Sandra Mara Burin
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fabíola Attié de Castro
FCFRP/USP

Prezada Pós-graduanda,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP **aprovou**, em sua 100^a Sessão Ordinária, realizada em 15/03/2012, o projeto de pesquisa intitulado "EFEITO DO VENENO BRUTO E DA L-AMINOÁCIDO OXIDASE DE BOTHROPS MOOJENI E CALLOSELASMA RHODOSTOMA NA MAQUINARIA APOPTÓTICA, EXPRESÃO DE MIRNAS E METILAÇÃO DO DNA NA LEUCEMIA MIELOÍDE CRÔNICA", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 243.

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

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe.

Atenciosamente,

PROF^ª. DR^ª. MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP

Anexo B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

Ribeirão Preto, 23 de março de 2012

Projeto de pesquisa: “Efeito do veneno bruto e da L-aminoácido oxidase de Bothrops moojeni e Calloselasma rhodostoma na maquinaria apoptótica, expressão de miRNAs e metilação do DNA na Leucemia Mielóide Crônica”

Pesquisadores responsáveis: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro (orientadora), Sandra Mara Burin (doutoranda)

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

“O CEP do HC e da FMRP-USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 196/96. Diante disso, o HCFMRP-USP, como instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas co-responsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos desta pesquisa, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar”.

Ciente e de acordo:

Dr^a Marcia Guimarães Villanova
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - HCFMRP-USP

Prof. Dr. José Alexandre de Souza Crippa
Coordenador da Unidade de Pesquisa
Clínica – UPC - HCFMRP-USP

1/1

HC - Campus Universitário
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA do HCFMRP-USP
(16) 3602-2228
cep@hcrp.fmrp.usp.br