

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

LORENA PINHEIRO MORAIS

POLLONEIN-LAAO: L-AMINOÁCIDO OXIDASE DE *Bothrops moojeni* INDUZ
MUDANÇAS NO EQUILÍBRIO REDOX EM UMA LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER
DE PRÓSTATA.

UBERLÂNDIA

2024

LORENA PINHEIRO MORAIS

Pollonein-LAAO: l-aminoácido oxidase de *Bothrops moojeni* induz mudanças no equilíbrio redox em uma linhagem celular de câncer de próstata.

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Coorientadora: Dra. Lorena Polloni

Uberlândia, 02 de maio de 2024.

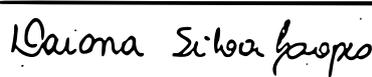
Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 VERIDIANA DE MELO RODRIGUES AVILA
Data: 07/05/2024 08:34:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila - Instituto de Biotecnologia -
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Documento assinado digitalmente
 SAMUEL COTA TEIXEIRA
Data: 07/05/2024 11:10:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Samuel Cota Teixeira- Instituto de Ciências Biomédicas -
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)



Profa. Dra. Daiana Silva Lopes - Instituto Multidisciplinar em Saúde-
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M827 2024	<p>Morais, Lorena Pinheiro, 2000- Pollonein-LAAO: l-aminoácido oxidase de Bothrops moojeni induz mudanças no equilíbrio redox em uma linhagem celular de câncer de próstata. [recurso eletrônico] / Lorena Pinheiro Moraes. - 2024.</p> <p>Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila. Coorientadora: Lorena Polloni. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em Biomedicina. Modo de acesso: Internet. Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Ciências médicas. I. Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues, 1971-, (Orient.). II. Polloni, Lorena, 1993-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Biomedicina. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 61</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me trouxe e me sustentou até aqui, me deu forças para enfrentar as batalhas e me presenteou com a inteligência e sabedoria. E agradeço mais ainda por Ele ter enchido os meus caminhos com todas essas pessoas maravilhosas citadas abaixo e muitas outras que inundaram a minha vida com muita felicidade e me inspiram a ser quem sou.

À minha orientadora, Prof.a Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila que me deu a oportunidade de estagiar no Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (LaBiTox) quando eu ainda estava iniciando a minha graduação e confiou em mim para colaborar neste projeto. Além disso, me orientou com muito empenho e compreensão ao longo de quase 3 anos de pesquisa que gerou 2 iniciações científicas, estágio supervisionado e meu tão sonhado Trabalho de Conclusão de Curso (TCC).

À minha coorientadora, Dra. Lorena Polloni, agradeço por ser tão maravilhosa como pessoa e como pesquisadora, que prontamente me acolheu no laboratório e me ensinou as diversas técnicas do laboratório e macetes dos experimentos. Uma gratidão imensa pela sua alegria contagiante que animava os dias de trabalho, pelas suas ideias que solucionaram diversos problemas e por ajudar sempre que a procurei, com muita paciência, sendo para mim um exemplo e referência em quem me espelhar. Obrigada pelas diversas experiências que pude vivenciar com sua pessoa, elas foram fundamentais na minha formação.

À minha segunda coorientadora, Dra. Tássia Rafaela Costa, agradeço por todo o apoio durante as semanas de purificação da Pollonein-LAAO. Sua dedicação foi imprescindível para que este e muitos outros trabalhos acontecessem de forma tão leve. Obrigada pelo carinhoso apelido “Flor do Campo” que esteve presente em muitas situações das quais você me ensinou a ter mais responsabilidade e me impulsionou a crescer como pessoa e pesquisadora. Agradeço pelos seus ensinamentos técnicos e pessoais, por me ensinar a lidar com as frustrações ao me deparar com a falha do experimento e por levar muita felicidade aos dias de trabalho.

À minha família, minha base, especialmente, aos meus pais, Lenamar e Adriel, por me darem a vida e por todo o incentivo e suporte financeiro e emocional que recebi. Obrigada pelos conselhos que contém tanta sabedoria, eles me ajudaram a permanecer no caminho certo. Sem vocês, meus amores, nada disso seria possível. Ao meu irmão, Felipe, que me proporciona um alívio da pressão da vida universitária, me estressando de outras maneiras (risos).

Aos meus amigos de graduação Izabella, Luís Guilherme, Rebecca e Welligton pela grande amizade que criamos, pelos trabalhos realizados, pelos aprendizados e por trazerem

leveza e alegria para os meus dias desde o começo do curso. Aos meus amigos de vida, Maria Verônica, Giovanna, Noemi e Júlia pela amizade de proporcionando risadas e reflexões que me motivam a continuar e ser a minha melhor versão

À coordenação e aos integrantes do LaBiTox por compartilharem suas vivências e conhecimentos durante o desenvolvimento de experimentos e pelos momentos de descontração. Em especial, agradeço ao Vinícius, Juliana, Emanuelle, Leonardo, Tianinha, Lucas e Ian que foram fundamentais para essa jornada.

À professora doutora Joyce Ferreira da Costa Guerra do Laboratório de Cultura de Células Animais (LACCA) do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, campus Patos de Minas pela colaboração neste trabalho. Ao Prof. Dr. Andreimar Martins Soares da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Rondônia) pela doação da peçonha de *Bothrops moojeni*.

À Fundação de Amparo do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Instituto de Biotecnologia (IBTEC) e Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

RESUMO

Neste estudo, exploramos o efeito citotóxico da Pollonein-LAAO, uma L-aminoácido oxidase isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*, sobre células de câncer de próstata (PC3), bem como investigamos sua capacidade de induzir estresse oxidativo por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e efeitos nos sistemas antioxidantes intracelulares. A citotoxicidade induzida pela Pollonein-LAAO em diferentes concentrações (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,09; 0,04 µg/mL) após 4 e 24 horas de tratamento foi analisada pelo ensaio de MTT e a dosagem de EROs foi realizada por ensaio de citometria de fluxo. As atividades de antioxidantes, como glutathiona total (GSH), glutathiona S-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD) foram analisadas visando compreender o papel da Pollonein-LAAO no sistema antioxidante das células tumorais. A Pollonein-LAAO nas diferentes concentrações avaliadas reduziu significativamente a viabilidade celular da linhagem PC3 (IC₅₀ 0,3142 µg/mL) após 24 horas de tratamento. Além disso, a Pollonein-LAAO (0,19 µg/mL) induziu estresse oxidativo através da geração de EROs após de 4 e 24 horas de tratamento. A Pollonein-LAAO (0,19 µg/mL) também diminuiu o nível de GSH total e aumentou a atividade da SOD. Os resultados deste estudo demonstram que a Pollonein-LAAO induziu estresse oxidativo e alterou as atividades dos sistemas antioxidantes da linhagem tumoral de câncer de próstata PC3, ocasionando a morte celular. Novos estudos são necessários para compreender melhor os mecanismos moleculares envolvidos no desequilíbrio redox induzido pela Pollonein-LAAO.

Palavras chaves: Câncer de próstata; EROs; Pollonein-LAAO.

ABSTRACT

In this study, we explored the cytotoxic effect of Pollonein-LAAO, an L-amino acid oxidase isolated from the venom of *Bothrops moojeni*, on prostate cancer cells (PC3), as well as investigating its ability to induce oxidative stress through the generation of reactive species of oxygen (ROS) and effects on intracellular antioxidant systems. The cytotoxicity induced by Pollonein-LAAO at different concentrations (50; 25; 12.5; 6.25; 3.125; 1.56; 0.78; 0.39; 0.19; 0.09; 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$) after 4 and 24 hours of treatment was analyzed by the MTT assay, and ROS levels were measured by flow cytometry. The activities of antioxidants, such as total glutathione (GSH), glutathione S-transferase (GST), and superoxide dismutase (SOD), were assessed to understand the role of Pollonein-LAAO in the tumor cell antioxidant system. Pollonein-LAAO at different concentrations significantly reduced the cell viability of PC3 cells (IC_{50} 0.3142 $\mu\text{g}/\text{mL}$) after 24 hours of treatment. Additionally, Pollonein-LAAO (0.19 $\mu\text{g}/\text{mL}$) induced oxidative stress through ROS generation after 4 and 24 hours of treatment. Pollonein-LAAO (0.19 $\mu\text{g}/\text{mL}$) also decreased the level of total GSH and increased SOD activity. The results of this study demonstrate that Pollonein-LAAO induced oxidative stress and altered the activities of antioxidant systems in the PC3 prostate cancer cell line, resulting in cell death. Further studies are needed to better understand the molecular mechanisms involved in the redox imbalance induced by Pollonein-LAAO.

Keywords: Prostate cancer; Pollonein-LAAO; ROS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - As marcar do câncer	17
Figura 2 - Fontes de produção de espécies reativas de oxigênio	19
Figura 3 - Relação do balanço REDOX e sobrevivência celular	21
Figura 4 - Sistema Glutaciona	23
Figura 5 - Reação catalítica de L-aminoácido oxidases e ação sobre sistemas antioxidantes .	26
Figura 6 - Purificação da Pollonein-LAAO	38
Figura 7 - Viabilidade de células PC3 tratadas com Pollonein-LAAO	39
Figura 8 - Viabilidade de células PC3 tratadas com Pollonein-LAAO e Catalase	39
Figura 9 - Quantificação dos níveis de EROs por citometria de fluxo	40
Figura 10 - Atividade da Glutaciona (GSH)	41
Figura 11 - Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	42
Figura 12- Atividade da Glutaciona Transferase (GST)	42

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo da Atividade Específica da Glutathione Transferase.....	35
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento proteico (%) e atividade enzimática (U.mg/min) das frações obtidas das etapas cromatográficas de purificação da Pollonein-LAAO.....	37
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFCAB61	Acesso aos Recursos Genéticos e aos Conhecimentos Tradicionais Associados
ASK1	Quinase 1 sinalizadora de apoptose
Bcr-Abl	Proteína de fusão Bcr-Abl
Bcr-Abl+	Linhagem celular de leucemia Ph positivo
BRCA1	BReast CAncer gene 1
CaP	Câncer de próstata
CASP8	Caspase 8
CAT	Catalase
CDBN	3-carboxi-4-nitrobenzenoarsonato de dimetilo
CDK2	Quinase dependente de ciclina 2
CDKN1A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A
CGEN	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
CGEN	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CollinLAAO-I	L-aminoácido oxidase de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>
CR-LAAO	L-aminoácido oxidase de <i>Calloselasma rhodostoma</i>
CTE	Cadeia de transporte de elétrons
DISC	Complexo sinalizador de indução de morte
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (DMSO)
DTNB	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ou ácido etilenodiamino tetra-acético
E2FDe	Fator de transcrição E2F
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
Fe ²⁺	Íon ferroso
Fe ³⁺	Íon férrico
FLIP-L	Proteína inibitória do ativador de caspase de comprimento total
Globocan	<i>Global Cancer Observatory</i>
GPX	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
GSH	Glutathiona
GST	Glutathiona S-transferase

H ₂ DCF-DA	Dihidro-diclorofluoresceína diacetato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Iarc	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IC50	Concentração inibitória 50%
ITGA2	Integrina alfa-2
ITGAV	Integrina alfa-V
ITGB3	Integrina beta-3
JNK	c-Jun quinase N-terminal
kDa	Quilodalton
KEAP1	Complexo de proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch
LAAO	Enzima L-aminoácido oxidase
MMP2	Metaloproteinase de matriz 2
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NFR2	Fator nuclear eritroide 2-relacionado ao fator 2
Nh-LAAO	L-aminoácido oxidase de <i>Naja haje</i>
nm	Nanômetro
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH ⁻	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Ortofenilenodiamina ou dicloridrato de o-fenilenodiamina
P53	Proteína p53
PAGE-SDS	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
PC12	Linhagem celular de feocromocitoma
PC3	Células de câncer de próstata
PSA	antígeno prostático específico
PTEN	Fosfatase e tensina homóloga
RAS	Gene da família de proteínas GTPases
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SISBIO	Sistema de Informações sobre Biodiversidade Brasileira
SNAIL	Proteína Snail homóloga 1
SOD	Superóxido dismutase
SV-LAAOs	<i>Snake Venom- L-aminoácido oxidases</i>
TNB	2-nitrobenzoato de tiol
TNFRSF10B	Receptor do fator de necrose tumoral 10B
TP53	Proteína p53
UNIR	Universidade Federal de Rondônia
VIM	Vimentina
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Câncer de próstata no contexto epidemiológico	14
1.2 Etiologia das células cancerígenas	15
1.3 Espécies Reativas de Oxigênio e Sistemas Antioxidantes	18
1.4 LAAOs: Aspectos bioquímicos e funcionais	25
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos específicos	29
4. METODOLOGIA	30
4.1 Peçonha bruta.....	30
4.2 Isolamento da Pollonein-LAAO	30
4.2.1 Análise da homogeneidade da Pollonein-LAAO por SDS-PAGE.....	31
4.2.2 Determinação da atividade L-aminoácido oxidase	31
4.3 Cultivo das células	32
4.4 Ensaio de viabilidade celular por MTT.....	32
4.5 Ensaio de viabilidade e Co-tratamento com Catalase	32
4.6 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	33
4.7 Quantificação de Enzimas Antioxidantes	33
4.7.1 Glutathiona Total (GSH).....	34
4.7.2 Glutathiona S Transferase (GST).....	34
4.7.3 Superóxido Dismutase (SOD).....	35
4.8 Análise Estatística	35
5. RESULTADOS.....	37
5.1 Purificação da Pollonein-LAAO e atividade enzimática	37
5.2 Análise da Viabilidade Celular	38
5.3 Quantificação de EROs	39
5.4 Quantificação enzimática dos sistemas antioxidantes.....	40
6. DISCUSSÃO.....	43
7. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de próstata no contexto epidemiológico

O câncer é uma condição complexa que abrange uma diversidade de doenças. O surgimento de células cancerosas está relacionado com a alterações genéticas que levam ao crescimento descontrolado e desregulado das células, formando massas de tecido conhecidas como tumores. Essas alterações genéticas podem ser desencadeadas por diversos fatores, incluindo exposição a carcinógenos ambientais, mutações hereditárias ou instabilidade genômica (Stratton et al., 2009; Tomasetti et al., 2017).

Um aspecto crucial do câncer é sua capacidade de evadir dos mecanismos normais de controle do crescimento celular e, assim, proliferar rapidamente. Além disso, as células cancerosas têm a capacidade de invadir os tecidos circundantes, penetrando na corrente sanguínea ou linfática, e se disseminar para outras partes do corpo, processo conhecido como metástase (Tomasetti et al., 2017; Fubert et al., 2020).

Durante a metástase, as células cancerosas se adaptam a novos ambientes e interagem com o microambiente local para promover o crescimento tumoral em locais distantes. Esse estágio é uma das principais causas de morte em pacientes com câncer, conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS, *World Health Organization*, 2022). As estimativas mais recentes, realizadas pelo Observatório Global de Câncer (do inglês-Globocan, *Global Cancer Observatory*) da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (do inglês – Iarc, *International Agency for Research on Cancer*), apontam aproximadamente 10 milhões de mortes relacionadas ao câncer, com uma incidência de 19,3 milhões de casos em todo o mundo. Dessa forma, a doença é a principal causa de morte mundial (Ferlay et al., 2024).

Na população masculina, o câncer de próstata (CaP) é uma preocupação significativa, classificando-se como o segundo tipo de câncer mais comum, logo atrás do câncer de pulmão, que possui uma incidência de 14,8%. O câncer de próstata apresenta uma alta taxa de incidência, atingindo 14,2%, o que equivale a aproximadamente 1,46 milhões de novos casos e resultando em mais de 397 mil mortes em todo o mundo somente em 2022. As projeções indicam um aumento desses números, prevendo-se um total de 2,9 milhões de casos anualmente até 2024 (Ferlay et al., 2024; James et al., 2024). Esta tendência alarmante destaca a importância de medidas de prevenção, detecção precoce e desenvolvimento contínuo de tratamentos eficazes para combater essa doença.

A próstata, uma glândula exclusiva do sistema reprodutor masculino, está localizada abaixo da bexiga urinária e envolve a parte inicial da uretra masculina. Suas secreções, representando até um quarto do volume do sêmen, desempenham um papel crucial na movimentação e funcionalidade dos espermatozoides, fornecendo-lhes energia e proteção contra microrganismos e o ambiente ácido de trato reprodutor feminino (Tortora, 2016).

O diagnóstico do câncer de próstata pode ser realizado através de exames como a dosagem do antígeno prostático específico (PSA) no sangue e o exame de toque retal para detecção de possíveis anormalidades na glândula. A confirmação do diagnóstico geralmente é feita por meio de biópsia prostática (INCA, 2023).

É importante notar que a expectativa de vida para pacientes diagnosticados precocemente com câncer de próstata localizado é extremamente alta, com uma taxa de sobrevivência superior a 99% em 10 anos (James et al., 2024). No entanto, o principal desafio no manejo da doença é representado pelos casos diagnosticados em estágios mais avançados, especialmente os casos metastáticos. Homens com câncer de próstata metastático enfrentam uma taxa de sobrevivência de apenas 30% em 5 anos (James et al., 2024), destacando a necessidade urgente de estratégias de diagnóstico precoce e tratamento mais eficazes para essa condição.

O câncer de próstata é considerado um complexo problema de saúde mundial, pela dificuldade encontrada para distinguir tumores indolentes dos agressivos. Desse modo, pesquisas direcionadas para compreensão biológica desta doença são de suma importância na busca de conhecimentos sobre o progresso da doença, no desenvolvimento de tratamentos eficazes e resultados clínicos mais efetivos (Rebello et al., 2021).

1.2 Etiologia das células cancerígenas

A iniciação tumoral é um processo caracterizado pela transformação gradual de uma célula normal em uma célula com fenótipo cancerígeno. Esse processo é impulsionado por uma série de mutações genéticas, instabilidade genômica e alterações epigenéticas, influenciadas por uma variedade de fatores como herança genética, estilo de vida, exposição a radiação, poluição ambiental e possíveis doenças infecciosas ou inflamatórias (Pradhan et al., 2024).

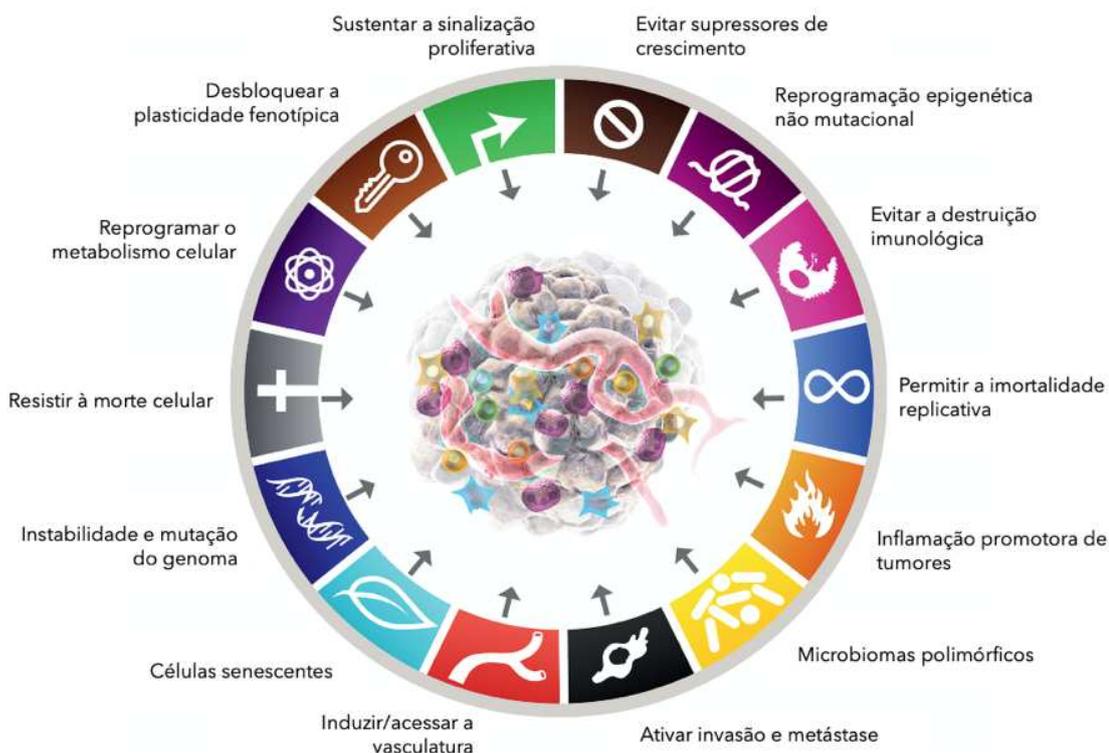
Essas mutações desencadeiam a proliferação descontrolada das células, resultando em um fenótipo neoplásico ou tumoral, o qual pode inicialmente apresentar comportamento tanto benigno quanto maligno. A malignidade é determinada pela capacidade do tumor de se espalhar para outras partes do corpo, um processo conhecido como metastatização, e essa condição é clinicamente identificada como câncer (Cooper, 2000).

Posteriormente, ocorre a seleção clonal, um processo no qual os clones celulares mais adaptados para sobreviver e proliferar são selecionados. Isso resulta na formação de uma massa tumoral heterogênea, composta por subpopulações de células que impulsionam a progressão do tumor (Cooper, 2000; Burrell et al., 2013; Biswas et al., 2021). Vale ressaltar que essa heterogeneidade é influenciada pelas mutações genéticas individuais de cada célula tumoral e pelas diversas condições presentes no microambiente tumoral (Pandkar et al., 2021).

Fatores como os níveis variáveis de hipóxia, pH, glicose e espécies reativas de oxigênio (EROs) contribuem para essa heterogeneidade. Além disso, a plasticidade fenotípica das células tumorais também desempenha um papel importante, conferindo maior agressividade ao tumor (Policastro et al., 2013; Biswas et al., 2021). Esses elementos combinados contribuem para a complexidade e a adaptabilidade do câncer, tornando-o um desafio significativo no contexto clínico e terapêutico.

A transição para o fenótipo maligno é marcada por uma série de alterações fisiológicas conhecidas como "marcas do câncer", identificadas por Hanahan e colaboradores (2000, 2011 e 2022). Essas características abrangem uma gama de processos biológicos, incluindo autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais inibidores de crescimento (anticrescimento), resistência à morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual, metástase, instabilidade genômica e mutações, inflamação, evasão da destruição imune, plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos e células senescentes, bem como a desregulação do metabolismo energético celular (Hanahan e Weinberg, 2000; Hanahan et al., 2011; Hanahan, 2022) (Figura 1). Essas alterações são cruciais para o desenvolvimento, progressão, complexidade e resistência das células malignas aos tratamentos convencionais.

Figura 1 - As marcas do câncer



Legenda: Fatores que caracterizam o fenótipo de células cancerígenas. Fonte: Adaptado de Hanahan, 2022.

Dentre as principais modificações genéticas encontradas nas células neoplásicas que contribuem para a heterogeneidade tumoral, destacam-se várias alterações fundamentais. Primeiramente, a mutação do gene BRCA1 (BREast CANcer gene 1) pode desempenhar um papel crucial no desenvolvimento de certos tipos de câncer, especialmente câncer de mama e ovário, devido ao seu papel na reparação do DNA e na manutenção da integridade genômica (Martins et al., 2012). Mutações em oncogenes, como o gene RAS, podem resultar na ativação de vias de sinalização que promovem o crescimento celular descontrolado. Em contrapartida, a inativação de genes supressores de tumor, como os genes P53 (TP53 ou proteína de tumor) e PTEN (Proteína homóloga de tensina e fosfatase), por mutações pode remover importantes mecanismos de controle do ciclo celular e da apoptose (Biswas et al., 2021).

Além disso, outros tipos de mutações como os rearranjos cromossômicos e ampliações genéticas podem causar mudanças estruturais e numéricas no DNA, afetando a expressão de genes-chave para a regulação do crescimento e da proliferação celular. Da mesma forma, as deleções genéticas podem levar à perda de segmentos do DNA contendo genes supressores de tumor, aumentando a instabilidade genômica o que estimula a progressão tumoral. Também sabe-se que, mutações em genes de reparo do material genético

comprometem a capacidade das células de corrigir erros no DNA, levando à acumulação de mutações e contribuindo para a heterogeneidade observada em muitos cânceres. Essas modificações genéticas frequentemente resultam em subpopulações de células tumorais com características distintas dentro de um mesmo tumor, tornando o tratamento da doença um desafio significativo (Biswas et al., 2021; Hanahan, 2022).

Por fim, danos no DNA desencadeados pela ação das espécies reativas de oxigênio (EROs) representam outro mecanismo importante na carcinogênese. Essas moléculas altamente reativas são capazes de causar danos diretos ao material genético, resultando em mutações genéticas que podem impulsionar o desenvolvimento do câncer. A ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumores são eventos-chave nesse processo, contribuindo para a aquisição de características malignas pelas células. Compreender esses mecanismos é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento mais eficazes contra o câncer, visando a redução do estresse oxidativo e a preservação da integridade do genoma celular.

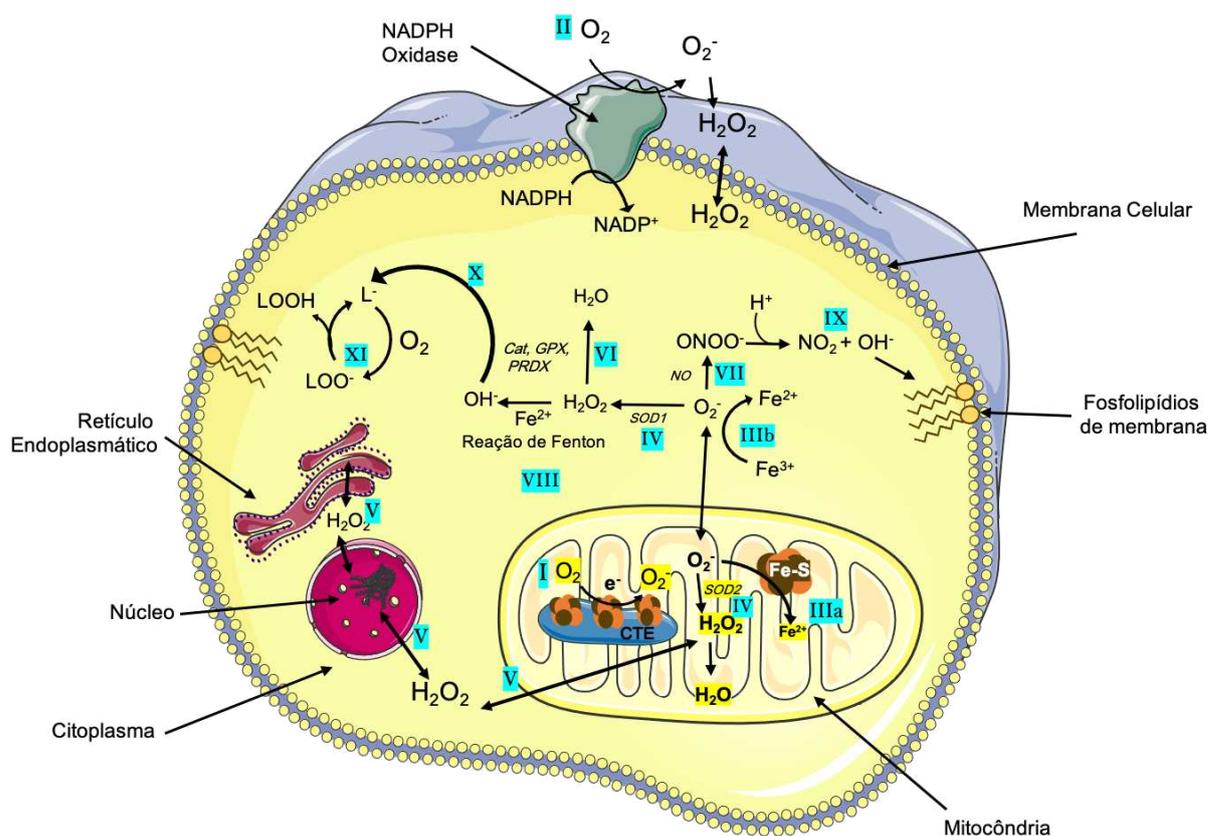
1.3 Espécies Reativas de Oxigênio e Sistemas Antioxidantes

As EROs compreendem um conjunto heterogêneo de íons e moléculas altamente reativas que se originam do oxigênio molecular (O_2) (Schieber e Chandel, 2014). Entre as EROs mais relevantes com importância fisiológica, estão os radicais livres, como o radical hidroxila ($OH\cdot$) e o ânion superóxido (O_2^-), além de moléculas não radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Auten e Davis, 2009).

Os principais eventos moleculares responsáveis pela geração de EROs e sistemas antioxidantes no ambiente celular estão representados na Figura 2. Resumidamente, esses eventos podem iniciar-se com a atividade da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (CTE) (I) e da enzima NADPH oxidase presente na membrana plasmática (II), que é a principal fonte de superóxido (O_2^-). Nas mitocôndrias, o superóxido atinge os aglomerados de ferro-enxofre (Fe-S) presentes nas proteínas dos complexos proteicos I e II da CTE promovendo a liberação do íon ferroso (Fe^{2+}) (IIIa), no citoplasma o íon férrico (Fe^{3+}) pode ser reduzido a íon ferroso pelo O_2^- (IIIb). A enzima superóxido dismutase (SOD1, SOD2) converte o O_2^- em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (IV). Este último difunde-se (V) através das membranas celulares, onde pode reagir com proteínas e DNA. A detoxificação do H_2O_2 em água (VI) é realizada por peroxidases celulares, como catalase (Cat), glutathiona peroxidase (GPX) e

peroxirredoxinas (PRDX). O O_2^- também pode reagir com óxido nítrico (NO) para produzir peroxinitrito ($ONOO^-$) (VII). Pela reação de Fenton (VIII) o H_2O_2 reage com o íon Fe^{2+} formando o radical hidroxila (OH^\cdot), que também é formado pela decomposição do peroxinitrito $ONOO^-$ (IX), iniciando a cascata de peroxidação lipídica (X). Esses processos envolvem a formação de radicais lipídicos (L), que por sua vez, reagem com o oxigênio para gerar radicais peróxidos lipídicos (LOO^\cdot) (XI) (Harris et al., 2020).

Figura 2 - Fontes de produção de espécies reativas de oxigênio



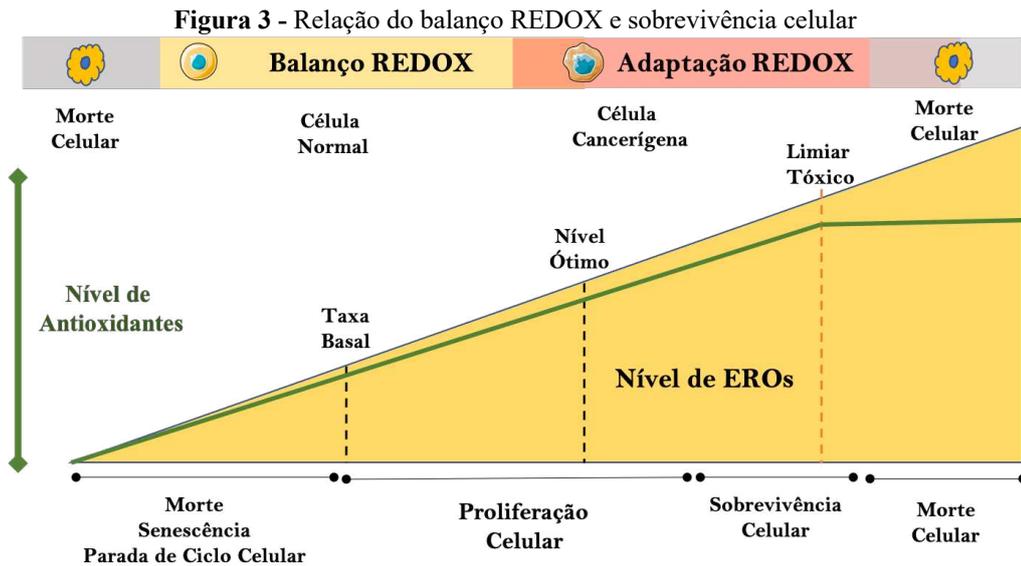
Legenda: A produção de superóxido ocorre principalmente na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (I) e na enzima NADPH oxidase (II). Nas mitocôndrias, o superóxido reage com aglomerados de ferro-enxofre, liberando o íon Fe^{2+} (IIIa). No citoplasma o superóxido reage com íon férrico formando o íon Fe^{2+} (IIIb). A enzima superóxido dismutase converte o superóxido em peróxido de hidrogênio, que pode reagir com proteínas e DNA (IV e V). A detoxificação do peróxido de hidrogênio é realizada por enzimas como a catalase (VI) e a glutatona peroxidase (VI). O H_2O_2 também reage com o íon Fe^{2+} formando o radical hidroxila (OH^\cdot) (VIII). O superóxido também pode reagir com o óxido nítrico, gerando peroxinitrito (VII), iniciando a peroxidação lipídica (IX, X, XI).
Fonte: Adaptado de Harris et al., 2020.

As EROs possuem um papel biológico complexo e paradoxal (Galadaria, et al., 2017). Essas espécies estão envolvidas em diversos processos biológicos cruciais como proliferação,

diferenciação, apoptose, angiogênese, resposta imune para manter a homeostase celular (Fruehauf e Meyskens, 2007). Entretanto, também são associadas a várias condições patológicas, como diabetes mellitus, aterosclerose, doenças cardiovasculares e principalmente no câncer (Schieber e Chandel, 2014).

No contexto do câncer, há um desequilíbrio do estado de redução-oxidação (redox) intracelular, causado pela diferença quantitativa entre a produção dos EROs e a capacidade dos sistemas antioxidantes celulares em transformar esses produtos altamente reativos em compostos menos reativos (Toyokuni, 1995; Panieri e Santoro., 2016). Elevadas concentrações de EROs nas células neoplásicas resultam em estresse oxidativo, o qual está associado à aquisição e progressão do fenótipo metastático. Isso ocorre devido à ativação de oncogenes uma vez que há um aumento do dano ao DNA e às estruturas celulares, promovendo a instabilidade genômica que, por sua vez, contribui para a agressividade do tumor e gera um ciclo de progressão da malignidade do câncer (Panieri e Santoro, 2016; Moloney et al., 2017; Movahed et al., 2019).

De modo geral, a presença dessas espécies em baixas quantidade ativam vias de sinalização favoráveis e fundamentais para a sobrevivência da células. Entretanto, é fundamental reconhecer que as EROs desempenham papéis duplos, tanto pró-tumorigênicos quanto anti-tumorigênicos. Por um lado, os níveis aumentados de EROs, provocados pelo aumento do metabolismo energético estimulam a proliferação, evasão da apoptose, angiogênese e metástase das células cancerígenas (Panieri e Santoro, 2016). Por outro lado, o aumento demasiado dos níveis de EROs geram uma sobrecarga excessiva dos sistemas antioxidantes celulares, assim o limiar citotóxico é ultrapassado e pode haver a ativação das vias de apoptose extrínseca e intrínseca, promovendo um papel de supressão tumoral (Figura 3) (Policastro et al., 2013; Galadari et al., 2017; Snezhkina et al, 2019; Wang et al., 2021; Polloni et al., 2023; Zhong et al., 2024).



Legenda: As adaptações celulares conforme o nível de EROs e nível dos sistemas antioxidantes celulares. Em baixos níveis de EROs a célula sofre parada de ciclo celular ativando mecanismos de senescência e morte celular. O aumento das EROs é acompanhado pelo aumento dos antioxidantes celulares até que atinjam níveis ótimos, onde há proliferação celular devido a sinalização celular promovida pelas EROs. Após o limiar tóxico, os sistemas antioxidantes atingem o seu máximo e a modulação do mesmo não é capaz de manter a homeostasia redox celular o que culmina com a morte da célula. Fonte: autoria própria.

Para que as EROs desempenhem um papel pró-tumoral, os principais sistemas antioxidantes dentro das células cancerosas podem passar por modificações para que as células se adaptem melhor ao ambiente oxidativo. Por exemplo, altos níveis de EROs podem levar à oxidação do KEAP1 (Complexo de proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch) e à liberação do NRF2 (fator nuclear 2 relacionado ao eritróide 2) que migra para o núcleo, onde ativa a transcrição de enzimas que participam da produção da glutathiona, como a glutathiona S-transferase (GST), que compõe o principal sistema antioxidante das células (Gorrini et al., 2013).

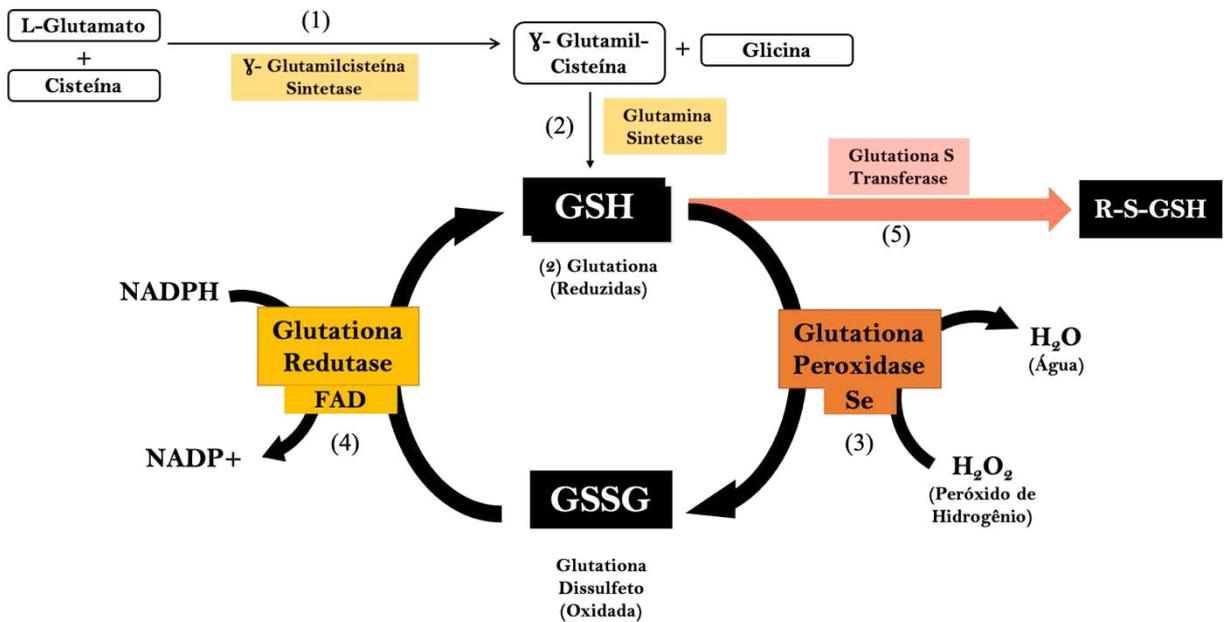
Entretanto, a produção excessiva de EROs, de forma que essa regulação positiva dos sistemas antioxidantes não seja suficiente para manter o equilíbrio redox, ocorre a ativação de vias apoptóticas a fim de desencadear morte celular controlada. Por exemplo, as EROs podem ativar a quinase 1 sinalizadora de apoptose (ASK1), que por sua vez promove a ativação da JNK (c-Jun quinase N-terminal), desencadeando a cascata apoptótica com a liberação de citocromo-C pela mitocôndria. Além disso, observa-se a destruição do FLIP-L pelo aumento de sua ubiquitinação, impedindo sua ação antiapoptótica, pois ele evita a ligação da caspase 8 com o complexo II para inibir a formação do DISC (Complexo sinalizador de indução de morte) (Circu et al., 2010).

Logo, observa-se que o conjunto de antioxidantes celular é fundamental para a sobrevivência celular. Dentre eles, o principal e mais abundante é o sistema glutaciona. Ele é constituído pela glutaciona (GSH) um tripéptido composto por cisteína, ácido glutâmico e glicina, cujo primeiro passo para sua síntese é a formação de um dipeptídeo intermediário, conhecido como γ -glutamilcisteína, catalisado pela enzima γ -glutamilcisteína sintetase. Em seguida, a glicina é adicionada à γ -glutamilcisteína pela enzima glutaciona sintetase, formando o tripeptídeo completo, a glutaciona (Figura 4) (Huber et al., 2008).

A glutaciona desempenha um papel crucial na defesa antioxidante do organismo, atuando como um agente redutor e neutralizando radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio. Sua síntese é um processo bioquímico essencial para a manutenção da homeostase celular e a proteção contra estresse oxidativo, desempenhando um papel crucial na saúde e no funcionamento adequado do organismo (Huber et al., 2008).

O sistema glutaciona é composto pelas enzimas: glutaciona peroxidase (GSH-Px) que é responsável por catalisar a quebra do H_2O_2 em água através da oxidação da GSH a glutaciona oxidada ou dissulfeto (GSSG); glutaciona redutase (GR), que catalisa a reação de redução da GSSG em GSH através da oxidação do NADPH a NAD^+ ; e glutaciona S-transferase (GST), que catalisa a reação de conjugação da glutaciona a outros compostos, tornando-os mais hidrossolúveis, processo muito importante na destoxificação de compostos xenobióticos. Essas enzimas participam do ciclo da glutaciona promovendo o balanço dos níveis de glutaciona reduzida (GSH) e glutaciona oxidada ou dissulfeto, processo fundamental para o equilíbrio redox da célula (Figura 4) (Huber et al., 2008).

Figura 4 - Sistema Glutationa



Legenda: (1) A enzima γ -glutamylcisteína sintetase catalisa a junção do L-glutamato com a cistina formando a γ -glutamylcisteína. (2) Em seguida, a glicina é adicionada à γ -glutamylcisteína pela enzima glutaciona sintetase, formando o tripeptídeo completo, a glutaciona. (3) a Glutaciona Peroxidase utiliza o Selênio presente em sua estrutura para reduzir o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxidar a GSH, formando a glutaciona dissulfeto (GSSG). A glutaciona redutase é a responsável por restaurar a GSH ao reduzir a glutaciona oxidada, utilizando para isso um NADPH. Se- Selênio, mineral constituinte da GSH-Px; FAD-Dinucleotídeo Flavina Adenina, cofator da GR. Fonte: Autoria própria.

Ainda no contexto das GST, temos que essa família de proteínas desempenha outro papel crucial: a regulação de vias de sinalização ativadas por estresse, processo fundamental para as adaptações celulares que ocorrem nas células cancerígenas (Huber et al., 2008). Como exemplo, a proteína GSTP1 interage com a JNK sob condições de estresse oxidativo, resultando na dissociação do complexo GSTP1-JNK, permitindo a fosforilação da JNK e a dimerização da GSTP1, que modula as vias de sinalização da JNK para sobrevivência celular ou apoptose, e tem um papel na inibição da ativação de Akt e mTOR, duas proteínas-chave envolvidas em vias de sinalização que controlam o crescimento, proliferação e sobrevivência celular de modo dependente do nível de EROs. Além disso, a GSTP1 pode realizar modificações pós-traducionais ao conjugar a GSH aos grupos tióis dos sítios de cisteína de múltiplas proteínas, incluindo fatores de transcrição, oncogenes e supressores tumorais como a P53, sob condições fisiológicas normais e sob condições de estresse onde tem um papel protetor (Singh et al., 2021).

Outros sistemas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), assim como as enzimas envolvidas na manutenção desses sistemas, podem ser aumentados para

ajudar a neutralizar o excesso de EROs (Hayes et al., 2020; Harris et al., 2020). Essas adaptações metabólicas são essenciais para a sobrevivência das células tumorais, permitindo-lhes resistir ao estresse oxidativo e manter a proliferação descontrolada.

A superóxido dismutase (SOD) apresenta três formas distintas: SOD1, também conhecida como cobre/zinco (Cu/ZnSOD), é a principal forma intracelular, representando 80% da proteína total de SOD. Ela está presente em toda a célula, incluindo no espaço intermembranar mitocondrial e no núcleo. Por sua vez, o SOD de manganês (MnSOD ou SOD2) é exclusivamente encontrado na matriz mitocondrial, enquanto o SOD extracelular (ecSOD ou SOD3), também um Cu/ZnSOD, é secretada e associada à matriz extracelular. Essa distribuição é notável em células normais e cancerígenas. Além de catalisar a dismutação do superóxido (O_2^-), uma EROs altamente reativa, em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a SOD1 regula os níveis de H_2O_2 , estabelecendo um limiar para sinalização mitogênica, como a sinalização do receptor tirosina quinase (RTK), que determina a taxa de proliferação celular (Che et al., 2016).

A catalase é uma enzima ferriheme que desempenha um papel crucial na remoção de altas concentrações de H_2O_2 através de sua dismutação em oxigênio (O_2) e água (H_2O). Esse processo envolve a oxidação da catalase em um intermediário hipervalente de ferro, que posteriormente é reduzido de volta ao estado de repouso por uma segunda molécula de H_2O_2 . Existem três tipos de catalases, classificados com base em sua estrutura e função: catalases típicas, catalase-peroxidases e catalases de manganês. A catalase humana pertence ao grupo das catalases típicas e é composta por quatro pequenas subunidades (62 kDa), com uma protoporfirina IX férrica no centro ativo (heme b) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como cofator (Galasso et al., 2021).

Apesar do peróxido de hidrogênio ser considerado pouco reativo, controlar sua produção é essencial, uma vez que pode modificar a atividade de proteínas envolvidas na sinalização celular por meio da oxidação dos grupos tióis das cisteínas. Além disso, o peróxido de hidrogênio pode se difundir através dos canais de aquaporina das membranas das organelas, exercendo sua ação à distância do seu local de produção, e reagir com o íon ferroso (Fe^{2+}) do meio pela reação de Fenton, liberando hidroxilas (OH^-) altamente reativas e danosas para a célula (Kiley e Storz, 2004; Che et al., 2016; Galasso et al. 2021).

Diante das informações mencionadas sobre as espécies reativas de oxigênio, sua geração e dinâmica nas células cancerígenas, torna-se evidente que elas representam um alvo terapêutico de grande importância, especialmente no que diz respeito à ativação das vias de

morte celular ao superar os níveis citotóxicos do balanço redox (Moloney et al., 2017). Nesse contexto, é importante destacar a relevância da utilização de compostos bioativos capazes de gerar espécies reativas de oxigênio em linhagens tumorais, como as enzimas L-aminoácido oxidases (LAAOs) encontradas em diversos organismos. A atividade enzimática dessas LAAOs resulta na produção de EROs, que por sua vez podem modular diversas respostas celulares. Dessa forma, o estudo dessas enzimas contribui para uma compreensão mais ampla dos mecanismos relacionados ao estresse oxidativo e seu impacto nas células cancerígenas.

1.4 LAAOs: Aspectos bioquímicos e funcionais

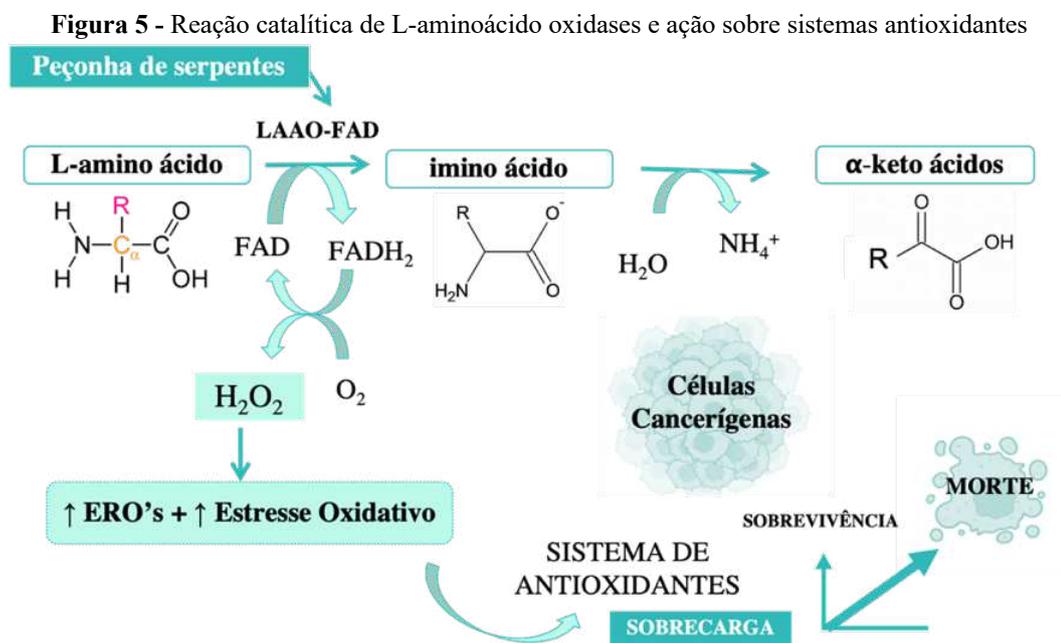
As LAAOs são flavoproteínas glicosiladas com estrutura dimérica na qual cada subunidade faz uma ligação não covalente com a flavina mononucleotídeo (FMN) ou com a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), que é a responsável pela cor amarela da toxina (Costa et al., 2014). As LAAOs são, portanto, classificadas como oxirredutases FAD-dependentes e possuem atividade de deaminação oxidativa estereoespecífica de L-aminoácidos gerando como produtos α -cetoácidos, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e amônia.

Ullah e colaboradores (2020) revisaram os aspectos estruturais e funcionais de LAAOs, onde de modo geral estas são glicoproteínas cujas massas moleculares variam de 120 a 150 kDa na forma nativa em dímero e em sua forma desnaturada (monômero) variam de 55 a 66 kDa. O pI dessas enzimas variam de 4,4 a 8,0. Estas são enzimas estáveis quando mantidas em temperatura ambiente (25°C) ou 4°C, entretanto, a exposição à baixa (~5°C) por longo período inativa essas enzimas. Essas enzimas estão presentes em uma diversidade de organismos como serpentes, caramujos de conchas cônicas, fungos e bactérias (Tan et al., 2018).

As SV-LAAOs (*Snake Venom- L-aminoácido oxidases*) demonstram uma ampla gama de efeitos farmacológicos, incluindo indução de hemorragia e edema (Gutiérrez et al., 2016), bem como inibição de agregação plaquetária (Serrano, 2013). Essas enzimas têm sido extensivamente estudadas por seu potencial terapêutico. Por exemplo, a BmooLAAO-I, isolada de *Bothrops moojeni*, e a BjussuLAAO-II, de *B. jararacussu*, exibiram atividade bactericida e destruidora de biofilmes contra cepas patogênicas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Fernandes et al., 2024). A CR-LAAO de *Calloselasma rhodostoma* demonstrou atividade antiparasitária contra espécies de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* e a BjussuLAAO-II demonstrou potencial contra infecção de *Toxoplasma gondii* (Costa et al., 2015; Ghisla et al., 2016; Fernandes et al., 2023), enquanto a CollinLAAO-I, isolada de *Crotalus durissus*

collilineatus, também mostrou atividade leishmanicida (Freitas et al., 2023). A LAAO de *B. atrox* apresentou atividade antitumoral sobre diferentes linhagens celulares como HL60, Jurkat, B16F10 e PC12 (Alves et al., 2008), bem como a CR-LAAO que exibiu potencial antitumoral, sendo citotóxica contra as linhagens HepG2 e HL-60 (Costa et al., 2015).

Essas enzimas possuem um potencial antitumoral devido a sua capacidade gerar EROs que podem ativar as vias de apoptose em diversas linhagens celulares cancerígenas (Sun et al., 2003; Alves et al., 2008; Lee et al., 2014; Costa et al., 2017; Polloni et al., 2023). Logo, a utilização dessas enzimas como ferramenta biotecnológica para o tratamento de cânceres deve ser explorada, a fim de evidenciar a sua relação com a produção de EROs e a ativação das vias de morte celular pelo aumento do estresse oxidativo, que sobrecarrega os sistemas de antioxidantes celulares induzindo a morte celular (Figura 5) (Bregge-Silva et al., 2012; Tan et al., 2018).



Legenda: O peróxido de hidrogênio, produto da reação causa estresse oxidativo que desencadeia morte celular pela sobrecarga dos sistemas antioxidantes. Fonte: autoria própria.

A Pollonein-LAAO é uma nova L-aminoácido oxidase isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*. Esta é uma glicoproteína com uma massa molecular estimada de 63 kDa (Polloni et al., 2023). Neste estudo, Polloni e colaboradores demonstraram que a toxina possui a capacidade de induzir estresse oxidativo levando a apoptose celular por meio das vias intrínseca e extrínseca devido a indução da expressão dos genes TP53, BAX, BAD, TNFRSF10B e CASP8. Além disso, a Pollonein-LAAO interrompeu a progressão do ciclo celular, atrasando a fase G0/G1, possivelmente devido à sua influência na expressão de genes

como CDKN1A, CDK2 e E2FDe. Ademais, a Pollonein-LAAO também impediu a migração, invasão e adesão das células PC-3 ao colágeno IV e fibronectina, provavelmente devido à sua capacidade de regular negativamente genes envolvidos em etapas críticas do processo de invasão e adesão celular, como SNAI1, VIM, MMP2, ITGA2, ITGAV e ITGB3. Os estudos prévios realizados com a Pollonein-LAAO demonstraram que a toxina possui a capacidade de induzir estresse oxidativo e inibir processos cruciais para o câncer de próstata, como proliferação, adesão, invasão, metástase e angiogênese. Esses resultados ressaltam a importância do estresse oxidativo e do microambiente tumoral na progressão do câncer, incluindo sua resistência à quimioterapia (Policastro et al., 2013; Gorrini et al., 2013; Galadari et al, 2017; Moloney e Carter, 2018). Portanto, é essencial continuar os estudos para investigar o efeito antitumoral da Pollonein-LAAO e suas alterações nos sistemas antioxidantes das células tumorais, visando compreender melhor seu mecanismo de ação.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer de próstata representa um desafio global de saúde, dada sua alta incidência e taxas significativas de mortalidade. O desenvolvimento de tratamentos inovadores que superem as limitações dos métodos terapêuticos atuais é necessário, visto que esses, muitas vezes, são incapazes de evitar a recorrência da doença devido à capacidade do tumor de evadir ou resistir aos tratamentos convencionais. Para enfrentar esse problema de forma mais eficaz, é crucial a produção de conhecimentos acerca dos mecanismos de morte celular, que impulsionem o desenvolvimento de tratamentos inovadores para superar as limitações dos métodos terapêuticos atuais.

As LAAOs encontradas em peçonhas de serpentes têm a capacidade de produzir EROs e, como é sabido, a geração dessas EROs em níveis acima do limiar citotóxico pode levar à morte celular e senescência. Nesse cenário, a utilização da Pollonein-LAAO na investigação do envolvimento de ERO na progressão tumoral e as alterações que promovem nos sistemas antioxidantes representa uma alternativa promissora para pesquisas adicionais que buscam compreender os mecanismos antitumorais induzidos pelas EROs.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o estresse oxidativo e efeitos nos sistemas antioxidantes induzidos por uma L-aminoácido oxidase (Pollonein-LAAO) isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* em células tumorais de próstata humana através de ensaios *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Purificar a toxina L-aminoácido oxidase da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* (Pollonein-LAAO), avaliar a homogeneidade e sua atividade enzimática;
- Avaliar a atividade citotóxica da Pollonein-LAAO sobre células de adenocarcinoma de próstata humana (PC3, andrógeno resistente) na presença e ausência de catalase após 4 e 24 horas de tratamento;
- Quantificar as espécies reativas de oxigênio, em PC3 após o tratamento de 4 e 24 horas com Pollonein-LAAO.
- Verificar a capacidade de diferentes concentrações da Pollonein-LAAO de alterar os sistemas antioxidantes intracelulares (Glutaciona total e Glutaciona Transferase) da PC3 a partir de 4 e 24 horas de tratamento, e a atividade da superóxido-dismutase após 24 horas de tratamento.

4. METODOLOGIA

4.1 Peçonha bruta

A peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foi obtida a partir do Banco de Venenos da Fiocruz Rondônia/UNIR, Porto Velho, RO, sob número de licença de autorização do governo local: CGEN/AFCAB61; SIS-BIO 64385-1; IBAMA nº 27.131-3 e CGEN/CNPq 010627/2011-1.

4.2 Isolamento da Pollonein-LAAO

A L-aminoácido oxidase denominada Pollonein-LAAO foi purificada da peçonha de *Bothrops moojeni* seguindo a metodologia descrita por Polloni (2023) modificada de Carone (2017). Inicialmente, 200 mg pesados da peçonha foram ressuspensos em 2 mL do tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 150 mM, centrifugados a 100 x g por 10 min à 4 °C. O sobrenadante (111 mg) foi aplicado na resina HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 (GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 150 mM. A eluição foi realizada com o mesmo tampão sob o fluxo de 0,2 mL/min. As frações obtidas a 280 nm foram coletadas (2 mL), agrupadas de acordo com o ensaio de atividade L-aminoácido oxidase (LAAO) (item 4.2.2). Em seguida, as frações foram concentradas por ultrafiltração (Vivaspin 30 kDa, Merck) para posterior troca do tampão inicial pelo tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contendo NaCl 4 M, pH 7,6.

A fração (S1) (7,5 mg) com atividade LAAO foi aplicada em coluna Hitrap Phenyl Sepharose (1 mL) previamente equilibrada com Tris-HCl 10 mM pH 7,6 contendo 4 M NaCl. Um gradiente linear reverso de NaCl (de 4 a 0 M) em água deionizada foi aplicado. Frações de 1 mL foram coletadas no fluxo de 1,0 mL/min. As frações com atividade LAAO foram coletadas e concentradas por ultrafiltração (Vivaspin 30 kDa, Merck) para mudança do tampão para Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contendo 0,5 M NaCl, sendo armazenada a 4 °C.

Em seguida, a fração (Ph1) (2 mg) com atividade LAAO foi aplicada a Hitrap Beazimidine HP (1 mL) previamente equilibrada com Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contendo 0,5 M NaCl. A eluição sequencial contendo Tris-HCl 20 mM e 0,5 M NaCl, pH 7,4; 20 mM Tris-HCl e 1,0 M NaCl, pH 7,4; e 50 mM glicina-HCl pH 3,0, foi realizada com fluxo de 0,6 mL/min. Frações de 1 mL foram coletadas e submetidas ao teste de atividade LAAO. As frações ativas

(Bz2) (0,64 mg) foram concentradas por ultrafiltração (Vivaspin 30 kDa, Merck) para mudança de tampão para bicarbonato de amônio (AMBIC) 10 mM pH 8,0, e armazenadas a 4 °C. A concentração de proteínas presentes nas frações com atividade L-aminoácido oxidase foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

4.2.1 Análise da homogeneidade da Pollonein-LAAO por SDS-PAGE

A homogeneidade das amostras foi verificada em gel de poliacrilamida a 12,5 % (m/v) em condições redutoras, na presença de SDS e β -mercaptoetanol, segundo metodologia descrita por Laemmli (1970), com algumas modificações. O sistema de SDS-PAGE descontínuo consistiu em: gel de empilhamento a 3%, contendo Tris-HCl 1,5M (pH 6,8); SDS a 10% (m/v), bis/acrilamida-acrilamida a 0,8:30 (m/m); PSA 10% e TEMED 100% e gel de separação contendo Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8); bis/acrilamida-acrilamida a 0,8:30 (m/m); PSA 10%; TEMED 100%. O gel foi preparado em sistema de eletroforese Hoefer SE 260 Mighty Small II Mini-Vertical (Hoefer Inc, Holliston, Massachusetts, USA). As amostras foram dispersas em Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, azul de bromofenol 0,01% (m/v), glicerol 10% (v/v) e β -mercaptoetanol 20% (v/v). O tampão do eletrodo contendo Tris 0,025 M, glicina 1,92 M e SDS 1% (m/v), pH 8,3. Após a corrida, os géis foram corados em uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (m/v) em água e etanol 1:1 (v/v) e descorados em uma solução de ácido acético 7%.

A eletroforese em SDS-PAGE das frações cromatográficas foi realizada utilizando os marcadores de massa molecular: β -galactosidase (116,0 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), lactato desidrogenase (35,0 kDa), REase Bsp981 (25,0 kDa) e β -lactoglobulina (18,4 kDa) (Pierce™ Unstained Protein MW Marker).

4.2.2 Determinação da atividade L-aminoácido oxidase

A atividade foi determinada utilizando 2,5 mL da solução ensaio (L-Leucina 0,1% em Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2), onde foram adicionados 4 μ L de peroxidase de rabanete (1 mg/mL), 25 μ L de uma solução de OPD (o-phenylenediamine) (Sigma-Aldrich, Brasil) (10 mg/mL em metanol) e 2 μ g de amostra. Após 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de ácido cítrico 10% (m/v) e realizada a leitura da absorbância (490 nm) no espectrofotômetro.

O cálculo final da atividade foi determinado em U.mg/minuto, utilizando a equação obtida com a curva padrão da peroxidase ($Y = 291.12.X - 13.71$) para o cálculo.

4.3 Cultivo das células

A linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humano (PC3, andrógeno-resistente. ATCC: CRL-1435) foi cultivada em garrafas de cultura celular e mantida em incubadora à 37°C e 5% de CO₂, com meio RPMI-1640 completo (Sigma, Brasil), sendo este suplementado com L-glutamina 2 mM, bicarbonato, 1% de penicilina/estreptomicina, Hepes 25mM e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB- Sigma, Brasil).

4.4 Ensaio de viabilidade celular por MTT

Para avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5) a linhagem celular (PC3) foi semeada em placas de 96 poços na concentração de 2×10^4 célula/poço e incubada a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h. Após a adesão, as células foram tratadas com um novo meio completo contendo as diferentes concentrações da Pollonein-LAAO (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,09; 0,04 µg/mL) e no grupo controle contendo apenas meio RPMI completo. Após 4 ou 24 horas de incubação (37 °C e 5% de CO₂), foi adicionado 10 µL por poço de MTT (5 mg/mL) e a placa foi incubada por 3 horas. Posteriormente, 100 µL de uma solução de SDS 10% e HCl 0,01 M foram acrescentados para a dissolução dos cristais de Formazan gerados pela metabolização do MTT pelas células viáveis. Após 24 horas a densidade óptica (DO) foi determinada a partir da leitura a 570 nm na leitora de placas (Multiskan GO, Thermo Scientific, USA). Para determinar o valor de IC₅₀, cuja concentração do tratamento causou 50% de morte das células cultivadas, uma curva logarítmica foi utilizada resultante da curva de concentração-resposta obtida pelas análises realizadas no Software GraphPad Prism (versão 6.0).

4.5 Ensaio de viabilidade e Co-tratamento com Catalase

A linhagem celular (PC3) foi semeada (2×10^4 célula/poço) e incubada a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após o período de adesão celular, as células foram tratadas com um novo meio RPMI contendo diferentes concentrações da Pollonein-LAAO (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125;

1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,09; 0,04 µg/mL), simultaneamente a catalase (150 U/mL) foi adicionada nos poços com o tratamento de acordo com a metodologia descrita por Polloni (2023). O grupo controle continha meio completo e catalase (150 U/mL). Após 4 e 24 horas, as amostras foram avaliadas pelo método de MTT, conforme descrito previamente (item 4.4).

4.6 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A quantificação das EROs foi realizada conforme descrito por Polloni (2023). As células PC3 (1×10^5 células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços. Após 24 horas mantidas à 37°C em incubadora umidificada 5% CO₂, estas foram tratadas com a Pollonein-LAAO (0,19 µg/mL) por 4 e 24 horas. O controle continha apenas meio. Ao término do tempo de tratamento, as células foram lavadas com PBS 1X e posteriormente incubadas com a sonda H₂DCF-DA (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína) (10 µM) (Sigma-Aldrich) por 30 minutos a 37 °C, no escuro. Decorrido o tempo de tratamento as células foram lavadas com PBS 1X, tratadas com tripsina 0,25%, ressuspensas em PBS 1X com 10% SFB e protegidas da luz. Posteriormente, a intensidade da fluorescência foi determinada por citômetro de fluxo (CytoFLEX – Beckman Coulter, EUA) e 10.000 eventos foram adquiridos por amostra. Os dados foram obtidos usando o software Kaluza versão 1.5).

4.7 Quantificação de Enzimas Antioxidantes

Para as dosagens da glutatona total e enzimas antioxidantes (GST e SOD) inicialmente as células (PC3) 3×10^6 células/garrafa de 25 cm³ foram semeadas e mantidas em estufa com 5% de CO₂ e 37 °C por 24 horas. Posteriormente, as células foram tratadas com a Pollonein-LAAO (0,19 µg/mL) por 4 e 24 horas. Após o tempo de tratamento, as células foram removidas mecanicamente com um rodo de células estéril e coletadas em 2 mL de PBS 1X e armazenadas em -80 °C até a análise das atividades enzimáticas.

As células tratadas com Pollonein-LAAO (0,19 µg/mL), conforme descrito acima, foram centrifugadas a 600 g por 5 minutos. Os *pellets* foram ressuspensos em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) contendo EDTA 2 mM e submetidos a 3 ciclos de congelamento/descongelamento. Em seguida, essas amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 10000 g a 4 °C e os sobrenadantes (100 µL) foram submetidos às análises enzimáticas.

4.7.1 Glutathione Total (GSH)

A quantificação da GSH foi realizada conforme descrito por Griffith (1980), com modificações. Nesse ensaio, os níveis de glutathione total são determinados por meio de um método cinético de reciclagem que se baseia na redução contínua de DTNB (sulfidrina 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) a TNB (2-nitro-5-mercapto-benzoico) pela GSH, onde a forma oxidada GSSG (glutathione dissulfeto) gerada na reação é então reciclada pela glutathione redutase com o auxílio de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato). O produto, TNB, possui coloração amarela e a sua absorbância é então lida a 412 nm.

Inicialmente, o sobrenadante (10 μ L) das células tratadas com Pollonein-LAAO (0,19 μ g/mL), foram adicionados a (150 μ L) de uma solução de reação contendo o reagente DTNB 0,031 mg/ml e a enzima glutathione redutase (0,115 U/mL) em PBS 0,1 M (pH 7,0). Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, 50 μ L de NADPH 0,16 mg/mL foi adicionada à solução e as absorbâncias foram registradas por 5 minutos em intervalos de 1 minuto em uma leitora de microplacas (*Multiskan GO, Thermo Scientific, USA*) a 412 nm.

A construção da curva padrão foi realizada através da análise de regressão linear das absorbâncias da diluição seriada de uma solução padrão de GSH (0,2-2 μ M) (Sigma, St. Louis-EUA). Os resultados (n=3) foram expressos em *n moles* de glutathione total por mL de amostra.

4.7.2 Glutathione S Transferase (GST)

A atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) foi determinada de acordo com o método de Habig et al. (1974) com modificações. Esse método se baseia na conjugação do reagente DNB (1-cloro-2,4- dinitrobenzeno) com a glutathione reduzida (GSH) catalisado pela enzima GST resultando em CDBN (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno). Esta conjugação é acompanhada por um aumento na absorbância a 340 nm diretamente proporcional à quantidade de GST na amostra.

Inicialmente, o sobrenadante (10 μ L) das células tratadas com Pollonein-LAAO (0,19 μ g/mL), foi adicionado a 50 μ L de uma solução fosfato 100 mM (pH 6,5), Triton X-100 0,1% e glutathione reduzida (100 mM). Para iniciar a reação, 10 μ L de CDNB (100 mM em etanol 95%) foram adicionados a mistura de reação.

As absorbâncias foram registradas a cada 1 minuto durante 5 minutos em 340 nm em uma leitora de microplacas (*Multiskan GO, Thermo Scientific, USA*). Os resultados (n=3)

foram expressos em U/mg, onde (U) representa a conjugação de 1 nmol de CDNB com glutathiona reduzida por minuto. O cálculo final da atividade da glutathiona transferase foi realizado utilizando a equação:

Equação 1 - Cálculo da Atividade Específica de Glutathiona Transferase

$$\text{Atividade GST} = \frac{(\text{D.A}_{340 \text{ nm}})/\text{mim} \times V \times \text{dil}}{e_{nm} \times V_{enz}} \text{ mmol/mL/mim}$$

Legenda: dil- Diluição da amostra original; e_{nm} ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) - o coeficiente de extinção para CDNB conjugado a 340 nm para teste em cubeta de 1 ml = $9,6 \text{ mM}^{-1}$ (comprimento do caminho -1 cm); e o coeficiente de extinção molar do CDNB= $9,6 \text{ mM}^{-1}$. Fonte: adaptado de Habig et al, 1974.

4.7.3 Superóxido Dismutase (SOD)

A quantificação da superóxido dismutase foi determinada de acordo com o método adaptado de Madesh e Balasubramanian (1998). Brevemente o sobrenadante (50 μL) foi adicionado a cada poço da microplaca contendo (50 μL) do tampão fosfato 50 mM (pH 7,0); 1,25 mM de MTT e 100 μM de pirogalol. A microplaca foi, então, incubada em estufa por 5 minutos a 37°C e em seguida foram adicionados 50 μL de DMSO para parar a reação em todos os poços. As leituras de absorbância foram realizadas a 570 nm em leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, USA).

A atividade de SOD envolve a geração de superóxido pela autooxidação do pirogalol e a redução dependente de superóxido do corante brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazólio (MTT). A presença de SOD no meio resulta na diminuição dos níveis de superóxido gerados pela autooxidação do pirogalol, conseqüentemente, a formação do sal de formazan a partir da redução do MTT pelo superóxido é inibida. Uma unidade de SOD (1 U SOD) é definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir a absorbância a 570 nm do sal de formazan em 50%.

4.8 Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em três experimentos independentes e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Todos os dados foram primeiramente checados para distribuição normal dos dados. Em seguida as diferenças estatísticas entre os grupos tratados e controles foram determinadas por One-way ANOVA, seguidas pelo pós-teste de

Bonferroni (GraphPad Prism Software *version* 6.0). Diferenças entre grupos foram considerados estatisticamente significativos com valores de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5. RESULTADOS

5.1 Purificação da Pollonein-LAAO e atividade enzimática

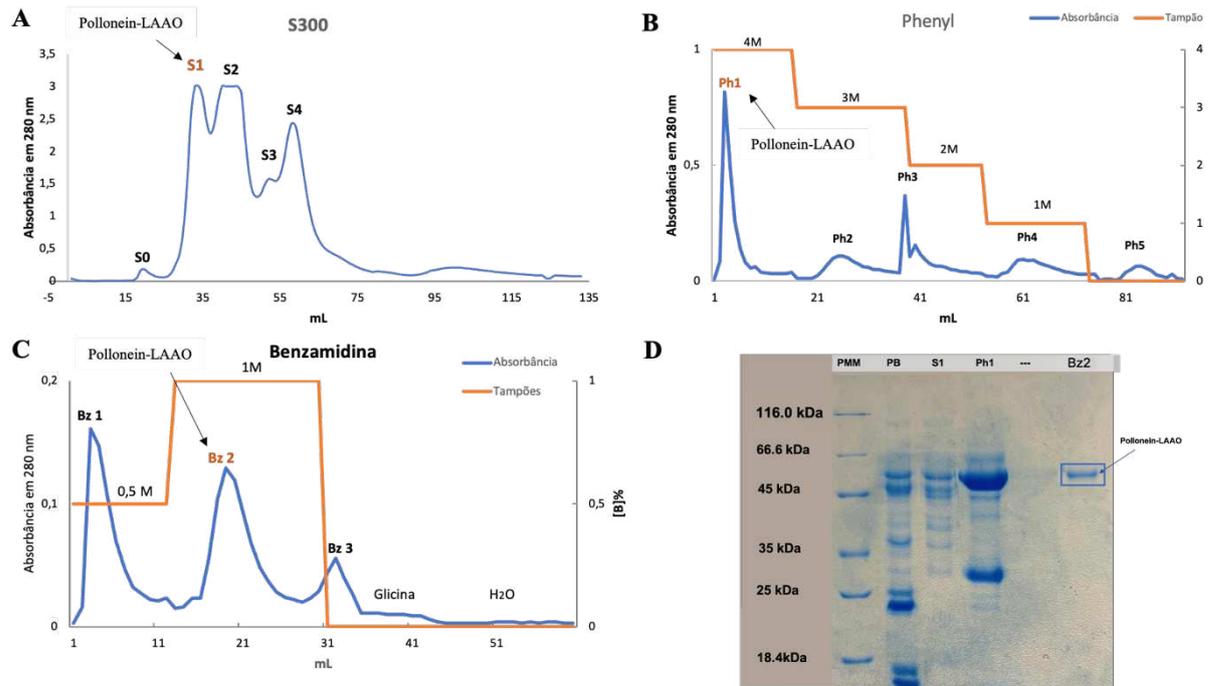
A Pollonein-LAAO foi purificada a partir da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* após as três etapas cromatográficas (item 4.2). A Figura 6 ilustra as frações obtidas a partir da exclusão molecular, da interação hidrofóbica e das cromatografias de afinidade, cujas frações com atividade LAAO foram S1 (173 U.mg/min) (Figura 6A), Ph1 (1.846 U.mg/min) (Figura 6B) e Bz2 (3.539 U.mg/min) (Figura 6C), respectivamente. As atividades específicas dos picos cromatográficos são demonstradas na Tabela 1. O rendimento percentual total da purificação foi de 0,57% calculado pela relação da massa de proteína (0,6 mg) purificada a partir da massa total de peçonha bruta (111 mg).

Tabela 1 - Rendimento proteico (%) e atividade enzimática (U.mg/min) das frações obtidas das etapas cromatográficas de purificação da Pollonein-LAAO

Amostra	Atividade (U.mg/min)	Dosagem (µg/uL)	Proteína Total (mg)	Proteína (%)
Peçonha Bruta	44,1	55,54	111	100
Pico S1	173,29	46,9	23,45	21,1
Pico Ph1	1845,96	2,75	2,08	1,87
Pico Bz 2	3539,74	1,06	0,64	0,57

A homogeneidade da fração Bz2 (Pollonein-LAAO) foi avaliada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em condições redutoras (item 4.2.1). O perfil eletroforético das frações obtidas durante as etapas de purificação da Pollonein-LAAO (Figura 6D) demonstrou que a estratégia de purificação empregada possibilitou o isolamento da proteína com um grau de pureza bastante satisfatório. Após a separação das proteínas, a banda correspondente à Pollonein-LAAO foi identificada e comparada com padrões de proteínas de massas moleculares conhecida. A Pollonein-LAAO exibiu uma migração próxima ao padrão de albumina sérica bovina (66 kDa).

Figura 6 - Purificação da Pollonein-LAAO



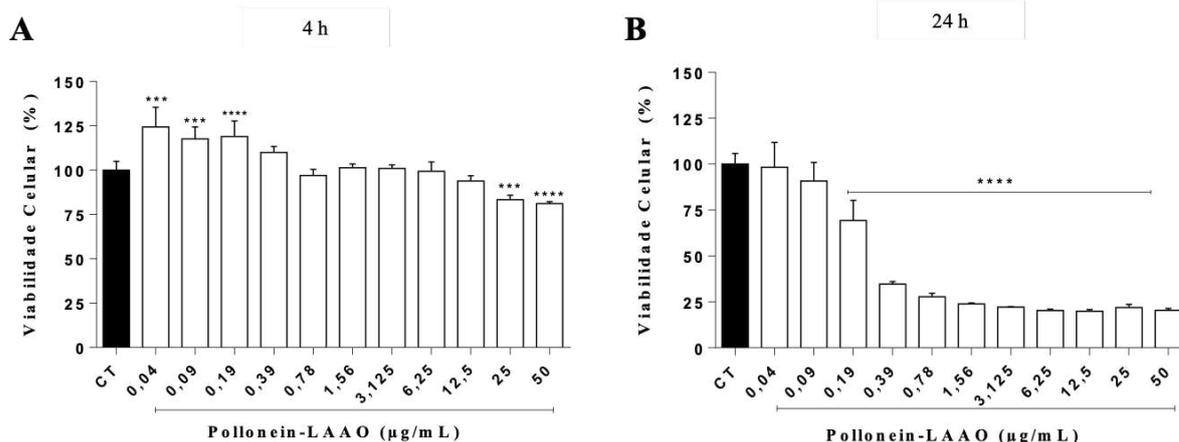
Legenda: (A) Perfil cromatográfico da peçonha bruta (111 mg). (B) Perfil cromatográfico da fração S1 (23,45 mg). (C) Perfil cromatográfico da fração Ph1 (7,3 mg), resultando no pico Bz2 (2 mg) correspondente com a Pollonein-LAAO. (D) Gel de eletroforese SDS-PAGE 12,5%. As setas indicam as frações contendo atividade LAAO.

5.2 Análise da Viabilidade Celular

A ação citotóxica da Pollonein-LAAO sobre células de câncer de próstata (PC3) foi verificada por meio de ensaios de viabilidade celular utilizando o método de MTT (item 4.4) (Figura 7). A Pollonein-LAAO exerceu efeito citotóxico em ambos os tempos de tratamento (4h e 24h). Após 4 h, a viabilidade celular reduziu para 83% e 81% nas concentrações mais elevadas de tratamento (25 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente). No entanto, nas menores concentrações (0,04- 0,19 $\mu\text{g}/\text{mL}$) houve um efeito de proliferação nas células PC3 (Figura 7A).

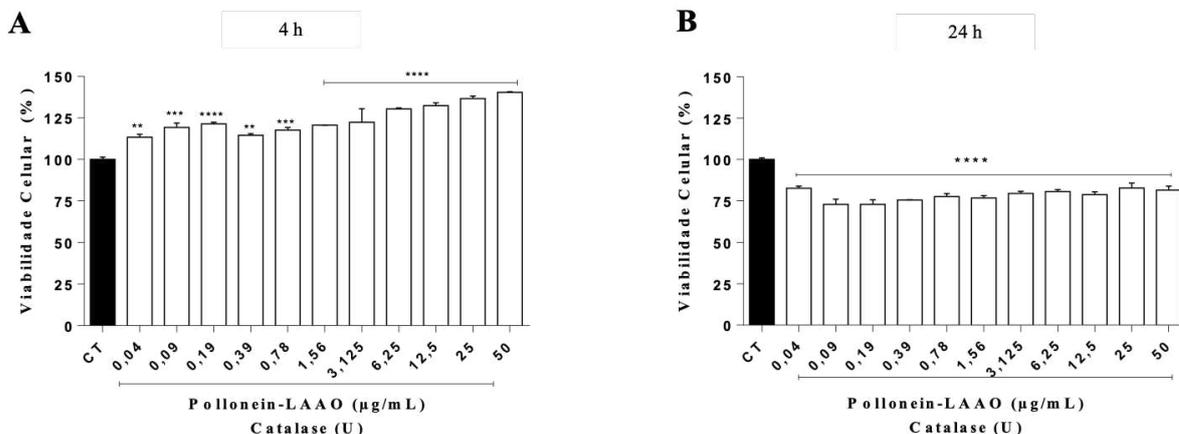
Após 24 h, observou-se que nas concentrações de 0,39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ houve uma diminuição significativa (**** $p < 0.0001$) na viabilidade das células PC3 em comparação com o grupo controle (Figura 7B). Considerando as concentrações citotóxicas mais baixas (0,19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,39 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a viabilidade celular foi reduzida para 70% e 35%, respectivamente. O IC_{50} foi de 0,3142 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o tratamento de 24 horas. O cotratamento das células PC3 com a Pollonein-LAAO e catalase aboliu significativamente os efeitos citotóxicos causados pela toxina nos dois tempos de tratamento (4 h e 24 h) (Figura 8).

Figura 7 - Viabilidade de células PC3 tratadas com Pollonein-LAAO



Legenda: Gráficos representativos da viabilidade da linhagem de próstata humano PC3 por 4 horas (A) e 24 horas (B) de tratamento com a Pollonein-LAAO (0,04; 0,09; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 µg/mL). ***p<0,001 e ****p<0,0001 em comparação ao CT- Grupo controle.

Figura 8 - Viabilidade de células PC3 tratadas com Pollonein-LAAO e Catalase



Legenda: Gráfico representativos da viabilidade da linhagem de próstata humano PC3 por 4 horas (A) e 24 horas (B) após tratamentos com a Pollonein-LAAO (0,04; 0,09; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 µg/mL) e Catalase (150 U/poço). ** p<0,01; ***p<0,001 e ****p<0,0001 em comparação ao CT- Grupo controle.

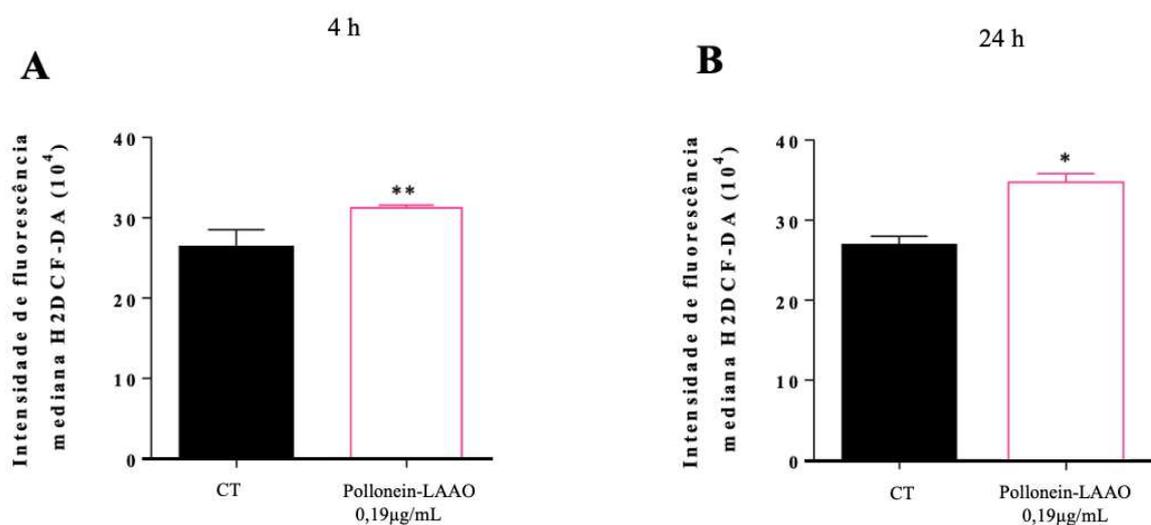
5.3 Quantificação de EROs

O potencial citotóxico da Pollonein-LAAO é atribuído à sua capacidade de induzir a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Portanto, é crucial garantir a viabilidade celular para que as EROs possam ser geradas e quantificadas após o tratamento com a toxina. Nessa abordagem, a concentração de 0,19 µg/mL foi escolhida para os próximos ensaios, por representar a menor concentração que provocou efeito citotóxico nas células PC3, mantendo

cerca de 70% de viabilidade. Essa escolha garantiu a presença do estresse oxidativo, proporcionando condições ideais para a análise da produção de espécies reativas de oxigênio.

A Figura 9 apresenta os resultados obtidos após o tratamento das células PC3 com a Pollonein-LAAO (0,19 µg/mL). Após 4 h de tratamento a mediana de fluorescências foi de 264551 para o grupo controle (CT) e 318768 para o tratado. Para o tempo de 24 horas temos 269354 no controle e 342980 no tratado. Assim, observa-se que os tratamentos em ambos os tempos de tratamento promoveram um aumento significativo (** $p < 0.01$ e * $p < 0,05$, respectivamente) na produção de EROs.

Figura 9 - Quantificação dos níveis de EROs por citometria de fluxo



Legenda: As células PC3 foram tratadas com diferentes concentrações de Pollonein-LAAO (0,19 µg/mL) por 4 horas (A) e 24 horas (B) e coradas com a sonda H₂DCF-DA. (n=3) * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em comparação ao CT-grupo controle.

5.4 Quantificação enzimática dos sistemas antioxidantes

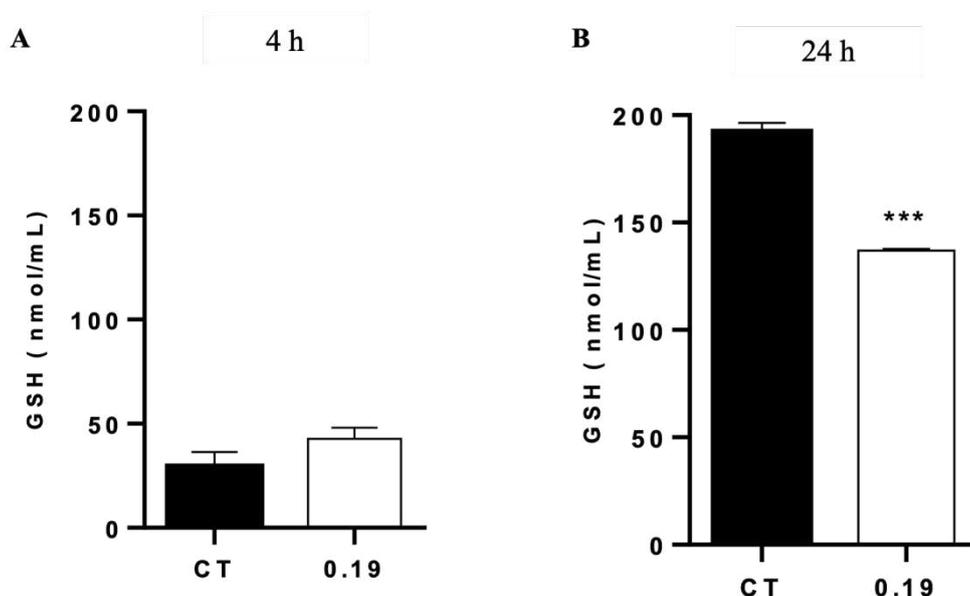
Por fim, para examinar o impacto da Pollonein-LAAO nos sistemas antioxidantes, ensaios enzimáticos foram realizados para quantificar GSH, SOD e GST. Assim como na análise das EROs, para a avaliação dos sistemas antioxidantes é essencial que as células permaneçam viáveis para que seja possível a resposta dos sistemas antioxidantes frente ao estresse oxidativo induzido pela toxina. Portanto, a concentração de 0,19 µg/mL, previamente identificada como a menor concentração citotóxica para as células PC3 foi escolhida para os testes enzimáticos.

Os níveis de GSH após o tratamento com a Pollonein-LAAO por 4 horas foram de 42,8 nmol/mL e para o grupo controle sem tratamento foi de 29,5 nmol/mL. Já o tratamento de 24

horas com a toxina reduziu significativamente a concentração da glutathiona (GSH) na linhagem PC3 (CT: 192,3 nmol/mL e 0,19 μ g/mL: 136,9 nmol/ mL, *** p <0.001) (Figura 10). Além disso, houve um aumento significativo na atividade da superóxido dismutase (SOD) (CT: 0,18 U e 0,19 μ g/mL: 0,35U, *** p <0.001) após 24 horas de tratamento (Figura 11). Não foram observadas alterações significativas na atividade da glutathiona S-transferase (GST) após o tratamento com a Pollonein-LAAO em nenhum dos tempos de tratamento (Figura 12).

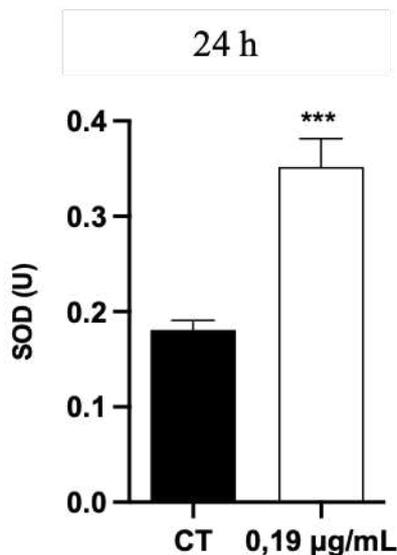
Esses resultados indicam que a Pollonein-LAAO pode modular os sistemas antioxidantes das células conforme o tempo de tratamento, afetando especialmente a atividade da GSH e da SOD, o que pode contribuir para seu potencial citotóxico e seus efeitos sobre a sobrevivência celular.

Figura 10 - Atividade da Glutathiona (GSH)



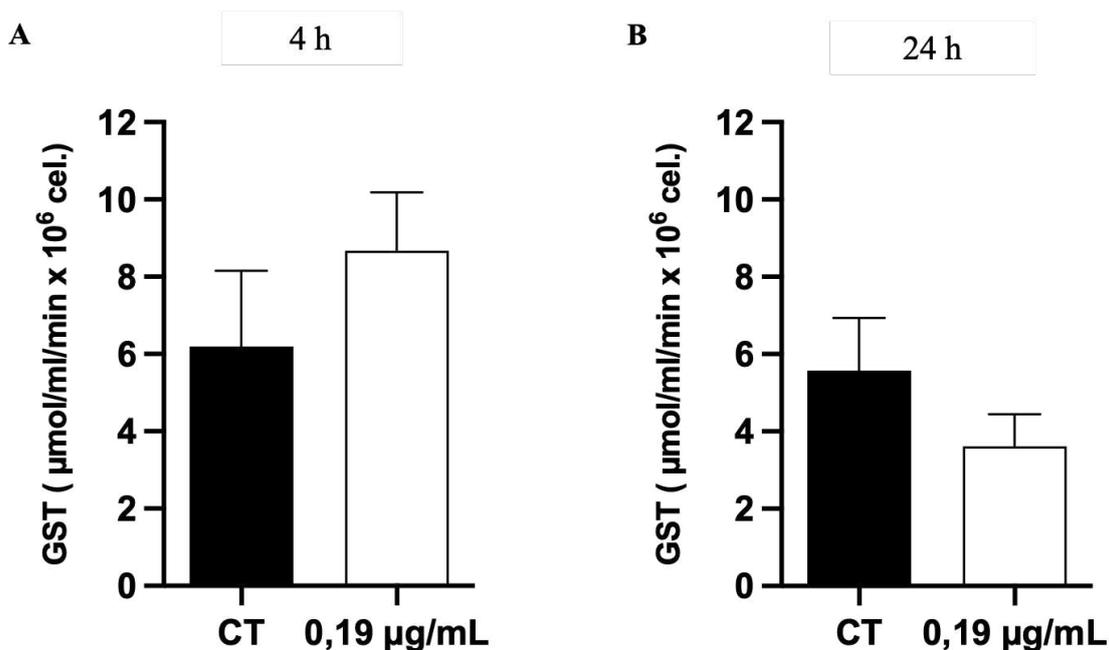
Legenda: Dosagem da Glutathiona total (nmol/ mL) presente nas células PC3 após tratamento com Pollonein-LAAO (0,19 μ g/mL) por 4 horas (A- CT: 29.4765 e 0,19 μ g/mL: 42.7889) e 24 horas (B- CT: 192,312 e 0,19 μ g/mL: 136,94). $n=3$ e *** p <0,001 em comparação ao controle. CT- Grupo controle.

Figura 11 - Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)



Legenda: Dosagem da atividade da Superóxido Dismutase (U) das células PC3 após tratamento com Pollonein-LAAO (0,19 µg/mL) por 24 horas (CT: 0,185 e 0,19 µg/mL: 0,359) (U: quantidade de enzima que catalisa a conversão de um µmol do substrato por minuto). n=3 e ***p<0,001 em comparação ao controle. CT- Grupo controle.

Figura 12- Atividade da Glutathione S Transferase (GST)



Legenda: Dosagem da atividade Glutathione S Transferase (µmol/ mL/min em 10⁶ células) presente nas células PC3 (tumoral) após tratamento com Pollonein-LAAO (0,19 µg/mL) por 4 horas (A- CT: 6,2 e 0,19: 8,68) e 24 horas (B- CT: 5,58 e 0,19: 3,62). n=3, CT- Grupo controle.

6. DISCUSSÃO

A enzima L-aminoácido oxidase presente na peçonha de serpentes (SV-LAAO) exibe diversas atividades farmacológicas significativas, incluindo indução de agregação plaquetária, hemorragia, edema, efeitos cruciais no envenenamento ofídico (Vyas et al., 2013; Costa et al, 2015; Oliveira et al., 2022). Apesar de seus efeitos tóxicos, essas toxinas têm sido extensivamente estudadas para explorar seus potenciais terapêuticos, como agentes antimicrobianos, antiparasitários e antitumorais propiciados pelos produtos formados durante a reação catalítica de L-aminoácidos (Du e Kenneth, 2002; Costa et al, 2014; Costa et al, 2017; Carone et al, 2017).

Assim, a capacidade das LAAOs em induzir a morte celular, provém da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e perturbação dos sistemas antioxidantes celulares, o que destaca seu potencial como agente terapêutico (Toyokini et al, 1995; Circu et al, 2010; Panieri e Santoro, 2016; Galasso et al, 2021). Portanto, a identificação e caracterização de novas LAAOs, como a Pollonein-LAAO (Polloni et al., 2023), representam avanços importantes na pesquisa de novos tratamentos contra o câncer. Essas descobertas destacam a importância contínua da investigação de compostos bioativos presentes em venenos e animais, fornecendo perspectivas valiosas para novos conhecimentos sobre a dinâmica molecular das células tumorigênicas e o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Neste estudo, a Pollonein-LAAO foi isolada com intuito de investigar os efeitos do estresse oxidativo e as alterações nos sistemas antioxidantes induzidos por essa toxina na linhagem celular de câncer de próstata (PC3). Inicialmente, a toxina foi purificada seguindo a metodologia descrita por Polloni e colaboradores (2023). No presente estudo, o isolamento da Pollonein-LAAO a partir da peçonha de *B. moojeni*, a avaliação da sua homogeneidade e massa molecular, assim como a atividade enzimática, corroboram com os achados desses autores. Eles evidenciaram que a Pollonein-LAAO possui uma massa molecular de cerca de 63 kDa, um rendimento proteico de 0,6% e uma atividade específica de 3832,62 U.mg/min.

Da peçonha de *B. moojeni* já foram isoladas outras duas isoformas: a BmooLAAO-I, com 64,8 kDa e uma atividade enzimática de LAAO de apenas 487,69 U/mg, e a BmooLAAO-II, que possui uma massa molecular de 46,6 kDa e uma atividade enzimática de 4.924,77 U/mg/min. Esses dados ressaltam a diversidade bioquímica das LAAOs encontradas nessa espécie (Stábeli et al., 2007; Barbosa et al., 2021). Ainda no gênero *Bothrops*, temos a Bp-LAAO de *B. pauloensis* que apresentou massa molecular de aproximadamente 65 kDa (Rodrigues et al., 2009). A BaltLAAO-I isolada de *B. alternatus* apresentou uma massa

molecular de 66 kDa na forma monomérica e 123 kDa em sua forma dimérica (Ribeiro et al., 2016). Já a BjussuLAAO-II isolada de *B. jararacussu* apresentou uma massa molecular de 60,36 kDa correspondente a 0,3% das proteínas do veneno e atividade LAAO de 4884,53 U/mg/mim (Carone et al., 2017). Outra SV-LAAO, como a Nh-LAAO purificada da peçonha de *Naja haje*, possui uma massa molecular de aproximadamente 140 kDa na forma dimérica e 70 kDa na forma monomérica (Salama et al., 2024). Sua atividade específica de 2500 U/mg, indicando um aumento de 12,5 vezes na pureza em comparação com a peçonha bruta. Esses resultados destacam que as LAAOs presentes na mesma ou em diferentes espécies podem apresentar variações em suas massas moleculares, atividades enzimáticas e funcionais, tornando-as ferramentas biotecnológicas com diversos potenciais terapêuticos (Ullah et al., 2020).

A redução significativa na viabilidade celular observada nas células PC3 após o tratamento com diferentes concentrações de Pollonein-LAAO, após 24 horas de tratamento indica sua eficácia em induzir morte celular nessa linhagem. Esses achados estão de acordo com outros estudos que demonstraram o efeito citotóxico de L-aminoácido oxidases em diferentes tipos de células cancerígenas ressaltando o potencial antitumoral dessas enzimas (Sun et al., 2003; Alves et al., 2008; Lee et al., 2014; Costa et al., 2017; Polloni et al., 2023). Como exemplo, a BpLAAO demonstrou atividade antitumoral contra células SKBR-3, JURKAT e a BjussuLAAO-II contra células MCF7 (Rodrigues et al., 2009; Carone et al., 2017). A Nh-LAAO exibiu atividade citotóxica contra células cancerígenas HepG2 e Huh7 (Salama et al., 2024).

Os efeitos citotóxicos da Pollonein-LAAO foram reduzidos de modo significativo, para ambos os tempos de tratamento, com cotratamento com catalase, assim como demonstrado por Polloni (2023). O cotratamento com catalase também diminuiu os efeitos citotóxicos de CR-LAAO em todas as linhagens testadas mantendo a viabilidade celular em torno de 80-100% (Burin et al., 2016).

A produção aumentada de EROs, especialmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) induzida pela Pollonein-LAAO, é consistente com seu efeito citotóxico. Estudos anteriores demonstraram que a geração excessiva de EROs pode levar ao estresse oxidativo nas células, desencadeando a morte celular por apoptose (Fruehauf e Meyskens, 2007; Circu et al., 2010; Burin et al., 2016; Tan et al., 2018; Faubert et al., 2020; Polloni et al., 2023). A marcação celular com a sonda H_2DCF -DA revelou um aumento significativo na produção de EROs nas células tratadas com Pollonein-LAAO (0,19 μ g/mL) após 4 h e 24 h de tratamento, confirmando os

achados de Polloni e colaboradores (2023). Nesse contexto, também já foi verificado que outras SVLAAOs como a CR-LAAO isolada de *Calloselasma rhodostoma* apresentou efeito antileucêmico contra células Bcr-Abl devido a produção de H_2O_2 (Burin et al, 2016) e a BaltLAAO-I de *B. alternatus* demonstrou seu potencial citotóxico contra células JURKAT, SKBR-3 e B16F10 também pela produção de EROs (Ribeiro et al., 2016).

A análise dos sistemas antioxidantes mostrou que o tratamento com Pollonein-LAAO resultou na diminuição da concentração da glutathiona (GSH) e no aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) em células PC3. A diminuição dos níveis da glutathiona provavelmente está atrelada ao consumo da mesma mediante ao aumento das EROs, pois a GSH irá neutralizar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Já o aumento da atividade da superóxido dismutase induzido pela Pollonein-LAAO possivelmente está relacionado à maior disponibilidade de substrato, o íon superóxido (O_2^-), cuja formação é desencadeada pelo peróxido de hidrogênio (Babior, 1997). A regulação desses sistemas antioxidantes desempenha um papel crucial na determinação da resposta das células ao estresse oxidativo e na sobrevivência celular (Toyokuni, 1995; Panieri e Santoro, 2016). Essas alterações nos sistemas antioxidantes podem estar associadas à resposta das células PC3 ao estresse oxidativo induzido pela Pollonein-LAAO e à tentativa de proteção contra os danos oxidativos.

Estudos realizados com radioterapia, sobre as linhagens de câncer de próstata PC3 e DU145, demonstraram diferentes respostas ao estresse oxidativo (Jayakumar et al. 2014). Interessantemente, verificou-se que a linhagem DU145 exibe maior resistência à radioterapia, por apresentar um maior nível de GSH e uma maior ativação do fator de transcrição NRF2, proteína responsável pela transcrição de fatores do sistema antioxidante celular, além de apresentar uma menor concentração basal de EROs em comparação a PC3. Ademais, esse estudo demonstrou que a linhagem PC3, possui uma maior concentração basal de EROs e menor resposta dos sistemas antioxidantes, sendo mais suscetível a danos e morte celular induzidos pelo estresse oxidativo causado pela radiação (Jayakumar et al, 2014).

Nesse contexto, a susceptibilidade da linhagem PC3 frente ao estresse oxidativo induzido pela Pollonein-LAAO, pode estar relacionada a sua menor capacidade antioxidante, visto que, baixas concentrações apresentam efeito citotóxico significativo, onde 0,31 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de matar 50% das células. Ademais temos que o maior tempo de tratamento contribuiu para o aumento da toxicidade da Pollonein-LAAO quando comparamos os efeitos observados e 4 com os de 24 horas, indicando uma ação dependente da concentração e do tempo.

Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que a Pollonein-LAAO exerce seu efeito citotóxico principalmente por meio da indução de estresse oxidativo e pela modulação dos sistemas antioxidantes das células. No entanto, é importante ressaltar que são necessários mais estudos para elucidar de forma mais abrangente os mecanismos moleculares subjacentes a esses efeitos. Assim, ao compreendermos melhor como as LAAOs influenciam a geração de ROS e seu impacto nas células cancerígenas, podemos desenvolver estratégias mais direcionadas para modular o estresse oxidativo e induzir a morte seletiva das células tumorais.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo foi demonstrado que a Pollonein-LAAO isolada da peçonha de *B. moojeni* foi capaz de induzir citotoxicidade sobre células de câncer de próstata (PC3). Este efeito provavelmente induzido pelo estresse oxidativo, provocado pelo aumento da produção de EROs. A Pollonein-LAAO também induziu uma redução nos níveis de glutathiona total (GSH) e aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD). Estes achados sugerem também uma ação da toxina nos mecanismos de defesa antioxidante das células PC3, contribuindo para sua atividade citotóxica. Desse modo, o presente estudo abre novas perspectivas para a continuidade de mais estudos para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no desequilíbrio redox induzido pela Pollonein-LAAO.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, V.; TULI, H.S.; VAROL, A.; THAKRAL, F.; YERER, M. B.; SAK, K. *et al.* **Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements.** *Biomolecules*. 2019; 9(11):735. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom9110735>.
- ALVES, R. M.; ANTONUCCI, G. A.; PAIVA, H. H.; CINTRA, A. C. O.; FRANCO, J. J.; MENDONÇA-FRANQUEIRO, E. P.; *et al.* **Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by l-amino acid oxidase isolated from Bothrops atrox snake venom.** v. 151, n. 4, p. 542–550, 1 dez. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.007>.
- AUTEN, R. L.; DAVIS, J. M. **Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details.** *Pediatric research*, 66(2), 121–127. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181a9eafb>.
- BABIOR, B. M. **Superoxide: a two-edged sword.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30(2), 141–155, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1997000200001>
- BARBOSA, L. G.; COSTA, T. R.; BORGES, I. P.; COSTA, M. S.; CARNEIRO, A. C.; BORGES, C. B. ET AL. **A comparative study on the leishmanicidal activity of the L-amino acid oxidases BjussuLAAO-II and BmooLAAO-II isolated from Brazilian Bothrops snake venoms.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 167, p. 267–278, jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.146>
- BELL, K. J. L.; MAR, C. D.; WRIGHT, G ;DICKINSON, J ; GLASZIOU, P. **Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies.** *International journal of cancer* vol. 137,7 (2015): 1749-57. Disponível em <https://doi.org/10.1002/ijc.29538>
- BISWAS, A.; DE, S. **Drivers of dynamic intratumor heterogeneity and phenotypic plasticity.** *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 320, n. 5, p. C750–C760, 1 maio 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **DATASUS. Tabnet.** Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <https://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude-tabnet/>. Acesso em: 20 ago. 2023.
- BREGGE-SILVA, C; NONATO, M. C.; DE ALBUQUERQUE, S; HO, P. L.; DE AZEVEDO, I. L. M. J; DINIZ, M. R. V. *et al.* **Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel l-amino acid oxidase from Lachesis muta snake venom.** *Toxicon*, Vol 60, Issue 7, 1263-1276, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.08.008>
- BURIN, S. M.; GHISLA, S.; OUCHIDA, A. T.; AISSA, A. F.; COELHO, M G. B.; COSTA, T. R. ET AL. **CR-LAAO antileukemic effect against Bcr-Abl + cells is mediated by apoptosis and hydrogen peroxide.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 86, p. 309–320, maio 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.069>

CARONE, S. E. I.; COSTA, T. R.; BURIN S.M.; CINTRA, A. C. O.; ZOCCAL, K. F.; BIANCHINI, F. J. *et al.* **A new L-amino acid oxidase from *Bothrops jararacussu* snake venom: Isolation, partial characterization, and assessment of pro-apoptotic and antiprotozoal activities.** International journal of biological macromolecules, v. 103, p. 25-35, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.025>

CECERSKA-HERYĆ, E.; SUROWSKA, O.; HERYĆ, R.; SERWIN, N.; NAPIONTEK-BALIŃSKA, S.; DOŁĘGOWSKA, B. **Are antioxidant enzymes essential markers in the diagnosis and monitoring of cancer patients – A review.** Clinical Biochemistry, mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2021.03.008>

CHE, M.; WANG, R.; LI, X.; WANG, H-Y.; . ZHENG, X. F. S **Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer.** Drug Discovery Today, v. 21, n. 1, p. 143–149, 1 jan. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.10.001>

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. **Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis.** Free Radical Biology and Medicine, v. 48, n. 6, p. 749–762, 15 mar. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022>

COOPER, G. M. **The Cell: A Molecular Approach.** 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000. The Development and Causes of Cancer. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>. Acesso em: 5 set. 2023

COSTA, T. R.; BURIN S. M.; MENALDO, D. L.; CASTRO, F. A. D.; SAMPAIO, S.V. **Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects.** The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases vol. 20 23. 2 jun. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-23>

COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; SILVA, C. P.; SORRECHIA, R.; ALBUQUERQUE, S. de; PIETRO, R. C. L. R. *et al.* **Evaluating the microbicidal, antiparasitic and antitumor effects of CR-LAAO from *Calloselasma rhodostoma* venom.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 80, p. 489-497, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.004>

COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; ZOCCAL, K. F.; BURIN S. M.; AISSA, A. F.; CASTRO, F. A. D. *et al.* **CR-LAAO, an L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodostoma* venom, as a potential tool for developing novel immunotherapeutic strategies against cancer.** *Scientific Reports* 7, 42673, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep42673>

DU, X-Y; KENNETH, J. C. **Snake venom L-amino acid oxidases.** *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* vol. 40,6: 659-65, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(02)00102-2)

FARIA, L. S. DE P.; PEREIRA, P. C.; LUSTOSA, A. L. M.; ARAGÃO, I. C. S.; ARAGÃO, F. M. S.; CUNHA, M. G. DE S. **Perfil epidemiológico do câncer de próstata no brasil: retrato de uma década.** *Revista Uningá*, v. 57, n. 4, p. 76-84, dez. 2020. ISSN 2318-0579. Disponível em: <http://revista.uninga.br/index.php/uninga/article/view/3336>. Acesso em: 24 ago. 2023

FAUBERT, B; SOLMONSON, A.; DEBERARDINIS, R. J. **Metabolic reprogramming and cancer progression**. Science (New York, N.Y.), 368(6487), eaaw5473. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aaw5473>

FERLAY, J.; ERVIK, M.; LAM, F.; LAVERSANNE, M.; COLOMBET, M.; MERY, L.; PIÑEROS, M; ZNAOR, A.; SOERJOMATARAM, A.; BRAY, F. **Global Cancer Observatory: Cancer Today**. Lyon, France. International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/today> . Acesso em 2 abr. 2024.

FERNANDES, T. A. M.; TEIXEIRA, S. T.; COSTA, T. R.; ROSSINI, A.M.; SOUZA, G.; POLLONI, L. *et al.* **BjussuLAAO-II, an l-amino acid oxidase from *Bothrops jararacussu* snake venom, impairs *Toxoplasma gondii* infection in human trophoblast cells and villous explants from the third trimester of pregnancy**. Microbes and Infection, v. 25, n. 6, p. 105123–105123, 1 jul. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2023.105123>

FERNANDES, T. A. M.; COSTA, T. R.; MENEZES, R. P.; DE SOUZA, M. A.; MARTINS, C.H.G.; JUNIOR, N.N. *et al.* **Bothrops snake venom L-amino acid oxidases impair biofilm formation of clinically relevant bacteria**. Toxicon, v. 238, p. 107569–107569, 1 fev. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107569>

FREITAS, V. De; COSTA, T.R.; NOGUEIRA, A.R.; POLLONI, L.; FERNANDES, T. A. M. *et al.* **Biochemical characterization and assessment of leishmanicidal effects of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus collilineatus* snake venom (CollinLA AO-I)**. Toxicon, v. 230, p. 107156–107156, 1 jul. 2023.

FRUEHAUF, J. P.; MEYSKENS, F. L., JR. **Reactive oxygen species: a breath of life or death?**. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 13(3), 789–794, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2082>.

GALADARI, S.; RAHMAN, A.; PALLICHANKANDY, S.; THAYYULLATHIL, F. **Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress?** Free Radical Biology and medicine, v. 104, p. 144–164, mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.004>

GALASSO, M.; GAMBINO, S.; ROMANELLI, M.G.; DONADELLI, M.; SCUPOLI, M.T. **Browsing the oldest antioxidant enzyme: catalase and its multiple regulation in cancer**. Free Radical Biology and Medicine, v. 172, p. 264–272, 20 ago. 2021.

GLOBOCAN. **Statistics at a glance**. 2022. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/900-world-fact-sheet.pdf>. Acesso em: 2 abr. 2024.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. **Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy**. Nature Reviews Drug Discovery, v. 12, n. 12, p. 931–947, 29 nov. 2013.

GRIFFITH, O. W. **Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine**. Analytical biochemistry, 106(1), 207-212, 1980.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. **Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation.** The Journal of biological chemistry, 249(22), 7130–7139, 1974.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. **The Hallmarks of Cancer.** Cell, v. 100, p. 57–70, 2000.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, ROBERT A. **Hallmarks of cancer: the next Generation.** Cell, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011

HANAHAHAN, D. **Hallmarks of Cancer: New Dimensions.** Cancer Discovery, v. 12, n. 1, p. 31–46, 12 jan. 2022.

HAYES, J. D.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TEW, K. D. **Oxidative Stress in Cancer.** Cancer Cell, v. 38, n. 2, p. 167–197, 10 ago. 2020. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>

HARRIS, I. S.; DENICOLA, G. M. **The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer.** Trends in Cell Biology, v. 30, n. 6, p. 440–451, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.03.002>

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. DE. **Glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos.** Química Nova, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil.** Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>. Acesso em: 31 ago. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Publicações. **Tipos de câncer. Câncer de próstata.** Rio de Janeiro: INCA, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>. Acesso em: 31 ago, 2023.

JAMES, N.D.; TANNOCK, I.; N'DOW, J.; FENG, F.; GILLESSEN, S.; ALI, S.A.; et al. **The Lancet Commission on prostate cancer: planning for the surge in cases.** Lancet. 2024 Apr 4:S0140-6736(24)00651-2. doi: 10.1016/S0140-6736(24)00651-2. Epub ahead of print. PMID: 38583453.

JAYAKUMAR, S.; KUNWAR, A.; SANDUR, S.K.; PANDEY, B. N.; CHAUBEY, ;R. C. **Differential response of DU145 and PC3 prostate cancer cells to ionizing radiation: Role of reactive oxygen species, GSH and Nrf2 in radiosensitivity.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, v. 1840, n. 1, p. 485–494, 1 jan. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.006>

KILEY, P. J.; STORZ, G. **Exploiting Thiol Modifications.** PLoS Biology, v. 2, n. 11, p. e400, 16 nov. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020400>

MADESH, M.; BALASUBRAMANIAN, K.A. **Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide.** Indian J Biochem Biophys, 35(3), 184-8, 1998.

MARTINS, F.C.; DE, S.; ALMENDRO, V.; GOENEN, M.; PARK, S.Y.; BLUM, J. **Evolutionary pathways in BRCA1-associated breast tumors.** Cancer Discov 2: 503–511, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0325>

MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. **ROS signaling in the biology of cancer.** Seminars in Cell & Developmental Biology, v. 80, p. 50–64, ago. 2017.

MOVAHED, Z. G; RASTEGARI-POUYANI, M.; MOHAMMADI, M. H.; MANSOURI, K. **Cancer cells change their glucose metabolism to overcome increased ROS: One step from cancer cell to cancer stem cell?** Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 112, p. 108690, 1 abr. 2019.

OLIVEIRA, F. C. **Caracterização de mecanismos citotóxicos induzidos pelo veneno de Bothrops atrox e de sua toxina purificada L-aminoácido oxidase.** 9 fev. 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/35475>. Acessado em 22 abr. 2024.

OLIVEIRA, A. L.; VIEGAS, M. F.; DA SILVA, S. L.; SOARES, A. M.; RAMOS, M. J.; FERNANDES, P. A. **The chemistry of snake venom and its medicinal potential.** Nature reviews. Chemistry, 6(7), 451–469, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41570-022-00393-7>

PANIERI, E.; SANTORO, M. M. **ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liaison in cancer cells.** Cell Death & Disease, v. 7, n. 6, p. e2253–e2253, jun. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.105>

PANDKAR, M. R.; DHAMDHERE, S. G.; SHUKLA, S. **Oxygen gradient and tumor heterogeneity: The chronicle of a toxic relationship.** Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer/Biochimica et biophysica acta, CR. Reviews on cancer, v. 1876, n. 1, p. 188553–188553, 1 ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188553>

PRADHAN, R.; KUNDU, A.; CHANAKYA NATH KUNDU. **The cytokines in tumor microenvironment: from cancer initiation-elongation-progression to metastatic outgrowth.** Critical reviews in oncology/hematology, p. 104311–104311, 1 mar. 2024.

POLICASTRO, L. L.; IBAÑEZ, I. L.; NOTCOVICH, C.; DURAN, H. A.; PODHAJECER, O. L. **The tumor microenvironment: Characterization, redox considerations, and novel approaches for reactive oxygen species-targeted gene therapy.** Antioxidants and Redox Signaling, 19(8), 854–895, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4367>

POLLONI, L., COSTA, T. R., MORAIS, L. P., BORGES, B. C., TEIXEIRA, S. C., DE MELO FERNANDES, T. A., CORREIA, L. I. V. *et al.* **Oxidative stress induced by Pollonein-LAAO, a new L-amino acid oxidase from Bothrops moojeni venom, prompts prostate tumor spheroid cell death and impairs the cellular invasion process in vitro.** Cellular signalling, 109, 110785, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2023.110785>

RIBEIRO, P. H.; RIBEIRO, P. H.; ZULIANI, P. J.; FERNANDES, C. F. C.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; NOMIZO, N.; SOARES, M. A. **Mechanism of the cytotoxic effect of l-amino acid oxidase isolated from Bothrops alternatus snake venom.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 92, p. 329–337, nov. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.022>

RODRIGUES, R. S.; DA SILVA, J. F.; FRANÇA, J. B.; FONSECA, F. P. P.; OTAVIANO, A. R.; SILVA, F. H.; HAMAGUCHI, A. *et al.* **Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new l-amino acid oxidase isolated from Bothrops pauloensis snake venom.** Biochimie, v. 91, n. 4, p. 490–501, abr. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.12.004>

SALAMA, W. H.; ABD-RABOU, A. A.; BASSUINY, R. I.; HAKIM, A. E. E.; SHAHEIN, Y. E. **Exploration of antimicrobial and anticancer activities of L-amino acid oxidase from Egyptian Naja haje venom.** Toxicon, v. 242, p. 107708–107708, 1 maio 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2024.107708>.

SANTOS, M. F.; GHISLA, S.; OUCHIDA, A. T.; AISSA, A. F.; COELHO, M. G. B.; COSTA, T. R. *et al.* **Purification and characterization of LAAO, a new L-amino acid oxidase from the venom of the snake Pollachius pollachius.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 86, p. 768–775, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.069>.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. **ROS function in redox signaling and oxidative stress.** Current biology: CB, 24(10), R453–R462, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>.

SERRANO, S. M. T. **The long road of research on snake venom serine proteinases.** Toxicon, v. 62, p. 19–26, fev. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.003>

SILVA, Í.; CRISTINE, Í. **Neutrófilos: aspectos clássicos, plasticidade e novas funções imunorregulatórias neutrophils: classical aspects, plasticity and new immunoregulatory functions.** 35 Monografia. Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais, v. 7, n. único, p. 35-46, 2015. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/11/964819/2872-8861-1-sm.pdf>.

SINGH, R. R.; REINDL, K. M. **Glutathione S-Transferases in Cancer.** Antioxidants 2021,10,701. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox10050701>

SNEZHKINA, A. V.; KUDRYAVTSEVA, A. V.; KARDYMON, O.L.; SAVVATEEVA, V.M.; MELNIKOVA, N.V.; KRASNOV, G.S.; DMITRIEV, A.A. **ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2019, p. 6175804, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2019/6175804>.

STÁBELI, R. G.; SANT'ANA, C. D.; RIBEIRO, P. H.; COSTA, T. R.; TICLI, F. K.; PIRES, M. G. *et al.* **Cytotoxic l-amino acid oxidase from Bothrops moojeni: Biochemical and functional characterization.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 41, n. 2, p. 132–140, jul. 2007. Disponível em:

STRATTON, M.; CAMPBELL, P.; FUTREAL, P. **The cancer genome**. Nature 458, 719–724, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature07943>

TAN, K. K.; BAY, B. H.; GOPALAKRISHNAKONE, P. **L-amino acid oxidase from snake venom and its anticancer potential**. Toxicon, v. 144, p. 7–13, mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.01.015>

TOMASETTI, C.; LI, L.; VOGELSTEIN, B. **Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention**. Science, v. 355, n. 6331, p. 1330–1334, 23 mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aaf9011>

TORTORA, G; DERRICKSON, B. **Princípios de anatomia humana**. 12a. edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2016.

TOYOKUNI, S.; OKAMOTO, K.; YODOI, J.; HIAI, H. **Persistent oxidative stress in cancer**. *FEBS letters*, 358(1), 1–3, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01368-b](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01368-b)

ULLAH, Anwar. **Structure-Function Studies and Mechanism of Action of Snake Venom L-Amino Acid Oxidases**. *Frontiers in pharmacology*, 11, 110, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00110>

VYAS, V. K.; BRAHMBHATT, K.; BHATT, H.; PARMAR, U. **Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives**. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(2), 156–162, 2013. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60042-8](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60042-8)

WANG Y.; QI, H.; LIU, Y.; DUAN, C.; LIU, X.; XIA, T.; CHEN, D.; PIAO, H.L.; LIU, H.X.. **The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy**. *Theranostics* 2021; 11(10):4839-4857. doi:10.7150/thno.56747.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Câncer**. Geneva: WHO, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 29 ago. 2023.

ZHONG, J.; TANG, Y. **Research progress on the role of reactive oxygen species in the initiation, development and treatment of breast cancer**. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1 fev. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2024.02.005>