

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Caracterização Bioquímica e Funcional de uma Nova
L-Aminoácido Oxidase Isolada da Peçonha da
Serpente *Bothrops pirajai***

Luiz Fernando Moreira Izidoro

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica)

Uberlândia-MG
Fevereiro/2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Caracterização Bioquímica e Funcional de uma Nova
L-Aminoácido Oxidase Isolada da Peçonha da
Serpente *Bothrops pirajai***

Luiz Fernando Moreira Izidoro

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica)

Uberlândia-MG
Fevereiro/2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

I98c Izidoro, Luiz Fernando Moreira, 1970-
Caracterização bioquímica e funcional de uma nova L-aminoácido
oxidase isolada da peçonha de serpente *Bothrops pirajai* / Luiz Fernando
Moreira Izidoro. - 2007.
56 f. : il.

Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Cobra venenosa - Veneno - Teses. 2. Bothrops - Teses. I.
Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues. II. Universidade Federal
de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica. III. Título.

CDU: 615.919:598.126

Apresentação

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Luiz Fernando Moreira Izidoro

**Caracterização Bioquímica e Funcional de uma Nova
L-Aminoácido Oxidase Isolada da Peçonha da
Serpente *Bothrops pirajai***

Comissão Examinadora:

Presidente:

Dra: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Examinadores:

Data da Defesa: ____/____/____

As sugestões da Comissão Examinadora e as normas da PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

“Nada na vida é para ser temido; é apenas para ser compreendido”

Marie Curie

Dedicatória

Ao meu Deus, que é meu SENHOR, o meu rochedo, o meu lugar forte, o meu libertador; a minha fortaleza, em quem confio; o meu escudo, a força da minha salvação, e o meu alto refúgio.

AGRADECIMENTOS

✧ Agradeço aos meus amigos ausentes.

✧ Agradeço aos professores e funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica.

✧ Ao meu amigo Luiz Carlos, por todos os conselhos, troca de experiências, favores prestados, enfim... obrigado pela sua amizade que é tão importante para mim.

✧ Ao Dr Antonio Roberto, sempre bem disposto a ajudar todos.

✧ À Renata, sempre presente em minha vida, até nos piores momentos. Vivemos muitas coisas em comum, aprendemos muito juntos, erramos muito também, sentirei saudades...

✧ À Johara, sempre tão carismática, tornando o ambiente muito mais feliz, gosto de ser seu amigo.

✧ Aos meninos Luiz Henrique, Jordano, Fabio Lucas, Léo, Carol, Daiana e a todos os outros dos quais eu me esqueci...obrigado.

✧ À Luciana, pela sua luz e pelo seu carinho dedicado a mim.

✧ À Mirian por tudo que já conversamos, por tudo que me ensinou e me ajudou, você é única sempre.

✧ À Dra Deise Aparecida pela dedicação e orientação.

✧ À Professora Dra Amélia Hamaguchi pelos longos anos de convivência e ensinamentos.

✧ Ao Professor e co-orientador Dr Andreimar, que foi fundamental na realização deste trabalho.

✧ À Professora Dra Hérica, sempre amiga e interessada em ajudar a resolver os problemas dos alunos.

✧ À professora Dra Maria Inês, também pelos longos anos de convivência, ensinamentos, orientação e sempre disposta a nos ouvir.

✧ À Professora Dra Veridiana por tudo de bom que sempre me passou, por tudo que me ajudou e me incentivou. Você esteve presente em minha vida até quando não tinha condições físicas. Com você eu fui descobrindo o que era a bioquímica, por isso se tornou

minha mestra, doutora e orientadora de bancada e conselhos. Nossa relação Orientador/Aluno/Amigo se confundiu ao longo de todos esses anos. **Obrigado por tudo.**

✍ Agradeço à minha família pelo apoio e sempre por acreditarem em mim.

À minha namorada Fabiana, pessoa de coração imenso sempre presente em minha vida, e que torce por mim.

**Me sinto tão estranho aqui
Que mal posso me mexer, irmão
No meio dessa confusão
Não consigo encontrar ninguém
Onde foi que você se meteu, então?
To tentando te encontrar
To tentando me encontrar,
As coisas são assim**

**Me sinto tão estranho aqui,
Diferente de você, irmão
A sua forma e distorção
Não pareço com ninguém, sei lá
Pois eu sei que nós temos o mesmo destino, então...
Quem de nós vai insistir, e não
Se entregar sem resistir, então
Já não há mais pra onde ir
Se entregar à solidão e não...**

DETONAUTAS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais da Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação da Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.

Sumário

Apresentação.....	1
Capítulo I: Acidentes Ofídicos e os Aspectos Estruturais e Funcionais de L-Aminoácido Oxidases Isoladas das Peçonhas de Serpentes.....	5
1- Características gerais das serpentes e do envenenamento.....	6
2- Composição das peçonhas de serpentes botrópicas.....	7
3- Características enzimáticas e estruturais das LAAOs.....	8
4- Características funcionais das L-aminoácido oxidases.....	15
5- Referências Bibliográficas.....	19
Capítulo II: Biochemical and Functional Characterization of an L-Amino Acid Oxidase Isolated from <i>Bothrops pirajai</i> Snake Venom.....	28
Abstract.....	30
Keywords.....	30
1- Introduction.....	31
2- Results and Discussion.....	32
2.1- Purification and biochemical characterization.....	32

2.2- Functional characterization of BpirLAAO-I.....	36
3- Materials and Methods.....	45
3.1- Reagents and venom.....	45
3.2- L- Amino acid oxidase purification and purity analysis.....	45
3.3- Protein determination and L-amino acid oxidase.....	46
3.4- Biochemical characterization.....	47
3.5- N-terminal amino acid sequence.....	47
3.6- Circular dichroism (CD) analysis.....	47
3.7- Pharmacoligical assays.....	48
3.7.1- Platelet aggregation.....	48
3.7.2- Edema inducing activity.....	49
3.8- Cytotoxic assays.....	49
3.8.1- Bactericidal assays.....	49
3.8.2- Cytotoxic effects of the BpirLAAO-I on <i>Leishmania</i>	49
3.8.3- Tumor cells and macrophages.....	50
3.8.4- Cancer cell lines culture and tumor.....	51
3.9- DNA fragmentation assay.....	52

3.10- Statistical analysis.....	52
Acknowledgments.....	53
References and notes.....	54

Lista de Figuras

Capítulo I:

1- Reação química catalisada pelas L-aminoácido oxidases.....	9
2- Comparação da sequência N-terminal da LAAO isolada.....	10
3- Estéreo visão do sítio catalítico mostrando uma interação.....	12

Capítulo II:

1- Isolation of BpirLAAO-I.....	33
2- Purity analysis of BpirLAAO-I.....	35
3- Comparison of the sequence N-terminal amino.....	37
4- Pharmacological activity of BpirLAAO-I.....	39
5- Microbicidal activity of BpirLAAO-I.....	41
6- Cytotoxic activity of BpirLAAO-I.....	43
7- DNA fragmentation assay.....	44

Lista de Tabelas

1- Substrate specificity of BpirLAAO-I.....	38
---	----

Lista de abreviaturas

FAD: Flavina adenina dinucleotídeo

FMN: Flavina mononucleotídeo

LAAO: L-aminoácido oxidase

PAGE-SDS: Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio

PGNase F: Peptídeo N-glicosidase

SV-LAAO: L-aminoácido oxidase da peçonha de serpente

PMSF: Fenil metil sulfonil fluorido

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra acético

Ao longo da história da civilização, as serpentes peçonhentas sempre exerceram sobre os homens algum tipo de influência, seja na arte, na religião ou ainda na ciência. Apesar de serem vistas de maneira totalmente destrutiva por muitas comunidades, elas são de fundamental importância no controle de diversas pragas que afetam a vida do homem, como os ratos. A grande maioria dos acidentes ofídicos relatados é com vítimas oriundas do meio rural que na maioria das vezes foram atacadas acidentalmente. O quadro clínico desenvolvido por um acidentado pode ser muito variado, dependendo da quantidade de peçonha que foi inoculada, da localização da picada, da idade da serpente e principalmente do tempo decorrido entre o acidente e o atendimento médico. Devido às crenças populares, muitas vítimas após a picada fazem uso de tratamentos alternativos como sugar o local, fazer sangrias, usar torniquetes, ou uso tópico de querosene, pó-de-café, álcool, fumo, ovo ou vinagre, o que pode muitas vezes agravar ainda mais o quadro clínico do paciente. As peçonhas de serpentes de uma forma geral são constituídas por uma grande variedade de proteínas com efeitos tóxicos que podem atuar de forma isolada ou sinérgica potencializando ainda mais os danos teciduais locais ou sistêmicos. Por conta da incidência dos acidentes e da intensidade com que as peçonhas atuam nos organismos vivos, as picadas de serpentes são consideradas como problema de saúde pública pelo Ministério da Saúde.

O interesse pelo estudo das características químicas e funcionais de toxinas isoladas de peçonhas ofídicas não é devido somente à sua relevância no envenenamento, mas também pela sua possível utilização como valiosos instrumentos de pesquisa em outras áreas do conhecimento. Estudos farmacológicos e bioquímicos das peçonhas de serpentes, realizados nas últimas três ou quatro décadas, têm mostrado a riqueza de enzimas, toxinas, compostos biologicamente ativos, e a grande diversidade de suas ações. Conseqüentemente, numerosas tentativas vêm sendo realizadas para utilizar esses compostos como ferramentas para pesquisas na área médica. Com relevância, evidenciam-se os trabalhos da descoberta da bradicinina como peptídeo hipotensor liberado pelo veneno de *Bothrops jararaca* o qual foi uma das mais importantes contribuições derivada de pesquisas na área da Toxinologia, o que possibilitou o desenvolvimento de medicamentos anti-

hipertensivos como exemplo o Captopril® que atua na inibição da enzima conversora de angiotensina.

As alterações da coagulação sanguínea, causadas por peçonhas ofídicas, também têm sido alvo de muitas pesquisas desde a década de 60 no Brasil. Isto se deve não somente ao alto índice de acidentes ofídicos, mas também por se tornarem estes venenos instrumentos no estudo dos processos complexos envolvidos na coagulação. São utilizados também como auxiliares nos diagnósticos clínicos, além de agentes terapêuticos para provocar a desfibrinogenação no tratamento das trombozes. A batroxobina, uma enzima coagulante, tipo trombina, de massa molecular 37.000 Da, purificada do veneno de *Bothrops atrox* por Stocker & Barlow em 1976, tem sido muito utilizada como agente terapêutico na prevenção e tratamento de desordens trombóticas, infarto do miocárdio, embolia pulmonar e glomerulonefrite.

Nas peçonhas de serpentes existe uma classe de enzimas, as L -aminoácido oxidases (LAAOs, EC 1.4.3.2), que particularmente vem atraindo a atenção da comunidade científica devido à sua grande versatilidade funcional. Encontradas em altas concentrações em algumas peçonhas, contribuem para o aumento da sua toxicidade, induzindo alterações na função plaquetária, efeitos locais e outros. São capazes de induzir apoptose em diversas linhagens de células humanas, bem como efeito antimicrobiano, antiparasitário e também anti-HIV. Sendo assim, a elucidação dos mecanismos de ação desta classe de enzimas abre perspectivas para uma possível utilização futura dessas toxinas como modelos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos.

A apresentação deste trabalho foi realizada seguindo as normas do curso de Pós- Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia-MG, sendo dividido em dois capítulos. O **Capítulo I** é uma revisão bibliográfica da literatura envolvendo aspectos gerais sobre o envenenamento ofídico e composição de suas peçonhas, dando enfoque principal às L -aminoácido oxidases em relação às características estruturais e funcionais. O **capítulo II** apresenta um artigo sobre as características estruturais e funcionais de uma nova L -aminoácido oxidase isolada da peçonha de *Bothrops pirajai*, cujo título é “**Biochemical and Functional Characterization of an L -Amino Acid Oxidase Isolated from *Bothrops***

***pirajai* Snake Venom**", publicado na revista **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, volume 14, páginas 7034-7043, em outubro de 2006.

Capítulo I

Acidentes Ofídicos e os Aspectos Estruturais e Funcionais de L-aminoácido oxidases Isoladas de Peçonhas de Serpentes

1- Características Gerais das Serpentes e do Envenenamento

As peçonhas animais são fontes importantes de proteínas com alta capacidade de adaptação ao meio ambiente. São produzidas por representantes de várias espécies animais, incluindo aranhas, abelhas, escorpiões, medusas, celenterados, serpentes e outros. As serpentes são subdivididas em peçonhentas e não peçonhentas. As denominadas como peçonhentas são aquelas providas de glândulas produtoras e armazenadoras da peçonha, bem como do aparelho apropriado para a sua inoculação.

Existem atualmente cerca de 2900 espécies de serpentes no mundo, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias. Na fauna ofídica brasileira há 9 famílias, 75 gêneros e 321 espécies correspondendo a 10% do total de espécies conhecidas (Cardoso, 2003). A maioria destas espécies está distribuída em quatro famílias principais: Colubridae (189 espécies), Boidae (10 espécies), Viperidae (22 espécies) e Elapidae (18 espécies) (Romano e Hoge, 2000). As espécies de serpentes peçonhentas brasileiras estão reunidas principalmente em duas famílias, Elapidae e Viperidae. Dentro da família Elapidae está o gênero *Micrurus* que compreende as serpentes conhecidas como corais. A família Viperidae possui três gêneros: *Crotalus* que compreende as cascavéis, o gênero *Bothrops* que engloba as serpentes conhecidas como jararacas e o gênero *Lachesis* que representa as surucucus (Cardoso, 2003). Existem no Brasil 17 espécies de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* (Cardoso, 2003), as quais são responsáveis por aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos notificados em todo o território nacional (Brasil, 2001).

O envenenamento botrópico caracteriza-se por exercer pronunciados efeitos no local da picada; nos primeiros 30 minutos após a picada ocorrem dor, hemorragia, edema, eritema e calor. A dor é imediata, de intensidade variável, podendo ser o único sintoma. O edema progressivo, acompanhado de calor e rubor, pode estar ausente no início, mas instala-se nas primeiras seis horas. Sua intensidade é variável, aumentando principalmente no primeiro dia. Sangramentos no local da picada são freqüentes. A instalação de bolhas, equimoses e necroses geralmente ocorrem 12 horas após o acidente, podendo então surgir complicações infecciosas. Existe relação direta entre a

sintomatologia local e a quantidade de veneno inoculado, os casos mais graves ocorrendo, em geral, entre os pacientes nas faixas etárias mais elevadas (Rosenfeld, 1971; Cardoso, 1990; França e Fan, 1992; Jorge et al., 1994; Jorge e Ribeiro, 1997; Brasil, 2001). Com a evolução do quadro clínico da vítima surgem também os efeitos classificados como sistêmicos envolvendo as hemorragias, como gengivorragia, epistaxes, sangramentos em ferimentos cutâneos pré-existentes, hematúria e acidentes vasculares cerebrais hemorrágicos (Rosenfeld, 1971; Cardoso, 1990; França e Fan, 1992; Brasil, 2001). Outras manifestações sistêmicas ditas inespecíficas também podem fazer parte da sintomatologia da vítima, como por exemplo; náuseas, vômitos, cefaléia, dores abdominais, diarreia, sudorese, hipotensão arterial que é considerado prenúncio de choque hipovolêmico, além de outras consideradas muito graves, como insuficiência renal aguda (IRA) por ação direta da peçonha. A evolução deste quadro clínico depende do tempo decorrido entre o acidente e o atendimento médico. (Rosenfeld, 1971; Cardoso, 1990; França e Fan, 1992; Brasil, 2001).

Dentre as serpentes botrópicas responsáveis pela maioria dos acidentes acontecidos no Brasil, a *Bothrops pirajai*, descrita por Amaral em 1923 contribuiu para o aumento da estatística. Esta espécie encontra-se na região de Ilhéus e Itabuna na Bahia, mas foi encontrada também em Monte Santo, entre os rios Itapicuru e São Francisco-Bahia. Há registros de sua ocorrência também no nordeste do estado de Minas Gerais (Campbell e Lamar, 1989).

2- Composição das Peçonhas de Serpentes Botrópicas

Ao longo da escala evolutiva, a saliva das serpentes foi sofrendo transformações químicas, adquirindo potencial de neutralizar e digerir suas presas, bem como mecanismo de defesa contra agentes agressores. Qualitativamente, as peçonhas de serpentes são compostas de uma mistura de moléculas de natureza protéica com ou sem atividade catalítica, como fosfolipases A_2 , proteases, hialuronidases, L -aminoácido oxidases, acetilcolinesterases, fatores de crescimento, ativadores de proteína C, lectinas, e proteínas ligantes do fator de von Willebrand; peptídios, representados principalmente por potencializadores de bradicinina e desintegrinas; compostos orgânicos de baixo peso molecular como carboidratos, serotonina, histamina,

citrato e nucleosídeos; íons inorgânicos como o cálcio, cobalto, magnésio, cobre, ferro, potássio bem como os inibidores enzimáticos (Ramos e Selistre-de-Araújo, 2006).

As proteínas são majoritárias, perfazendo aproximadamente 90% do peso seco das peçonhas, podendo sofrer variação quantitativa quando comparadas às espécies (Dalmora et al., 1992).

De acordo com características estruturais e funcionais, as proteínas tóxicas presentes na peçonha das serpentes do gênero *Bothrops* podem ser divididas em várias classes, tais como: metaloproteinases, serinoproteases, fosfolipases A₂, L-aminoácido oxidases, etc; agindo sempre de forma isolada ou sinérgica no organismo de suas vítimas (Ramos e Selistre-de-Araújo, 2006). Dentre elas destacamos as LAAOs (EC 1.4.3.2) que são enzimas com grande interesse na área científica, por apresentarem um alto potencial de degradação sobre diversos patógenos, várias linhagens de celulares, fungos, vírus e outros. Esta versátil classe de enzimas está amplamente distribuída em várias espécies de seres vivos, como nas peçonhas de serpentes, insetos, fungos (Du e Clemetson, 2002), bactérias (Izidoro et al., 2006) e até mesmo plantas, onde um de seus produtos de catálise, a amônia é utilizada como fonte de nitrogênio, essencial no desenvolvimento da mesma (Nishizawa et al., 2005).

3- Características Enzimáticas e Estruturais das LAAOs de Peçonhas Ofídicas

As L-aminoácido oxidases (LAAOs, EC 1.4.3.2) são enzimas encontradas em diferentes organismos vivos, pertencem à classe das oxidorredutases e catalisam a desaminação oxidativa estereoespecífica de L-aminoácidos. Durante sua meia reação de redução, o substrato aminoácido é oxidado até iminoácido, com uma concomitante redução do cofator flavina (Flavina Adenina Dinucleotídeo, FAD). O iminoácido sofre uma hidrólise não enzimática originando α -cetoácido e amônia. Uma outra meia reação oxidativa completa o ciclo catalítico reoxidando o FADH₂ com oxigênio molecular, gerando assim o peróxido de hidrogênio (Moustafa et al., 2006), conforme esquema descrito na Figura 1.

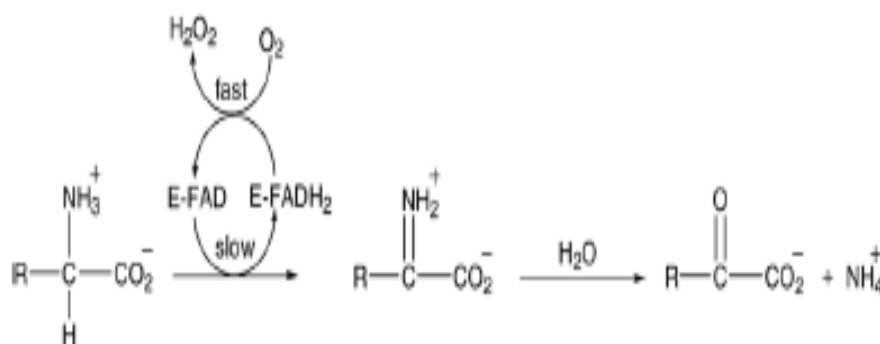


Fig. 1: Reação química catalisada pelas L -aminoácido oxidases (LAAOs). Os produtos desta reação são um iminoácido, como intermediário, seguido de uma hidrólise espontânea, gerando assim um α -cetoácido e amônia. Os elétrons retirados durante a reação de desidrogenação catalisada pela LAAO sobre o L -aminoácido, reduzem o grupo prostético FAD da enzima, convertendo-o em FADH_2 , que posteriormente reduz oxigênio molecular até peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxidando novamente a molécula de FADH_2 , fazendo com que a enzima sofra regeneração (Geyer et al., 2001).

As LAAOs apresentam especificidade catalítica preferencial por L -aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos como L -fenilalanina, L -triptofano, L -tirosina e L -leucina. Já a afinidade pelos polares e básicos é bem mais reduzida. Aqueles carregados positivamente como L -lisina e L -arginina fazem interação eletrostática desfavorável com a Arg_{322} do sítio catalítico da enzima (Moustafa et al., 2006). São consideradas flavoenzimas, por apresentarem como grupo prostético a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) ou flavina mononucleotídeo (FMN) (Iwanaga e Suzuki, 1979; Butzke et al., 2005). Este cofator encontra-se mergulhado profundamente dentro da enzima através de interações fortes com os átomos da proteína e moléculas de água conservadas unidas por pontes de hidrogênio (Pawelek et al., 2000). A coloração amarela das peçonhas viperídeas está relacionada com a presença de riboflavina que faz parte do grupo prostético (FAD ou FMN) das LAAOs, o que facilita sua purificação (Takatsuka et al., 2001; Manrique, 2005).

A seqüência N-terminal das LAAOs das peçonhas de serpentes apresentam uma alta homologia entre si (Torri et al., 1997; Raibekas e Massey, 1998; Souza et al., 1999; Ali et al., 2000; Stábeli et al., 2004; Toyama et al., 2006; Izidoro et al., 2006).

As composições em aminoácidos das LAAOs não diferem muito entre si, sendo bem caracterizada uma abundância de resíduos de asparagina, ácido aspártico, glutamina e ácido glutâmico. Outros resíduos em menores quantidades como metionina, triptofano e cisteína também são observados (Ali et al., 2000).

A sequência deduzida por cDNA de várias LAAOs de serpentes revelaram a existência na região N-terminal dessas proteínas de um domínio $\beta\alpha\beta$ altamente conservado e rico em resíduos de ácido glutâmico (Figura 2). Este domínio possivelmente é um sítio de ligação do cofator FAD, fundamental na geração do peróxido de hidrogênio (Raibekas e Massey, 1998; Macheroux et al., 2000).

ACL LAO	A	D	S	R	N	P	L	E	E	E	F	R	-	E	T	N	Y	E	E	F
<i>C. rhodostoma</i>	A	D	D	R	N	P	L	A	E	E	S	G	-	E	N	N	Y	E	E	F
<i>O. hannah</i>	S	V	I	-	N	-	L	-	E	E	S	F	Q	E	P	E	Y	E		
<i>C. atrox</i>	A	H	D	R	N	P	L	-	E	E	X	F	R	E	T	D	Y	E	E	F

Fig. 02: Comparação da sequência N-terminal da LAAO de *Agkistrodon contortrix laticinctus* com outras LAAOs isoladas de *Calloselasma rhodostoma*, *Ophiphagus hannah* e *Crotalus atrox*. Os resíduos glutâmicos conservados em todas as sequências analisadas estão em negrito, bem como as deleções por traços (Souza et al., 1999).

As LAAOs das peçonhas ofídicas geralmente apresentam estruturas diméricas, sendo que uma subunidade se mantém unida a outra por ligações não covalentes. Cada monômero contém 15 estruturas em α -hélices e 22 em β -pregueada distribuídas em três domínios: um domínio ligante do substrato, outro ligante de FAD e um terceiro helicoidal, sendo que na interface entre o domínio ligante de substrato e o helicoidal há uma distância de 25Å formando um sulco que chega até o sítio ativo, provavelmente utilizado para liberação do produto. A estrutura do domínio ligante de FAD consiste de três regiões descontínuas entre os resíduos 35-64, 242-318 e 446-486. O domínio ligante de substrato é composto pelos seguintes resíduos de aminoácidos 5-25, 73-129, 233- 236 e 323-420, enquanto o domínio helicoidal é composto dos resíduos 130-230 (Pawelek et al., 2000).

Análises na superfície da LAAO de *Calloselasma rhodostoma* mostraram que sítio ativo é uma longa reentrância em formato de Y o qual permite o encaixe do substrato à enzima, de forma que em uma das porções deste canal acontece a entrada de O₂ e pelo outro acontece a liberação dos produtos (Moustafa, et al., 2006). Segundo os mesmos autores o sítio ativo é dinâmico e pode sofrer alterações conformacionais devido à presença de dois resíduos de aminoácidos, His₂₂₃ e Arg₃₂₂. Ambos os resíduos estão localizados ao longo do caminho de entrada para o substrato até ao centro ativo. Esses aminoácidos podem assumir dois tipos diferentes de conformação (A e B), sendo que a His₂₂₃ encontra-se 40% na conformação tipo A e 60% na forma B. A His₂₂₃ na conformação A tem seu grupo imidazólico da cadeia lateral preso com auxílio de uma molécula de água por meio de pontes de hidrogênio com seus vizinhos Glu₂₀₉ e Ser₂₂₀. Na conformação B, seu anel imidazólico é ligado a um grupamento fenil vizinho a uma distancia de 3,1Å. A falta de interações tipo pontes de hidrogênio entre cadeias laterais com seus vizinhos aumenta a mobilidade deste resíduo. Os movimentos do anel imidazólico da cadeia lateral provavelmente estão relacionados com o mecanismo de desprotonação do substrato.

Mudanças conformacionais menos importantes são observadas para a Arg₃₂₂. Os dois tipos de conformação da arginina diferem entre si na posição dos carbonos C^γ e C^δ em função dos ângulos, - 84° para a conformação A e 73° para a B. Já a posição do grupamento guanidina da cadeia lateral é similar em ambas as conformações, com o N^ε preso por meio de pontes de hidrogênio com a hidroxila da Thr₄₃₂. O grupo guanidina também pode interagir com a cadeia lateral dos aminoácidos Glu₂₀₉ e Glu₂₁₉, tornando-os estáveis. Os movimentos observados na cadeia lateral de His₂₂₃ e Arg₃₂₂ podem estar relacionados com a ligação e liberação de substrato e produto, respectivamente. Segundo Moustafa et al. (2006), no momento da ligação do substrato ao sítio catalítico da enzima, a His₂₂₃ assume a conformação A, bloqueando a entrada de oxigênio, permitindo assim a entrada de substrato. Quando a reação química acontece, His₂₂₃ assume novamente a conformação B, desbloqueando a entrada de oxigênio para liberar o produto. Já os movimentos na cadeia lateral que mudam a conformação de Arg₃₂₂ da forma A

para B são favoráveis para que aconteçam interações hidrofóbicas entre a porção alifática da cadeia lateral do aminoácido da enzima e o anel aromático do substrato. Após a reação enzimática ter ocorrido, a conformação volta novamente de B para A facilitando a liberação do produto.

A interação do substrato com o sítio ativo da enzima é mediada pelo grupo guanidina da Arg₉₀ e pontes de hidrogênio com a hidroxila da Tyr₃₇₂. O grupamento amino do substrato faz pontes de hidrogênio com o átomo de oxigênio da carbonila do resíduo de Gly₄₆₄, em seguida as cadeias laterais dos ligantes envolvidos interagem de forma hidrofóbica com a cadeia lateral de Ile₄₃₀ e Ile₃₇₄ e Phe₂₂₇. Um dos dois átomos de oxigênio do grupo carboxílico do substrato se envolve com uma molécula de água por pontes de hidrogênio com a flavina N-5, assim como o grupo amino da cadeia lateral da Lys₃₂₆, com isso o carbono^α sofrerá o ataque oxidativo, Figura 3.

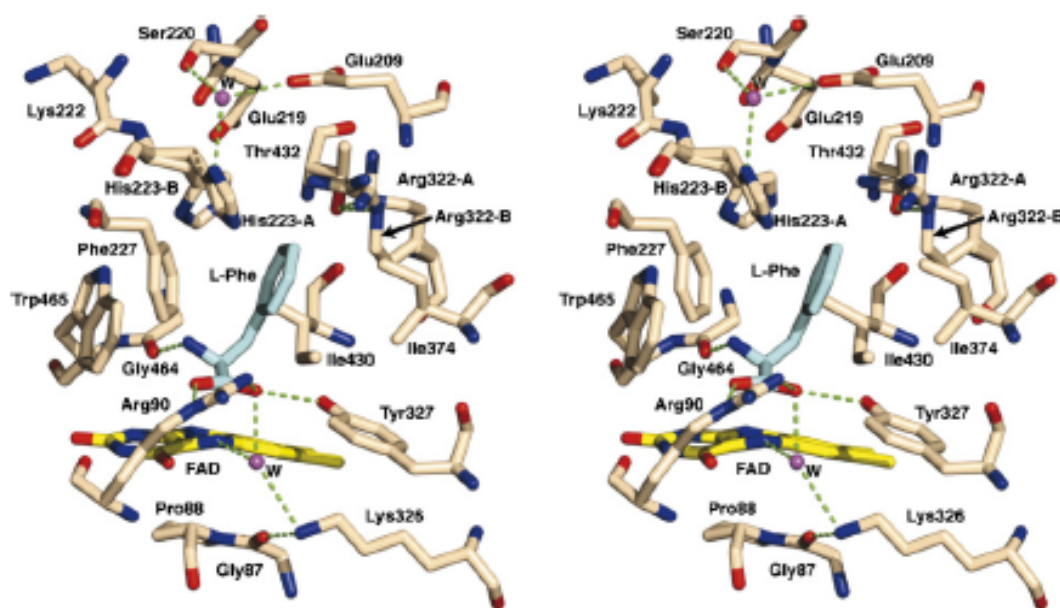


Fig. 3: Estéreo visão do sítio catalítico mostrando uma interação entre LAAO e L-fenilalanina. As conformações alternativas de His223 e Arg322 são designadas como A e B. Pontes de hidrogênio estão sendo mostradas em linhas tracejadas. O substrato é mostrado em ligações cinzentas, FAD em azul e amarelo. Moléculas de água em esferas na cor magenta e simbolizadas como W (Moustafa et al., 2006).

Análises da estrutura da LAAO de *Calloselasma rhodostoma* (Pawelek et al., 2000) por cristalografia de raio-X revelaram a presença de dois sítios de glicosilação na molécula; um no resíduo de Asn₁₇₂ o qual encontra-se

localizado em uma região de “loop” entre as α hélices 5 e 6 na região do domínio helicoidal e outro Asn₃₆₁ também na região de “loop”, porém entre β 18 e β 19 na região do domínio ligante de substrato. Estes são considerados específicos para a ligação de resíduos de açúcar.

As LAAOs representam um percentual da peçonha bruta relativamente variado de acordo com cada espécie: *Calloselasma rhodostoma*, 30% (Ponnudurai et al., 1994); *Agkistrodon contortrix laticinctus*, 5% (Souza et al., 1999); *Bothrops alternatus*, 1% (Stábeli et al., 2004); *Crotalus durissus cascavella*, 0,28% (Toyama et al., 2006). Essas enzimas quando analisadas em condições não desnaturantes usualmente são homodiméricas, unidas por ligações não covalentes e com massas moleculares aproximadamente 110-150 kDa como a ACL-LAO isolada da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus* por Souza et al. (1999); TM-LAO purificada da serpente *Trimeresurus mucrosquamatus* por Ji-Fu et al. (2002); Balt-LAAO-I da serpente *Bothrops alternatus* por Stábeli et al. (2004); Casca LAO isolada da serpente *Crotalus durissus cascavella*, purificada por Toyama et al., (2006). Quando analisadas em condições desnaturantes ou por espectrometria de massa (MALDI-TOF) a massa de cada monômero dessas enzimas está em torno de 50-70 kDa (Zhang et al., 2004; Butzke et al., 2005; Tonismagi et al., 2006; Izidoro et al., 2006). Esta variação nas massas moleculares pode estar relacionada com os sítios de glicosilação, uma vez que estas enzimas são consideradas glicoproteínas (Ji-Fu, 2002).

Alguns carboidratos como fucose, manose, galactose, N-acetil glicosamina e ácido siálico já foram identificados nessas enzimas perfazendo um total de aproximadamente 5,4 % da proteína (De Kok e Rawitch, 1969; Solis et al. 1999; Ali et al., 2000; Manrique, 2005). Estes oligossacarídeos aderidos à enzima através de ligação N-glicosídica provavelmente modulam suas propriedades físico químicas, aumentando sua solubilidade e viscosidade bem como mantendo a estabilidade das cargas elétricas da proteína (Butzke et al., 2005; Manrique, 2005). Alguns estudos demonstraram que após ensaios de desglicosilação utilizando as enzimas o-glicosidase e PGNase F, algumas LAAOs não perdiam sua atividade catalítica, sugerindo que a função dos carboidratos na enzima é apenas estrutural, ou uma proteção da enzima contra

proteólise, já que as peçonhas de serpentes são ricas em enzimas proteolíticas (Dos Santos et al., 1993; Stábeli et al., 2004; Izidoro et al. 2006).

As α -aminoácido oxidases até agora descritas apresentam pontos isoelétricos acima de 4,4 (Souza et al., 1999; Stábeli et al., 2004; Toyama et al., 2006; Izidoro et al., 2006) até 8,4 (Tan e Swaminathan, 1992). A maioria delas apresenta caráter variavelmente ácido, exceções a LAAO de *Trimeresurus flavoviridis* com pI 8,4 (Nakano et al., 1972), e a LAAO de *Naja naja kaouthia* pI 8,12 (Sakurai et al., 2001). Muitas vezes a mesma peçonha pode apresentar isoformas da mesma LAAO (Stiles et al., 1991), podendo ser ácidas, neutras ou básicas. Esta diferenciação na densidade das cargas poderá alterar suas atividades farmacológicas, conforme acontece com outras enzimas de peçonhas ofídicas.

Estas enzimas apresentam variações na estabilidade e especificidade em relação à composição do tampão, valor do pH, temperatura ideal de ensaio e afinidade por seus substratos (Macheroux et al., 2001). Segundo esses autores ao longo dos anos 60 e 70 a inativação reversível induzida por alterações no pH e temperatura foi assunto bastante discutido, com isso eles concluíram que a diminuição ou perda de atividade das LAAOs poderia se dar por congelamento em temperaturas inferiores a -20°C ou alterações nos valores do pH para valores distantes da neutralidade. O processo de ativação/inativação das LAAOs pelo efeito de baixas temperaturas e valores extremos de pH estão relacionados com alterações conformacionais do FAD, que podem ser observadas por deslocamentos no espectro de absorção do cofator (Macheroux et al., 2001; Izidoro et al., 2006).

A atividade específica de cada LAAO está relacionada a um pH ideal para cada tipo de aminoácido (Page e Van Etten, 1971). Paik e Kim (1965) estudaram amplamente a relação existente entre pH e substrato e encontraram diferentes curvas de pH, dependendo do aminoácido usado como substrato. Solis et al. (1999) também encontraram resultados semelhantes com diferentes curvas de pH com a LAAO de *Bothrops brazili*, usando como substratos α -leucina, α -metionina, α -fenilalanina e α -arginina em pH ótimo de 8,5. Já com α -isoleucina, α -triptofano, e α -lisina os valores de pH ideais foram 8,0, 7,5 e 9,0 respectivamente. Os diferentes perfis de especificidade em relação ao substrato e pH estão relacionados com o comportamento ácido-base da

enzima frente ao aminoácido. Em determinados valores de pH, tanto a enzima quanto o substrato se encontram em equilíbrio iônico, permitindo um melhor encaixe do substrato com o sítio ativo da enzima, com isso a oxidação é máxima (Manrique, 2005).

A estabilidade de algumas LAAOs já foram testadas na presença de íons metálicos, inibidores enzimáticos, como PMSF e EDTA, bem como da glutathione. Manrique (2005) demonstrou a capacidade inibitória da glutathione, um tripeptídeo formado pelos resíduos de glicina, glutamato e cisteína, sobre a atividade das LAAOs isoladas das peçonhas de *Lachesis muta* e *Bothrops brazili*. A glutathione é uma molécula que está presente em virtualmente todas as células, em geral em altas concentrações. Ela provavelmente garante a manutenção dos grupos sulfidril das proteínas em estado reduzido, bem como íons ferro do grupamento heme no estado ferroso. Este tripeptídeo na presença de LAAO provavelmente reduz o cofator FAD da enzima, tornando-a inativa (Mannervick et al., 1980; Manrique, 2005).

4- Características Funcionais das L-Aminoácido Oxidases

Embora o papel fisiológico das L-aminoácido oxidases ainda seja bastante desconhecido, sua existência pode estar relacionada como forma de proteção contra agentes naturais, parasitas e bactérias (Ande et al., 2006). Apesar de os mecanismos de ação dessas enzimas serem pouco conhecidos, muitos trabalhos citam uma grande variedade de efeitos farmacológicos, como atividade bactericida (Stiles et al., 1991; Souza et al., 1999; Ehara et al., 2002; Stábeli et al., 2004; Toyama et al., 2006; Izidoro et al., 2006), indução de apoptose (Surh et al., 1996; Torri et al., 1997; Masuda et al., 1997; Souza et al., 1999; Ali et al., 2000; Zhang et al., 2004; Ande et al., 2006), citotoxicidade (Ahn et al., 1997; Souza et al., 1999; Butzke et al., 2005; Izidoro et al., 2006), alteração na função plaquetária (Li et al., 1994; Stábeli et al., 2004; Toyama et al., 2006; Izidoro et al., 2006), hemorragia (Souza et al., 1999), edema (Tan et al., 1994; Izidoro et al., 2006), dentre outros. Muitos desses efeitos parecem estar relacionados ao menos em parte com o peróxido de hidrogênio, produto secundário formado durante a reação química catalisada pelas LAAOs.

Uma das características das LAAOs é sua atividade antimicrobiana, descrita pela primeira vez por Skarnes (1970) com a peçonha de *Crotalus adamanteus*. Recentemente vários estudos têm demonstrado essa ação induzida por diferentes LAAOs isoladas de peçonhas de serpentes tais como *Trimeresurus mucrosquamatus* (Ji-Fu et al., 2002), *Bothrops alternatus* (Stábeli et al., 2004) e *Bothrops pirajai* (Izidoro et al., 2006).

Os mecanismos reais de atuação das LAAOs sobre bactérias ainda não são precisamente conhecidos, mas parecem estar relacionados com o cofator da enzima (FAD ou FMN) na forma oxidada, pois este sofreria interação com os L-aminoácidos gerando assim o peróxido de hidrogênio, uma das espécies de oxigênio reativo altamente tóxico e com capacidade de atuação sobre ácidos nucleicos, proteínas e membrana plasmáticas celulares (Findrik et al., 2006). Desta forma, este produto tóxico em contato com as membranas das bactérias, provocaria lipoperoxidação nas mesmas, acarretando sua morte (Manrique, 2005). Alguns ensaios de microscopia eletrônica de transmissão comprovaram esta ação (Toyama et al., 2006). Estes autores demonstraram que a Casca-LAAO, isolada de *Crotalus durissus cascavella*, induziu ruptura na membrana plasmática de *Xanthomonas axonopodis pv passiflorae* e *S. mutans*, tendo como consequência o extravasamento do conteúdo citoplasmático e morte. Análises imunoquímicas também demonstraram que “achacin”, uma LAAO purificada de *Achatina fulica* (Ehara et al., 2002) se liga à membrana plasmática das bactérias *S. aureus* e *E. coli* durante sua fase de crescimento, levando a bactéria à morte.

As LAAOs de serpentes exercem também uma efetiva atividade sobre protozoários, como *Leishmania*. A leishmaniose é causada pelo parasito *Leishmania* spp e transmitida para o hospedeiro vertebrado pela picada de mosquitos dos gêneros *Lutzomya* (novo mundo) *Phlebotomus* (velho mundo). A leishmaniose pode ser dividida em tegumentar e visceral. No Brasil as formas tegumentares predominantes são *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. shawi*, *L. naiffi* e *L. amazonensis*. Já as viscerais são *L. donovani*, *L. chagasi* e *L. infantum*. A *L. major* é considerada tegumentar, porém acontece nos países do velho mundo (Neves, 2002). As manifestações clínicas detectadas nas vítimas são muito variadas de acordo com a espécie do parasita, os quais se

encontram amplamente distribuídos em áreas tropicais e subtropicais do mundo.

O efeito leishmanicida observado pelas LAAOs purificadas de peçonhas de serpentes seria provocado por um estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio nas células infectadas, gerando uma atividade proteolítica nas mesmas. Posteriormente a função mitocondrial destas células estaria comprometida devido a um influxo de cálcio ativando outras enzimas, como óxido nítrico sintetase, fosfolipases; culminando com um aumento na produção de radicais livres e uma conseqüente destruição do material genético levando a célula a entrar em apoptose.

Outra característica funcional bastante promissora das LAAOS é sua ação citotóxica sobre diferentes linhagens de células tumorais (Souza et al., 1999; Torri et al, 2000; Iijima et al., 2003; Butzke et al., 2005; Izidoro et al., 2006).

Segundo Ande et al. (2006) os mecanismos de citotoxicidade induzidos pelas LAAOs envolvem necrose, apoptose, ou ainda depleção da concentração de aminoácidos essenciais do meio de cultura. O processo de necrose estaria relacionado com a ação direta do peróxido de hidrogênio sobre a membrana plasmática da célula, já o mecanismo de apoptose com o desenvolvimento de alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares que levariam a célula à morte. As alterações morfológicas mais freqüentes são a condensação da cromatina, desintegração do nucléolo e redução do volume da célula, as bioquímicas, seria a produção de enzimas oxidantes, já as moleculares, a degeneração do material genético (Souza et al., 1999). A fragmentação do DNA nuclear durante o processo de apoptose também é bastante evidenciada (Souza et al., 1999; Torri et al., 2000; Ali et al., 2000; Iijima et al., 2003; Kanzawa et al. 2004; Izidoro et al., 2006), enquanto o consumo de aminoácidos do meio aconteceria devido à oxidação dos mesmos. Butzke et al. (2005) prepararam meio de cultura pobre em aminoácidos essenciais L-lisina e L-arginina e observaram que a APIT, uma LAAO purificada de *Aplysia punctata* na ausência desses substratos não exercia citotoxicidade sobre células Jurkat T. Esses autores acreditam que a perda da atividade citotóxica esteja relacionada com a ausência de peróxido de hidrogênio, já que as condições eram desfavoráveis para seu surgimento.

As alterações na função plaquetária podem estar relacionadas com várias classes de enzimas presentes nas peçonhas de serpentes, dentre elas as L -amino ácido oxidases. Essa família de enzimas pode atuar tanto no sentido de induzir como inibir a agregação das plaquetas. As LAAOs de *Echis colorata* (Nathan et al., 1982), *A. halys blomhoffii* (Takatsuka et al., 2001) e *Naja naja kaouthia* (Sakurai et al., 2001) exerceram um forte efeito inibitório sobre a agregação plaquetária. A adição de catalase a essas enzimas restringiu totalmente suas atividades, indicando a grande importância do peróxido de hidrogênio nesse efeito farmacológico. Du e Clemetson (2002) relatam uma ausência de subsídios que justifiquem tal atividade, porém acreditam que o peróxido de hidrogênio liberado pela ação enzimática possa interferir na interação entre os receptores plaquetários (GPIIb/IIIa) e fibrinogênio, impedindo o mecanismo da agregação. Outras LAAOs como a de *Eristocophis macmahoni* (Ali et al., 2000); *Bothrops alternatus* (Stábeli et al., 2004) e *Bothrops pirajai* (Izidoro et al., 2006) atuam em sentido contrário, ativando a agregação plaquetária de plasma rico em plaquetas. Segundo Li et al. (1994) o peróxido de hidrogênio liberado durante a reação enzimática ativaria a via das ciclooxygenases, e seus produtos, tromboxano A_2 e prostaglandinas atuariam induzindo a agregação plaquetária. Na presença de inibidores desta via, indometacina, e aspirina a agregação foi totalmente deprimida, bem como na presença de catalase.

Resultados semelhantes com a LAAO isolada de *Crotalus durissus cascavella* (Casca-LAAO) por Toyama et al. (2006) foram obtidos após tratamento da enzima com os mesmos inibidores.

Vários trabalhos realizados “*in vivo*” com L -aminoácido oxidases de peçonhas de serpentes demonstraram uma eficiente indução de efeitos tóxicos relevantes, tais como: hemorragia (Souza et al., 1999; Stábeli et al., 2004), hemólise (Ali et al., 2000), alterações da hemostasia (Sakurai et al., 2003) e indução de edema (Ali et al., 2000; Ji-Fu et al., 2002; Stábeli et al., 2004; Izidoro et al., 2006). A atividade edematogênica exercida pelas peçonhas de serpentes é explicada pelo aumento da permeabilidade vascular que acarreta em saída de fluido do interior dos vasos para o espaço intersticial dos tecidos. Poucos estudos têm sido realizados para elucidar os mecanismos reais das LAAOs na indução de edema, em comparação com outras classes de toxinas de serpentes. Vários

estudos com diferentes toxinas de serpentes revelaram que a ação delas está relacionada com a estimulação e liberação de moléculas mediadoras da resposta inflamatória, como histamina, prostaglandina, cininas e serotonina (Ali et al., 1999). Por outro lado, a atividade edematogênica induzida por LAAOs parece não ser pelos mecanismos já descritos para outras toxinas, pois essas na presença de antihistamínicos não perdem sua atividade. Ponnudurai e Tan (1991) avaliaram que a atividade edematogênica da LAAO de *Ophiophagus hannah* na presença de dexametasona (um antihistamínico) não foi inibida, porém quando essa enzima foi tratada com glutathione a atividade foi totalmente suprimida, permitindo inferir o edema induzido pela LAAO está diretamente relacionado com a presença do peróxido de hidrogênio, formado em função da molécula de FADH₂, restaurando assim a atividade catalítica da enzima. Existem na literatura várias LAAOs descritas como edematogênicas; BpirLAAO-I de *Bothrops pirajai* (Izidoro et al., 2006), LAAO de *Bothrops atrox* (Manrique, 2005), LAAO de *Trimerus mucrosquamatus* (Ji-Fu et al., 2002), *Eristocophis macmahoni* (Ali et al., 2000), porém cada enzima apresenta uma dose mínima edematogênica específica, comprovando a diferença funcional de cada uma delas.

As L-aminoácido oxidases formam uma família de proteínas com várias atividades biológicas, sendo que os resultados obtidos até o presente momento indicam que o peróxido de hidrogênio, liberado durante a reação química catalisada pelas LAAOs é o metabólito responsável por muitos desses efeitos. Investigações estruturais e funcionais destas enzimas poderiam contribuir para os avanços na área da toxilogia ou para estratégias na elaboração de novos fármacos nas áreas de biotecnologia e medicina.

5- Referências Bibliográficas

ABE, Y.; SHIMOYAMA, Y.; MUNAKATA, H.; ITO, J.; NAGATA, N.; OHTSUKI, K. Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, p. 924-927, 1998.

- AHN, M. Y.; LEE, B. M.; KIM, Y. S. Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of King cobra (*Ophiophagus hannah*). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 29, p. 911-919, 1997.
- ALI, S. A.; HAWD, F.; ABBASI, A.; ZAID, Z; SHEHNAZ, Z. Pharmacological effects of the leaf-nosed viper snake (*Eristocophis macmahoni*) venom and its HPLC fractions. **Toxicon**, v. 37(8), p. 1095-1107, 1999.
- ALI, S. A.; STOEVA, S.; ABBASI, A.; ALAM, J. M.; KAYED, R.; FAIGLE, M.; NEIMEISTER, B.; VOELTER, W. Isolation, structural and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from Leaf-Nosed Viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 384, p. 216-226, 2000.
- BRASIL, 1998. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Ministério da Saúde. 131p.
- BUTZKE, D.; HURWITZ, R.; THIEDE, B.; GOEDERT, S.; RUDEL, T. Cloning and biochemical characterization of APIT, a new L-amino acid oxidase from *Aplysia punctata*. **Toxicon**, v. 46, p. 479-489, 2005.
- CAMPBELL, J. A. & LAMAR, W. W. The Venomous reptiles of Latin America. **Cornell University, New York**. 425p. 1989.
- CARDOSO, J. L. Ofidismo, aracneísmo, escorpionismo; Epidemiologia, Patogenia e clínica, diagnóstico e terapêutica. In: **SOERENSEN, B. (ed.). Animais Peçonhentos. Reconhecimento. Distribuição Geográfica. Produção de Soros. Clínica e Tratamento dos Envenenamentos**. Atheneu, Rio de Janeiro. p.109-138, 1990.
- DALMORA, S. L.; VACCARI, S. F.; PEREIRA, J. E. S. Dosagem biológica do antiveneno botrópico. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 54, p. 21-30, 1992.

- De KOK, A. & RAWITCH, A. B. Studies on L-amino acid oxidase. II. Dissociation and characterization of its subunits. **Biochemistry**, v. 8, p. 1405-1411, 1969.
- DOS SANTOS, M.; FERREIRA, L.; DIAS DA SILVA, W.; FURTADO, F. Caracterización de las actividades biológicas de los venenos “amarillo” y “blanco” de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon**, v. 31(11), p. 1459-1470, 1993.
- DU, X.Y.; CLEMETSON, K.J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, p. 659-665, 2002.
- EHARA, T.; KITAJIMA, S.; KANZAWA, N.; TAMIYA, T.; TSUCHIYA, T. Antimicrobial action of Achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. **FEBS Letters**, v. 531, p. 509-512, 2002.
- FINDRIK, Z.; GEUEKE, B.; HUMMEL, W.; RACKI, D. V. Modelling of L-Dopa enzymatic oxidation catalyzed by L-amino acid oxidases from *Crotalus adamanteus* and *Rhodococcus opacus*. **Biochemical Engineering Journal**, v.27, p. 275-286, 2006.
- FRANÇA, F. O. S. & FAN, H. W. Acidente Botrópico. In: **SCHVARTSMAN, S. (ed.). Plantas venenosas e animais peçonhentos**. Sarvier, São Paulo. 2ª edição. p.149-160, 1992.
- GEYER, A.; FITZPATRICK, T. B.; PAWELEK, P.D.; KITZING, K.; VRIELINK, A.; GHISLA, S.; MACHEROUX, P. Structure and characterization of the glycan moiety of L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 4044-4053, 2001.

- IJIMA, R.; KISUGI, J.; YAMAZAKI, M. L-amino acid oxidase activity of an antineoplastic factor of a marine mollusk and its relationship to cytotoxicity. **Developmental and Comparative Immunology**, v.27, p. 505-512, 2003.
- IWANAGA, S. & SUZUKI, T. Enzymes in the snake venoms. In: Lee CY, editor **Handbook of experimental pharmacology (snake venom)**. Berlim: Springer-Verlag, v. 52, p. 75-84, 1979.
- IZIDORO, L. F. M.; RIBEIRO, M. C.; SOUZA, G. R. L.; SANT'ANA, C. D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GOULART, L. R.; BELEBONI, R. O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V, M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 7034-7043, 2006.
- JI-FU, W.; QIN, W.; QIU-MIN. L.; HONG, T.; YANG, J.; WAN-YU, W.; YU-LIANG, X. Purification, characterization and biological activity of an L-amino acid oxidase from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **Acta Biochimica Biophysica Sinica**, v. 35, p. 219-224, 2002.
- JORGE, M. T.& RIBEIRO, L. A. Infections in the bite site after envenoming by snakes of genus *Bothrops*. **Journal Venomous Animals Toxins**, v. 3(2) p. 264-272, 1997.
- JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A.; SILVA, M. L. R.; KUSANO, E. J. V.; MENDONÇA, J. S. Microbiological studies of abscesses complicating *Bothrops* snakebite in humans: A prospective study. **Toxicon**, v. 32(6) p. 743-748, 1994.
- KANZAWA, N.; SHINTANI, S.; OHTA, K.; KITAJIMA, S.; EHARA, T.; KOBAYASHI, H.; KIZAKI, H.; TSUCHUYA, T. Achacin induces cell death in HeLa cells through two different mechanisms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 422, p. 103-109, 2004.
- MACHEROUX, P.; SETH, O., BOLLSCHWEILER, C.; SCHWARTS, M.; KURFÜST, M.; AU, L.; GHISLA, S. L-amino acid oxidase from the Malayan

Pit Viper *Calloselasma rhodostoma*: Comparative sequence analysis and characterization of active forms of the enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 1679-1686, 2001.

MANNERWICK, B.; BOGGARAM, V. CARLBERG, I.; LARSON K. The catalytic mechanism of mechanism of glutathione reductase-flavin and flavoproteins. 1st ed. Tokio: **Japon Scientific Societies Press**, p. 173-187, 1980.

MANRIQUE, F. E. L. Purificación, caracterización y actividad biológica de uma L-aminoacido oxidase presente em el veneno de la serpiente *Bothrops atrox* "jergon". **Tese de Doutorado-Universidade Nacional Mayor de Marco**, Lima-Peru, p.116, 2005.

MOUSTAFA, I. M.; FOSTER, S.; LYUBIMOV, A. Y; VRIELINK, A. Crystal structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L- phenylalanine substrate: Insights into structure and mechanism. **Journal Molecular Biology**, v. 364, p. 991-1002, 2006.

NAKANO, K.; INAMASU, Y.; HAGIHARA, S.; OBO, P. Isolation and properties of L-amino acid oxidase in Habu snake (*Trimeresurus flavoviridis*) venom. **Acta Medical University kagoshima**, v. 14, p. 229-239, 1972.

NATHAN, I.; DVILANKKY, A.; YRMIYAHU, T.; AHARON, M.; LIVNE, A. Impairment of platelet aggregation by *Echis colorata* venom mediated by L- amino acid oxidase or H₂O₂. **Thrombosis Haemostasy**, v. 48, p. 277- 282, 1982.

NISHIZAWA, T. C. C. A. & SHERMAN, D. H. Molecular analysis of the rebeccamycin L-amino acid oxidase from *Lechevalieira aerocolonigenes* ATCC 39243. **Journal Bacteriology**, v. 187, p. 2084-2092, 2005.

PAGE, D.; VAN ETEN, R. L. L-amino acid oxidase. II. Deuterium isotope effects and the action mechanism for the reduction of L-amino acid oxidase by L-leucina. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 227, p. 16-31, 1971.

- PAIK, W. K. & KIM, S. pH-substrate relationship of L-amino acid oxidases from snake venom and rat kidney. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 96, p. 66-74, 1965.
- PAWELEK, P. D., CHEAH, J., COULOMBE, R., MACHEROUX, P., GHISLA, S., VRIELINK, A. The structural of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. **The EMBO Journal**, v. 19, p. 4204-4215, 2000.
- PONNUDURAI, G.; CHUNG, M. C.; TAN, T. H. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan Pit Viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 313, p. 373-378, 1994.
- RAIBEKAS, A. A.; MASSEY, V. Primary Structure of the snake venom L-amino acid oxidase shows high homology with the mouse B cell interleukin 4-induced fig1 protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 248, p. 476-478, 1998.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: **Buckley, E. E. (Eds), Venomous animals and their venoms**, Academic Press, New York, p. 345-384, 1971.
- SAKURAI, Y.; TAKATSUKA, H.; YOSHIOKA, A.; MATSUI, T.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; FUJIMURA, Y. Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. **Toxicon**, v. 39, p. 1827-1833, 2001.
- SAKURAI, Y.; SHIMA, M.; MATSUMOTO, T.; TAKATSUKA, H.; NISHIYA, K.; KASUDA, S.; FUJIMURA, Y.; YOSHIKA, A. Anticoagulant activity of M-LAO, L-amino acid oxidase purified from *Agkistrodon halys blomhoffi*, through selective inhibition of factor IX. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1649, p. 51-57, 2003.

- SKARNES, R. C. L-amino acid oxidase, a bacterial system. **Nature**, v. 225, p. 1072-1073, 1970.
- SOLIS, C.; ESCOBAR, E.; YARLEQUE, E.; GUTIÉRREZ, S. Purificación y caracterización de la L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazilli* "jergon shushupe". **Revista Peruana de Biología**, v. 6(1), p. 75- 84, 1999.
- SOUZA, D.H.; EUGENIO, L.M.; FLETCHER, J.E.; JIANG, M.S.; GARRATT, R.C.; OLIVA, G.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: Preliminary crystallographic data. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 368, p. 285-290, 1999.
- STABELI, R.G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G.B.; PIETRO, R.C.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S.; OLIVEIRA, E.B.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A. M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2881-2886, 2004.
- STILES, B.G.; SEXTON, F.W.; WEINSTEIN, S.A. **Toxicon**, Antibactericidal effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon**, v.29, p. 1129- 1141, 1991.
- TAKATSUKA, Y.; SAKURAI, A.; YOSHIKA, T.; KOKUBO, Y.; USAMI, M.; SUZUKI, T.; MATSUI, K.; TITANI, H.; YAGI, M.; MATSUMOTO, Y. FUJIMURA, Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffi* with special reference to platelet aggregation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1544, p. 267- 277, 2001.

- TAN, N. H. & SWAMINATHAN, S. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from monocellate cobra (*Naja naja kaouthia*) venom. **International Journal of Biochemistry**, v.24, p. 967-973, 1992.
- TAN, N. H.; PONNUDURAI, G. A comparative study of the biological properties of some sea snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 99, p. 351-354, 1991.
- TEMPONE, A.G.; ANDRADE JR., H.F.; SPENCER, P.J.; LOURENÇO, C.O.; ROGERO, J.R.; NASCIMENTO, N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp with hydrogen peroxidase generated by its L-amino acid oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, p. 620-624, 2001.
- TONISMAGI, K.; SAMEL, M.; TRUMMAL, K.; RONNHOLM, G.; SIIGUR, J.; KALKKINEM, N.; SIIGUR, E. L-amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: Isolation, characterization, effects on platelets and bacteria. **Toxicon**, v. 48, p. 227-237, 2006.
- TORRI, S.; NAITO, M.; TSURUO, T. Apoxin-I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from western diamondback rattlesnake venom. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p. 9539-9542, 1997.
- TORRI, S.; YAMANE, K.; HAGA, N.; YAMAMOTO, K.; FOX, J. W.; NAITO, M.; TSURUO, T. Molecular cloning and functional analysis of Apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. **Biochemistry**, v. 272, p. 3197-3205, 2000.
- TOYAMA, M. H., TOYAMA, D. O., PASSERO, L. F. D., LAURENTI, M. D., CORBETT, C. E., TOMOKANE, T. Y., FONSECA, F. V., ANTUNES, E., JOAZEIRO, P. P., BERIAM, L. O. S., MARTINS, M. A. C., MONTEIRO, H. S. A., FONTELES, M. C. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 47, p. 47-57, 2006.

ZHANG, H.; TENG, M.; NIU, L.; WANG, Y.; LIU, Q.; HUANG Q.; HAO, Q.; DONG, Y.; LIU, P. Purification, partial characterization, crystallization and structural determination of AHP-LAAO, a novel L-amino acid oxidase with cell apoptosis-inducing activity from *Agkistrodon halys pallas* venom. **Acta Crystallography.**, v.60, p. 974-977, 2004.

ZHANG, Y. J.; WANG, J. H.; LEE, W-H.; WANG, Q.; LIU, H.; ZHENG, Y. T.; ZHANG, Y. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, p. 598-604, 2003.

CAPÍTULO II

Biochemical and Functional Characterization of an L-Amino Acid Oxidase Isolated from *Bothrops pirajai* Snake Venom

Biochemical and Functional Characterization of an L-Amino Acid Oxidase Isolated from *Bothrops pirajai* Snake Venom

Luiz Fernando M. Izidoro^{a,1}, Marcela C. Ribeiro^{b,1}, Guilherme R. L. Souza^a, Carolina D. Sant'Ana^c, Amelia Hamaguchi^a, Maria I. Homs-Brandeburgo^a, Luiz R. Goulart^a, Rene O. Beleboni^b, Auro Nomizo^c, Suely V. Sampaio^c, Andreimar M. Soares^{c,*}, Veridiana M. Rodrigues^{a,*}

^a Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, 38400-902 Uberlândia-MG, Brazil; ^b Unidade de Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, Brazil; ^c Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP, 14040-902 Ribeirão Preto-SP, Brazil.

¹These authors contributed equally for this work.

*Corresponding authors: Dra. Veridiana M. Rodrigues Ávila. Fax: 55-34-218-2203# 24, e-mail: veridiana@ingeb.ufu.br. Dr. Andreimar M. Soares. andreims@fcfrp.usp.br Fax: 0055-16-3602-4725.

Abbreviations: ATCC; American Type Culture Collection; BpirLAAO, *Bothrops pirajai* L-amino acid oxidase; FAD, flavin adenine dinucleotide; i.p., intrapeitoneal via; LAAO, L-amino acid oxidase; PBS, phosphate buffered saline; PGNase, peptide N-glucosidase; RP-HPLC, reverse phase high

performance liquid chromatography; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate poliacrylamide gel electrophoresis; SV-LAAO, snake venom L-amino acid oxidase.

Abstract

In this work we describe the isolation of a new L-amino acid oxidase (LAAO) referred to as BpirLAAO-I from *Bothrops pirajai* snake venom, which was highly purified using a combination of molecular exclusion, affinity and hydrophobic chromatography steps. BpirLAAO-I is a homodimeric acidic glycoprotein (approximate *Mr* and *pI* of 130,000 and 4.9, respectively), that displays a high specificity towards hydrophobic/aromatic amino acid residues while deglycosylation does not alter its enzymatic activity. The N-terminal LAAO sequence of its first 49 amino acids presented a similarity and other LAAOs from: *Bothrops spp*, *Crotalus spp*, *Calloselasma rhosostoma*, *Agkistrodon spp*, *Trimeresurus spp*, *Pseudechis australis*, *Oxyuranus scutellatus*, and *Notechis scutatus*. BpirLAAO-I induces time-dependent platelet aggregation, mouse paw edema, cytotoxic activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leishmania* sp and tumor cells, and also a typical fago (M13mp18) DNA fragmentation. Platelet aggregation, leishmanicidal and antitumoral activities were reduced by catalase. Thus, BpirLAAO-I is a multifunctional protein with promising biotechnological and medical applications.

Keywords: Bactericidal and cytotoxic effects; *Bothrops pirajai*; L-amino acid oxidase; platelet aggregation; snake venom; structural analysis.

RESUMO

Neste trabalho nós descrevemos o isolamento de uma nova L-aminoácido oxidase (LAAO) referida como BpirLAAO-I, do veneno da serpente *Bothrops pirajai*, a qual foi altamente purificada usando uma combinação de passos cromatográficos, como a exclusão molecular, afinidade e interação hidrofóbica. BpirLAAO-I é uma glicoproteína ácida homodimérica (massa molecular aproximado de 130.000 Da e ponto isoelétrico de 4,9), com alta especificidade por aminoácidos hidrofóbicos/aromáticos, cuja desglicosilação não altera sua atividade enzimática. A seqüência N-terminal dos primeiros 49 resíduos de aminoácidos da LAAO apresentou alta similaridade entre a seqüência de outras LAAOs: *Bothrops* spp, *Crotalus* spp, *Calloselasma rhodostoma*, *Agkistrondon* spp, *Trimeresurus* spp, *Pseudechis australis*, *Oxyuramus scutellatus* and *Notechis scutatus*. BpirLAAO-I induziu agregação plaquetária tempo dependente, edema em pata de camundongo, atividade citotóxica contra *Escherichia. Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leishmania* sp e células tumorais e também típica fragmentação em DNA de fago (M13mp18). Agregação plaquetária e atividades leishmanicida e antitumoral foram reduzidas na presença de catalase. BpirLAAO-I é uma proteína multifuncional com promissoras aplicações biotecnológica e medica.

Palavras-chave: Efeitos citotóxico e bactericida; *Bothrops pirajai*; L-aminoácido oxidase; agregação plaquetária; veneno de serpente; análise estrutural.

1. Introduction

Snake venoms are recognized as useful sources of bioactive substances showing a wide range of pharmacological activities. This complex cocktail of both toxic and nontoxic components includes several peptides and enzymes, such as L -amino acid oxidases (LAAO, EC 1.4.3.2) which may represent 1-9% of the total venom proteins.¹ L -Amino acid oxidases are flavoenzymes which catalyze the stereospecific oxidative deamination of an L -amino acid substrate to a corresponding α -ketoacid with hydrogen peroxide and ammonia production.² These enzymes which are widely distributed in many different organisms, exhibit a marked affinity for hydrophobic amino acids, including phenylalanine, tryptophan, tyrosine, and leucine.³

Although the exact biological function of snake venom LAAOs is still unknown, these enzymes are postulated to be toxins that may be involved in the allergic inflammatory response, and specifically associated with mammalian endothelial cells damage.^{4,5} Before 1990, studies in the field of SV-LAAOs dealt mainly with their enzymatic and physiochemical properties.^{6,7} However, in the last decade these enzymes have become an interesting subject for pharmacological, structural, and molecular characterizations. Briefly, structural and functional characterization of SV-LAAOs has shown: different molecular masses, a broad range of bactericidal activities, platelet aggregation effects, edema, apoptosis induction, and other activities.^{1, 8-16} The present work reports the isolation, biochemical and pharmacological characterization of a new L -amino acid oxidase isoform from *Bothrops pirajai* (BpirLAAO-I) snake venom, with special attention to its bactericidal, leishmanicidal and cytotoxic effects, in addition to platelet aggregation and edema induction.

2. Results and Discussion

2.1. Purification and biochemical characterization of BpirLAAO-I

In this work, the purification of BpirLAAO-I was successfully carried out by three chromatographic steps (Fig. 1). After the first chromatography on a Sephadex G-75 column, the active fraction referred to as P-I was identified by means of enzymatic assays (Fig. 1A). P-I fraction was concentrated, and subsequently placed on a Benzamidine-Sepharose column (Fig. 1B). LAAO activity was detected in the second fraction, named PI-BII. The active pool (PI-BIIa) was resolved into other seven fractions on a Phenyl-Sepharose column (Fig. 1C). The active fraction named BpirLAAO-I isoform was still analyzed for purity by HPLC reversed-phase chromatography (Fig. 2A). BpirLAAO-I molecular mass was estimated to be approximately 66kDa by SDS-PAGE (Fig. 2B), its pI being around 4.9. BpirLAAO-I deglycosylation was confirmed by PAGE, when the enzyme was treated with PGNase F and O-glycosidase (Fig. 2C). The BpirLAAO-I enzymatic activity was not modified after deglycosylation (Fig. 2D), suggesting that the sugar portion is not crucial for its activity.

SV-LAAOs are usually homodimeric, FAD-binding glycoproteins, with a molecular mass around 110-150kDa when measured by gel filtration under non-denaturing conditions. However, the molecular mass of SV-LAAOs is around 50-70kDa when assayed by SDS-PAGE, both under reducing and non-reducing conditions. Thus, most of the SV-LAAOs are homodimeric glycoproteins associated by non-covalent bonds with an approximately pIs of 4.4 to 8.2.^{8, 11, 13,}

BpirLAAO-I N-terminus sequencing demonstrates that the purified enzyme shows a high degree of purity (Fig.2). Moreover, the first 49 N-terminal amino acid residues from BpirLAAO-I were accessed by Edman degradation in order to obtain additional evidence of enzyme purity, and performing structural comparisons between BpirLAAO-I and different SV-LAAOs (Fig. 3).

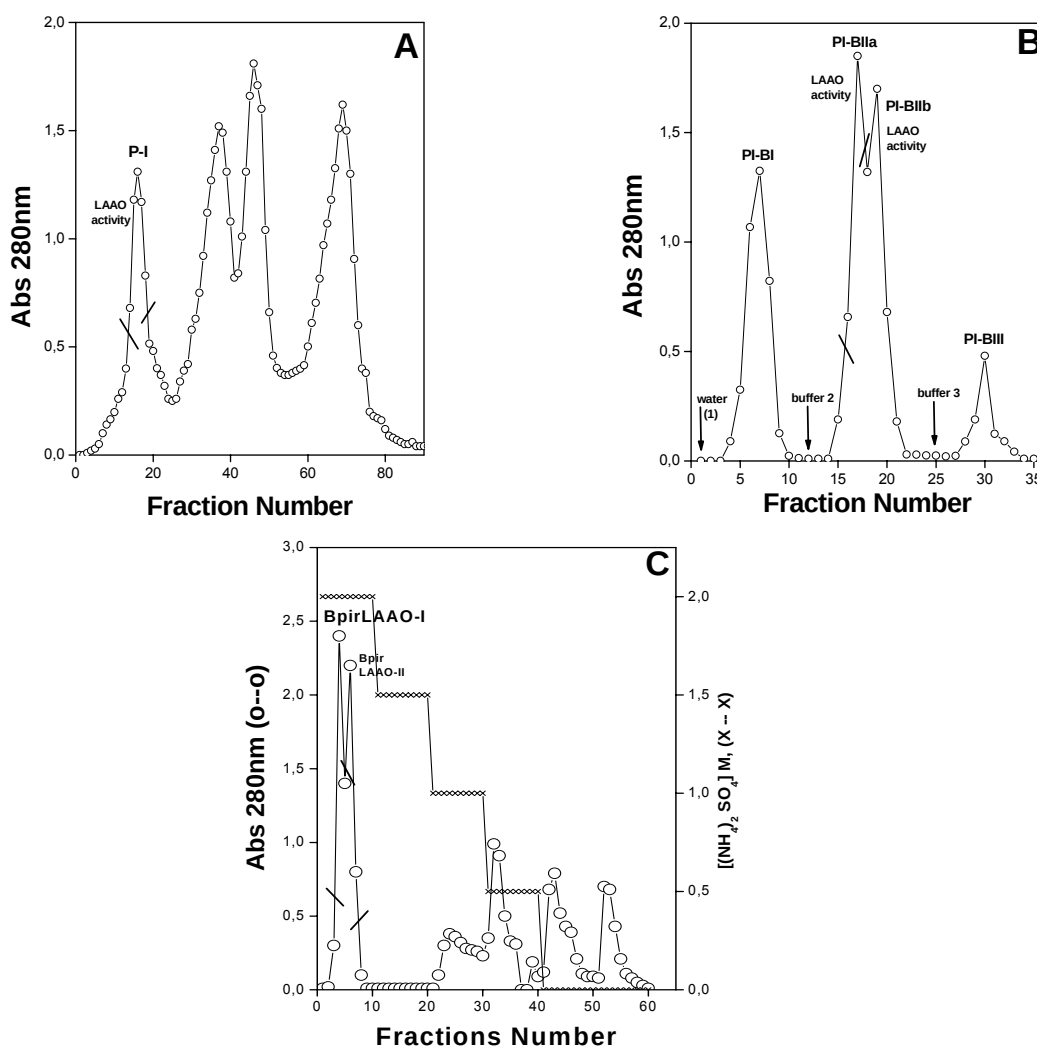


Figure 1. Isolation of BpirLAAO. (A): Gel filtration chromatography of *Bothrops pirajai* venom on a 4.0 x 90.0cm column of Sephadex G-75 previously equilibrated with ammonium bicarbonate buffer (0.05M, pH 7.8), and eluted at the flow rate of 30mL/h with the same buffer. **(B):** PI fraction was chromatographed on a 1.8 x 4.5cm column of Benzamidine-Sepharose previously equilibrated and eluted with Milli-Q water (1), followed by 0.02M sodium phosphate (buffer 2) and glycine buffer (0.02 M, pH 3.2) (buffer 3) at flow rate of 5mL/tube. **(C):** PI-BIIa

was chromatographed on a 1.8 x 5.5cm column of Phenyl-Sepharose previously equilibrated with Tris-HCl (0.01 M, pH 8.6), plus 2.0M ammonium sulfate and eluted with a decreasing concentration gradient from 2.0 to 0.0M of ammonium sulfate.

Comparison of the N-terminal amino acid sequence between BpirLAAO-I and LAAO enzymes previously reported from other snake venoms revealed a close sequence similarity. In the N-terminal sequences, at least 32 amino acid residues were found to be fully conserved in all sequences, suggesting the presence of a highly conserved Glu rich motif. The structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* revealed that residues 5-25 constituted one part of the substrate-binding domain. From the comparison of the N-terminal sequence of LAAOs at least 13 out of 24 amino acids were found highly conserved, suggesting that these conserved amino acids may play an important role in the substrate binding. The cDNA-deduced amino acid sequence of snake venom LAAOs revealed that the N-terminal sequence of these proteins contains a highly conserved beta-alpha-beta-fold domain for the adenylate moiety of FAD binding.^{1, 3, 5}

Pawelek and co-workers³ showed a high-resolution X-ray crystallographic structure of *C. rhodostoma* LAAO which indicates that SV-LAAO is a dimer. Each subunit consists of three domains: a FAD-binding domain, a substrate-binding domain, and a helical domain. A deep groove is formed at the interface between the substrate-binding and the helical domains, providing the substrate access to the active site. According to our CD analysis BpirLAAO-I secondary structure is predicted to contain: 48% α -helix, 20% β -sheet, 12% β -turn, and 20% random coil structure.

For further biochemical characterization of BpirLAAO-I its affinity to different substrates was accessed. BpirLAAO-I showed higher affinity to hydrophobic and long side chain amino acids, namely, Phe > Tyr > Trp > Leu > Met > Ile > Val > His. For other amino acids (Ala, Arg, Pro, Thr, Ser, Glu, Gly, Lys) the catalytic affinity was very low (Table 1).

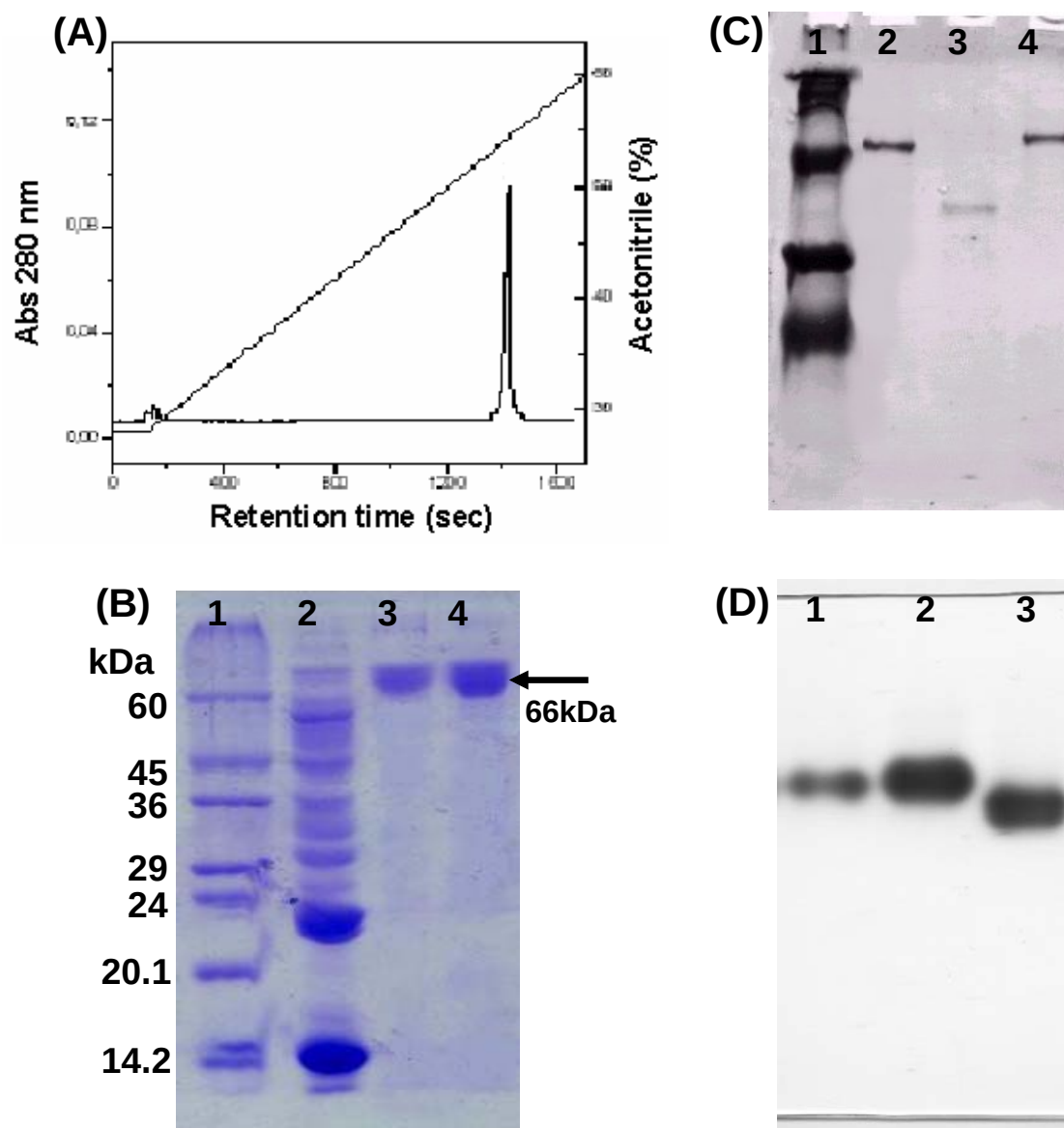


Figure 2. Purity analysis of BpirLAAO. **(A):** Chromatography profile by RP-HPLC of BpirLAAO-I. **(B):** SDS-PAGE at 12% (w/v) in Tris-glycine buffer, pH 8.4 for 120min at 10mA and 200V. Lines: 1-Molecular weight markers; 2-*Bothrops pirajai* venom (30µg); 3-BpirLAAO-I (30µg); 4-BpirLAAO-II (40µg). **(C):** SDS-PAGE at 12% (w/v), in Tris-glycine buffer, pH 8.4 for

120min at 10mA and 200V. Lines: 1-Molecular weight markers; 2-BpirLAAO-I; 3-BpirLAAO-I after treatment with PGNase F; 4-BpirLAAO-I after treatment with α -glycosidase. **(D):** Native PAGE (12%) of BpirLAAO-I stained by enzymatic activity. Lines: 1-BpirLAAO-I; 2-BpirLAAO-I after treatment with α -glycosidase; 3-BpirLAAO-I after treatment with PGNase F.

After deglycosylation the affinity picture did not change (results not shown). A previous study also reports affinity pattern for LAAOs isolated from other snake venoms¹; this catalytic preference can be explained by differences of side-chain binding sites in the enzyme - responsible for substrate specificity.¹⁷

As expected when the BpirLAAO-I was submitted was exposed to very high or low extremes temperatures and pHs we could observe a strong reduction of its L-Phe and L-Leu catalytic activity (data not shown). Optimum pH and temperature for enzymatic activity of BpirLAAO-I were between 6.0 – 7.4 and 37°C, respectively.

2.2. Functional characterization of BpirLAAO-I

As a kind of naturally existing protein library, snake venoms have been widely investigated for therapeutic purposes and other clinical uses.²² Snake venom proteins from *Bothrops* genus affect the homeostasis prey in different ways promoting hemorrhages, hemolysis, edema, and other effects on blood circulation and nervous systems.²³ The most well-known venom components are the hemorrhagic metalloproteases, serine-proteases, and phospholipases A₂.²⁴⁻²⁶ On the other hand L-amino acid oxidases are widely expressed in snake venoms and catalyze the oxidative deamination of L-amino acids, producing the corresponding α -ketoacids, hydrogen peroxide, and ammonia.

One of the most reported biological effects of SV-LAAOs is the induction or inhibition of platelet aggregation.^{8,13,14,18,27-29} In our work the BpirLAAO-I induced a dose-time-dependent platelet aggregation in platelet rich plasma (PRP), and catalase inhibited that activity (Fig. 4A). Du and Clemetson¹ suggested that the hydrogen peroxide production promoted a rapid increase of thromboxan A₂ synthesis and consequently the platelet aggregation. Indeed, Toyama and co-workers¹³ showed that incubation of casca-LAAO from *Crotalus durissus cascavella* in the presence of catalase abolished its effects on platelet aggregation.

	1	51
BpirLAAO [<i>Bothrops pirajai</i>]	ADDK-NPLEE-FRETNYEVFLEIAKNGLKATSNPKRVVIVGAGMAGLSAAY	
BmooLAAO [<i>B. moojeni</i>]	ADDR-NPLEECFRET DYEEFLEIAKNGLSTTSNPKRVVIVGAGMSGLSAAY	
BjussuLAAO [<i>B. jararacussu</i>]	ADDR-NPLEECFRET DYEEFLEIAKNGLSTTSNPKRVVIVGAGMSGLSAAY	
Apoxin [<i>Crotalus atrox</i>]	AHDR-NPLEECFRET DYEEFLEIAKNGLTATSNPKRVVIVGAGMAGLSAAY	
OXLA_CROAD [<i>C. adamanteus</i>]	AHDR-NPLEECFRET DYEEFLEIAKNGLTATSNPKRVVIVGAGMAGLSAAY	
TSV-LAO [<i>T. stejnegeri</i>]	ADDR-NPLEECFRET DYEEFLEIARNGLKATSNPKHVIVGAGMSGLSAAY	
M-LAO [<i>A. blomhoffi</i>]	ADDR-NPLEECFRET DYEEFLEIARNGLKATSNPKHVIVGAGMSGLSAAY	
LAAO [<i>Agkistrodon halys</i>]	ANDR-NPLEECFRET DYEEFLEIARNGLKATSNPKHVIVGAGMSGLSAAY	
cascaLAAO [<i>C. d. cascavella</i>]	ADDR-NPLEQC FRET DYEEFLEIARNNLKATSNPKHVIVGAGMAGLSAAY	
LAAO [<i>Calloselasma</i>]	ADDR-NPLAECFQENDYEEFLEIARNGLKATSNPKHVIVGAGMAGLSAAY	
LAAO [<i>Pseudechis</i>]	ADDRRRPLEECFREADYEEFLEIAKNGLQRTSNPKRVVIVGAGMAGLSAAY	
LAAO [<i>Notechis</i>]	ADDRRRPLEECFQEADYEEFLEIARNGLNETSNPKHVIVGAGMAGLSAAY	
LAAO [<i>Oxyuranus</i>]	ADVRRNPLEECFREADYEEFLEIARNGLKKTSNPKHVIVGAGMAGLSAAY	
consensus	*. : .** : ** : ** *****:*. * *****: **:*****:*****	

Figure 3. Comparison of the N-terminal amino acid sequence of *Bothrops pirajai* BpirLAAO-I with those of other snake venom LAAOs. Completely conserved residues in all sequences are marked by asterisks. The gaps are inserted in sequences in order to attain maximum homology. Sequence analysis of the N-terminal region of BpirLAAO-I with LAAOs from other venoms, TSV-LAO from *Trimeresurus stejnegeri* (gi60729671); M-LAO from *Agkistrodon blomhoffi* (gi15887054); BmooLAAO from *Bothrops moojeni* (gi39841346); BjussuLAAO from *Bothrops jararacussu* (gi39841344); Apoxin-1 from *Crotalus atrox*

(gi5565692); OXLA_CROAD from *Crotalus adamanteus* (gi6093636); LAAO from *Agkistrodon halys pallas* (gi48425312); LAAO from *Calloselasma rhodostoma* (gi6850960); LAAO from *Pseudechis australis* (gi68304020); LAAO from *Oxyuranus scutellatus* (gi68304016); LAAO from *Notechis scutatus* (gi68304018); cascaLAAO from *Crotalus d. cascavella*.

Also, indomethacin and aspirin, which have been used as general inhibitors of cyclooxygenase enzyme, were able to inhibit platelet aggregation induced by casca-LAAO suggesting that the hydrogen peroxide production involves a subsequent activation of the inflammatory response pathway.¹³

Table 1. Substrate specificity of BpirLAAO-I.

Amino acid	Specific activity (U/mg)	Amino acid	Specific activity (U/mg)
Phe	765	Ala	180
Tyr	685	Arg	120
Trp	585	Pro	30
Leu	580	Thr	30
Met	440	Ser	30
Ile	435	Glu	10
Val	410	Gly	5
His	300	Lys	5

BpirLAAO-I was also able to induce a dose-time-dependent edema in the mouse paw. Even at low concentration (0.04 μ g/ μ L), an extensive edema could be observed within 1 hour after enzyme inoculation, followed by mouse physiological recovery (upon 3 hours) and consequently edema activity decreasing (Fig. 4B), likewise observed in experiments previously described.^{10,}
¹³ Once more, the inflammatory response could be recruited in order to explain this observation, particularly when considering the SV-LAAOs catalytic activity.¹³

As shown in Fig. 5 BpirLAAO-I inhibited the growth of approximately 4×10^5 CFU of *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853) and *Escherichia coli* (ATCC-25923) when compared with positive controls (Fig. 5A and B). Bactericidal effect against both Gram positive and Gram negative bacteria were previously reported for LAAOs from *Bothrops alternatus*, *Crotalus adamanteus*, *C. durissus cascavella*, *Pseudechis australis*, and *Trimeresurus jerdonii* snake venoms.^{8,13,28-30}

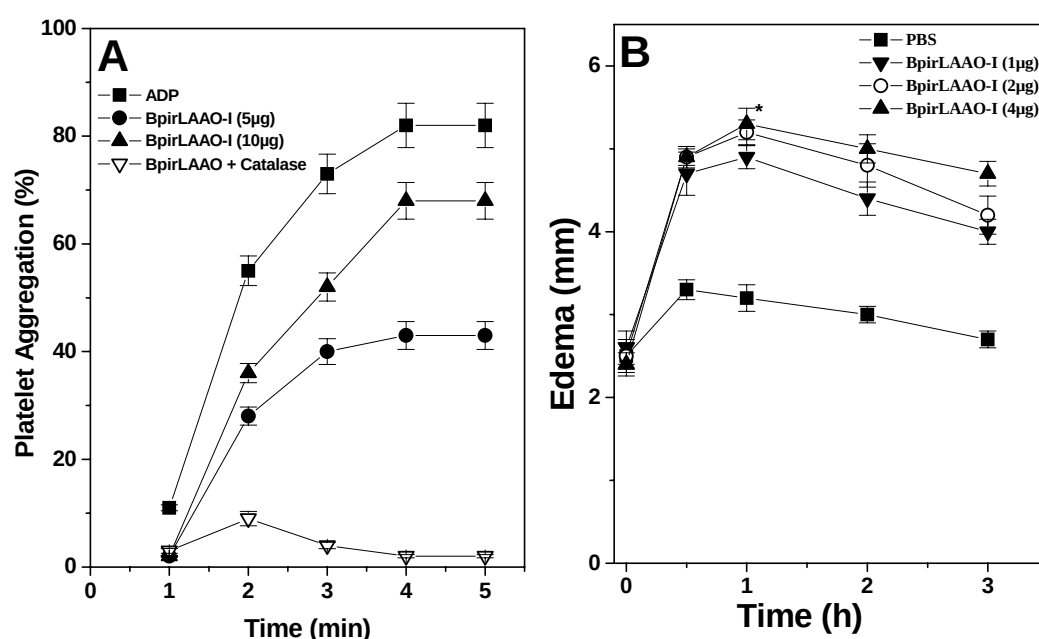


Figure 4. Pharmacological activity of BpirLAAO-I. (A): Time-dependent effect on platelet aggregation induced by BpirLAAO (5 and 10μg/μL) in comparison with the control group (PRP + ADP, 10μg/mL). This activity was reduced in the presence of catalase (100μg/mL). **(B):** Edema-inducing activity of increasing concentrations of BpirLAAO-I in PBS (0.04, 0.08 and 0.16μg/μL) after subplantar injection in mice (22-25g). PBS was also used as a negative control. Each bar represents the mean $\pm$ SD (n = 4). *Increase statistical significance relative to control.

According to experiments previously described, the SV-LAAOs bactericidal activity is dependent of hydrogen peroxide production and consequently cell damage, since in the presence of catalase this activity is abolished.^{8,13}

Bothrops pirajai LAAO-I showed leishmanicidal activity (Fig. 5C). We also investigated the cellular viability of *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani* and *L. major* after incubation with BpirLAAO-I, which induced a dose-dependent mortality of promastigote forms of different *Leishmania* species. *L. braziliensis* was the most susceptible to the toxic effect of BpirLAAO-I. Briefly, the purified enzyme showed an EC₅₀ of 1.46 mg/mL against *L. amazonensis*, 1.06 mg/mL against *L. braziliensis*, 1.26 mg/mL against *L. donovani* and 1.20mg/mL against *L. major*. In the presence of catalase, *L. donovani* specie showed 100% survival (Fig. 5C) once again suggesting the involvement of hydrogen peroxide production in death mechanism. Recently it was demonstrated that *B. moojeni* LAAO caused a high mortality of promastigote forms of different species of *Leishmania in vitro*, suggesting a promising therapeutic strategy against leishmaniasis and other intracellular parasitic infections.⁹

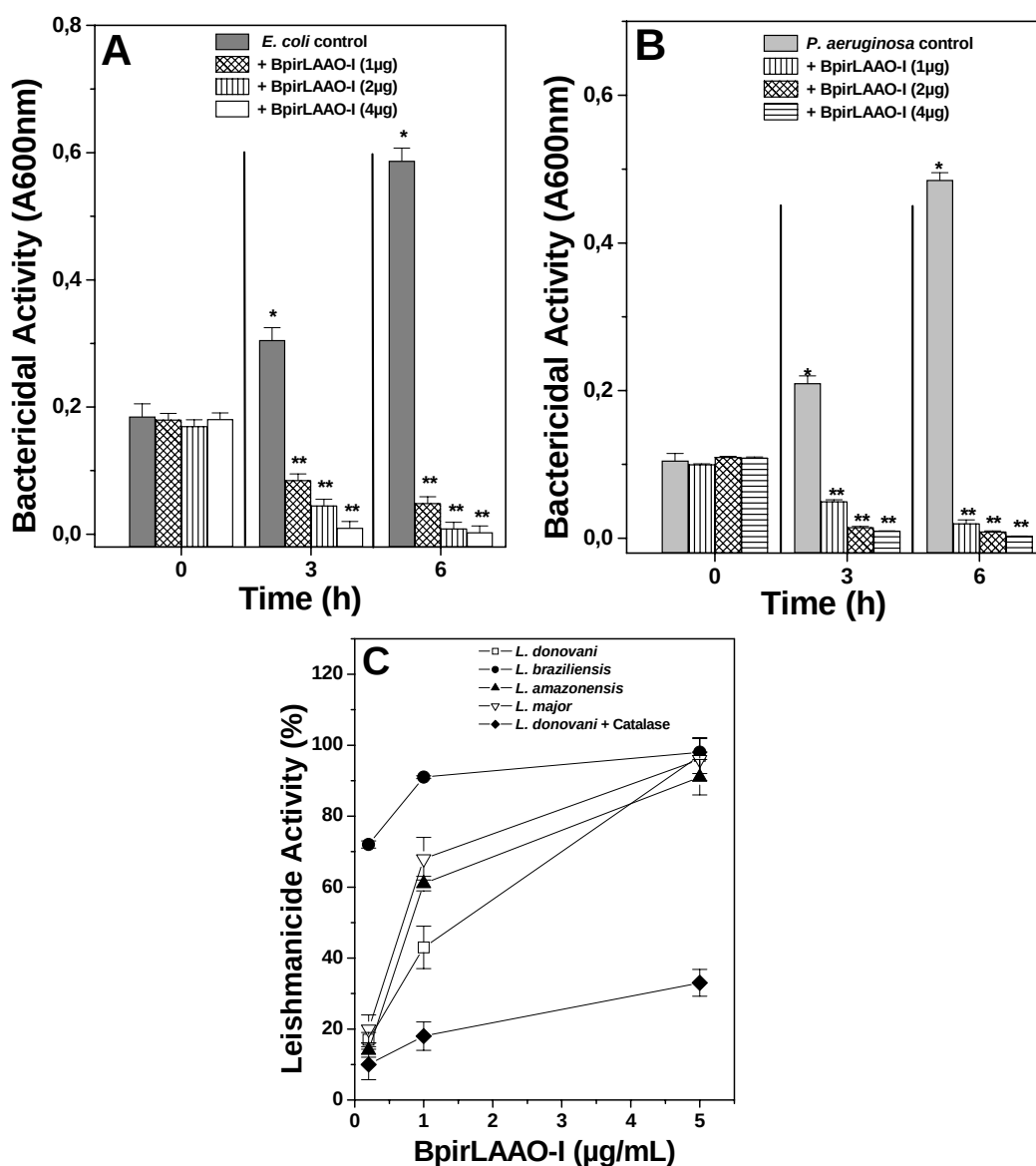


Figure 5. Microbicidal activity of BpirLAAO-I. Evaluation of BpirLAAO-I bactericidal activity *Escherichia coli* (A) and *Pseudomonas aeruginosa* (B). BpirLAAO-I (1, 2 and 4μg/mL) was incubated with 4×10^5 CFU of each bacterium for 0, 3 and 6 hours. After incubation, the bacterial growth was spectrophotometrically measured (Abs600nm). (C): Leishmanicidal dose-dependent effect induced by the BpirLAAO-I upon *Leishmania sp* parasite. This activity (BpirLAAO-I + *L. donovani*) was reduced in the presence of catalase (100μg/mL). Data were expressed by the mean $\pm$ SD (n=03). Control wells were cultured in the presence of culture medium alone.*Increase statistical significance relative to control.**Decrease statistical significance relative to time 0.

The cytotoxic effect was observed only for S180 tumor, human breast (SKBR-3), acute T cell leukemia (Jurkat) cancer, and Erlich ascitic tumor (EAT) cell lines. No significant cell death was observed for macrophages (Fig. 6). The addition of BpirLAAO-I directly to EAT cells resulted in dose-dependent tumor killing, which was inhibited by catalase. Furthermore, BpirLAAO-I was able to induce fago DNA fragmentation after incubation at 37°C for 24h. In comparison to the negative control, lower doses of BpirLAAO-I degraded around of 300ng DNA (Fig. 7).

As demonstrated by previous reports, SV-LAAOs has been extensively studied regarding their cytotoxic effects and apoptosis/necrosis induction.^{15,18,19} As observed in bacteria, the dose-dependent effect of BpirLAAO-I on fago DNA and tumor cells could be also related to hydrogen peroxide production. Tempone and co-workers⁹ showed that hydrogen peroxide was a strong inductor of apoptosis in promastigote forms of *Leishmania* ssp. In this case, cells submitted to the oxidative stress induced by hydrogen peroxide could activate heat shock proteins and initiate cell membrane/cytoplasmatic disorganization, DNA fragmentation, apoptosis and therefore cell death.

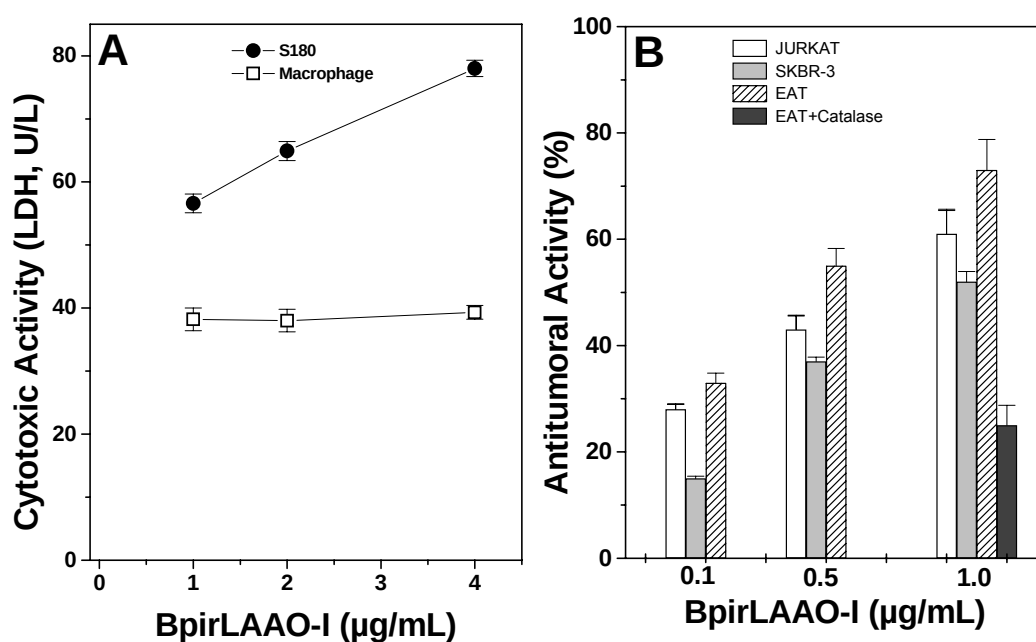


Figure 6. Cytotoxic activity of BpirLAAO-I. (A): For S180 tumor cells and macrophages, BpirLAAO-I at the same concentrations, were incubated with 1×10^5 cells. After 3h, cytotoxicity was measured by LDH dosage. **(B):** Antitumoral activity of BpirLAAO-I upon different cell lines. At different concentrations (0.1, 0.5 and 1.0 μg/mL) LAAO was incubated with human breast cancer cells (SKBR-3), acute T cell leukemia (JURKAT), and Erlich ascitic tumors (EAT) cell lines. The activity (BpirLAAO-I + EAT) was reduced in the presence of catalase (100 μg/mL). Data were expressed by the mean $\pm$ SD (n=03). Control wells were cultivated in the presence of culture medium alone.

The research for new therapeutic approaches is relevant in order to search more efficient drugs to control tumor cells, bacterial and leishmanicidal infections. In this aspect, *Leishmania* causes a spectrum of diseases ranging from self-healing ulcers to disseminated and often fatal infections, depending of the parasite species involved and host's immune response. Adequate protective vaccines against infections are still being developed and drugs currently available for chemotherapeutic intervention are mostly unsatisfactory, mainly

because of their lack of specificity, toxicity to humans, and in many cases to developed parasitic resistance.³¹

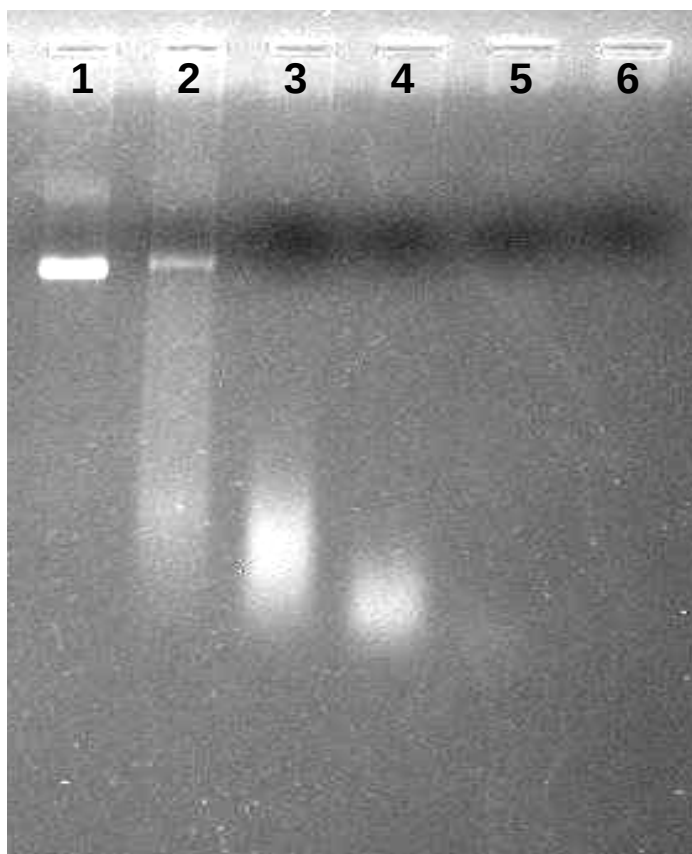


Figure 7. DNA fragmentation assay in fago DNA after treatment with BpirLAAO-I. DNA was incubated with increasing amounts of enzyme for 24h at 37°C. The fragmentation was analyzed in a 2% agarose gel. Lane: (1) Control (Only fago DNA; 300 ng); lanes (2), (3), (4), (5) and (6): DNA (300 ng) incubated with 1, 2.5, 5, 10 and 20 µg of BpirLAAO-I, respectively.

Snake venoms are complex protein cocktails that could be used as source for the development of new therapeutic drugs, since a broad range of pharmacological actions are described for their compounds. Finally SV-LAAOs that act mainly through hydrogen peroxide production, are interesting multifunctional enzymes, not only for a better understanding of the ophidian

envenomation mechanism, but also due to their biotechnological potential as model of therapeutic drugs.

3. Material and Methods

3.1. Reagents and venom

Bothrops pirajai snake venom, vacuum dried and stored at 4°C, was gently supplied by the biologist Luiz H. A. Pedrosa (FMRP-USP, Ribeirão Preto-SP, Brazil). Sephadex G-75, Benzamidine-Sepharose and Phenyl-Sepharose Fast Flow were from Amersham Life Science Inc. All other reagents used for chemical and biological characterization were of analytical grade and purchased from Sigma Chem. Co. or GIBCO BRL.

3.2. L-Amino acid oxidase purification and purity analysis

Bothrops pirajai crude venom (500mg) was applied on a Sephadex G-75 column (4.0 x 90.0cm), equilibrated with 0.05M ammonium bicarbonate (ambic), pH 7.8. Elution was carried out using the same buffer at a flow rate of 30.0mL/h, 10mL/tube being collected. The resulting fractions were assayed for their enzymatic activity. The active fraction was concentrated by ultrafiltration (AMICON YM 30,000) and applied on a Benzamidine-Sepharose column (1.8 x 4.5cm), previously equilibrated with Milli-Q water. The active fraction was eluted using Milli-Q water, 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 7.8, and glycine buffer (0.02 M, pH 3.2) at a flow rate of 5.0mL/tube. Subsequently this fraction was applied on a Phenyl-Sepharose Fast Flow column (1.8 x 5.5cm), previously equilibrated with 2.0M ammonium sulfate plus 0.01M Tris-HCl (pH 8.6). In this

step, the active fraction was eluted with an ammonium sulfate reverse gradient (2.0 to 0.0M), at a flow rate of 2.5mL/tube and stored at 4°C for future assays.

For the purity assay, 100µg of the LAAO fraction obtained from the Phenyl-Sepharose chromatography was applied onto a HPLC C4 reverse phase column (0.46 x 15.0cm) equilibrated with 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA), followed by an acetonitrile gradient from 28% to 60% (v/v) in 0.1% TFA for 32min. All chromatographic procedures were performed at room temperature. The sample was also assayed for purity by 12% (w/v) SDS-PAGE, in Tris-glycine buffer, pH 8.4, for 120min at 10mA and 200V.

3.3. Protein determination and L-amino acid oxidase assay

Protein concentration was determined by the method previously described.³² LAAO activity was measured by an adaptation of the method previously described.¹⁷ In this assay, the oxidative deamination of L-leucine produced hydrogen peroxide, which was reduced, in the presence of horseradish peroxidase, by *o*-phenylenediamine to produce a colored oxidized product, which was spectrophotometrically monitored at 490nm. Briefly, 10µL of enzyme sample (1µg/µL) were incubated at 25°C with 490µL of a solution containing 200µg of *o*-phenylenediamine, 20mg of L-Leu and 10µg of horseradish peroxidase (HRP) in 10mM Tris-HCl buffer at pH 7.2. The reaction was stopped by addition of 0.5mL of 10% (m/v) citric acid. One unit (1 U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme able to produce 1µmol of hydrogen peroxide/min, under the described conditions. In order to find out the affinity for different substrates, other amino acids (20mg) were assayed, under the same conditions. To access the BpirLAAO-I stability under different ranges

of temperatures and pH, 10µg of enzyme were incubated for 2h at pH 2.0, 4.0, 6.0, 7.4, 8.0, 10.0, and temperatures of -20, 0, 4, 25, 37, 60 and 100°C. After incubation, the enzyme activity was measured for enzyme-coupled assay using L-Leu and L-Phe as substrates.

3.4. Biochemical characterization

The pI analysis was performed as previously described.³³ For determination of N-linked sugars, the enzyme was submitted to PGNase F treatment under denaturing or nondenaturing conditions. Briefly, a solution of BpirLAAO-I (0.75µg/µL) in phosphate buffer (50mM, pH 7.5) was treated with 1µL of PGNase F (0.08U/mL) and incubated at 37°C for 4h. PAGE and enzymatic assays were subsequently carried out to evaluate deglycosylation and BpirLAAO-I activity.

3.5. N-terminal amino acid sequence

For N-terminal sequencing, 5µg of the BpirLAAO-I sample were applied on a 12.5% SDS-PAGE gel and electroblotted onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (ProBlott™, Perkin Elmer Applied Biosystems Division). After staining with Coomassie Brilliant Blue, the protein band of interest was cut out and submitted to Edman degradation in a gas phase PPSQ-23A Shimadzu sequence equipment under the conditions recommended by the manufacturer.⁸

3.6. Circular dichroism (CD) analysis

CD analysis was performed using a Jasco J-810 instrument. Protein samples (0.1 to 1.0 mg/mL) were dissolved in 10.0 mM phosphate buffer, pH

7.0, at 20.0°C. Each spectrum, used for further calculations, represented an average of three measurements in the range of 195–250nm, collected at 0.2nm intervals, with a spectral band width of 0.5nm and 4s integration time. The CD spectra were expressed as mean residual ellipticity. To estimate the proportions of the secondary structure of the BpirLAAO-I, CD spectra were evaluated by a computer program. Reference spectra were taken from myoglobin, lysozyme, ribonuclease A and hemoglobin.

3.7. Pharmacological assays

3.7.1. Platelet aggregation

This assay was carried as previously described.³⁴ Platelet rich plasma (PRP) was prepared from citrated human blood by centrifugation (360 xg/12min) at room temperature. PRP samples obtained as above were centrifuged at 1,370 xg for 20min and the platelet pellets were suspended in a calcium-free Tyrode's solution containing 0.35% (w/v) bovine serum albumin (BSA) and 0.1mM EGTA (final concentration), pH 6.5, and washed twice by centrifugation. The final pellet was then suspended in Tyrode-BSA, pH 7.5, without EGTA. The suspension volume was adjusted to give $3-4 \times 10^5$ platelets/ μ L. The platelet aggregation was measured for 5min by turbidimetric assay using whole blood Lumi-Aggregometer (Chrono-Log Corporation). Assays were performed at 37°C in siliconized glass cuvettes using 200 μ L of PRP, under stirring, and aggregation was triggered after pre-incubation for 2min with aliquots of the purified enzyme. Control experiments were carried out using the platelet agonists alone (ADP, 10 μ g/mL). BpirLAAO-I (10 μ g/mL) was

preincubated with catalase (100µg/mL) for 30min at room temperature and assayed for platelet aggregation.

3.7.2. Edema inducing activity

Groups of five Swiss male mice (20-25g) were injected in the right subplantar area with different concentrations of BpirLAAO-I in saline (0.04, 0.08 and 0.16µg/µL). The left subplantar area received 25µL of saline, as a negative control. After 0.5, 1, 2 and 3h, the paw edema was measured using a low-pressure spring caliper (Mitutoyo-Japan). Before inoculation, the paw volume of each mouse was measured as a basal control.

3.8. Cytotoxic assays

3.8.1. Bactericidal activity

Approximately 10^5 Colony-Forming Units (CFU) of *Escherichia coli* (ATCC-25923) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853) were incubated with 2mL of Muller-Hinton medium at 37°C for 24h. After growth, aliquots containing approximately 4×10^5 CFU of each bacterium were incubated with increasing concentrations of BpirLAAO-I (1, 2 and 4µg/mL) and maintained at 37°C. The growth of bacteria was spectrophotometrically monitored at 600nm at times of 0, 3 and 6h after inoculation. The bactericidal activity was measured by the decreasing of absorbance at 600nm.

3.8.2. Cytotoxic effects of the BpirLAAO-I on *Leishmania* viability.

Leishmania strains and culture conditions: Promastigote forms of all *Leishmania* species used in our experiments (*L. amazonensis* -

MPRO/BR/72/M1841-LV-79; *L. braziliensis* - MHOM/BR/75/M2904; *L. major* - LV-39, clone 5-Rho-SU/59/P; and *L. donovani* - clone LV9-3 from MHOM/ET/67/HU3) were grown in M199 medium (Gibco) supplemented with 40mM Hepes (pH 7.4), 0.1mM adenine, 7.7mM haemin, 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 50U/mL penicillin and 50µg/mL streptomycin. Cultures were incubated at 26°C, and cells were kept at densities ranging between 5×10^5 and 3×10^7 parasites/mL. Viability strains were evaluated from motility, and cell density was determined using a haemocytometer.

Cytotoxic effect of the BpirLAAO-I on *Leishmania* viability: Briefly, parasites (3×10^6 /well) were incubated in M199 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS in the presence or absence of BpirLAAO-I (0.2-5µg/mL) for 4h. Promastigotes of *L. donovani* were incubated with BpirLAAO-I (5µg/mL) and catalase (0.1mg/mL) for 12h at 25°C in a microplate assay, in order to abolish the action of hydrogen peroxide. Control groups without BpirLAAO-I, in the presence or absence of catalase (SIGMA) were also assayed. Parasites were then pulsed with 0.5µCi/well [^{3} H] thymidine, and the incorporation of radioisotope by viable cells was accessed after 16h in a β -counter.³⁵ Values of EC₅₀ were obtained from a sigmoid dose-response curve using the GraphPad Prism Software.

3.8.3. Tumor cells and macrophages

These assays were performed as previously described.³⁶ S180 tumor cells, collected at the day of experiment, were washed twice, counted and plated at a density of 1×10^5 cells into a 96-well plate. Peritoneal macrophages were obtained from Swiss male mice (25-30g) that received i.p. injections of

4mL of cold PBS buffer. Peritoneal exudates were collected with a sterile syringe. Cells were washed twice at 400xg/15min/4°C, counted, suspended in complete RPMI medium and plated as above described. The cells were incubated for 30min at 37°C and non adherent cells removed, suspended in complete RPMI medium and used in the experiments. Tumor cells or peritoneal macrophages were incubated with BpirLAAO-I at different concentrations (1, 2 and 4µg/mL). Control was cultured in the absence of enzyme. After an incubation period of 3h, the activity of lactic dehydrogenase (LDH) from normal or damaged cells was measured (Bioclin Kit).

3.8.4. Cancer cell lines culture and tumor cytotoxic activity

Human breast (SKBR-3) and acute T cell leukemia (Jurkat) cancer cell lines were maintained on RPMI 1640 medium supplemented with 2mM L-glutamine, 1.5g/l sodium bicarbonate, 4.5g/l glucose, 10mM HEPES, 1.0 mM sodium pyruvate, 10% fetal bovine serum, 100units/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin. All cell culture reagents were purchased from Gibco. All cell lines were maintained at 37°C in 5% CO₂ and 95% air with more than 95% humidity.

Tumor cytotoxic activity of LAAO was assayed with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) staining as previously described.³⁷ Tumor cells cultivated in appropriate flasks and maintained in continuously exponential growth were detached with 0.05% trypsin plus 0.02% EDTA in calcium-free phosphate buffered saline (PBS) and washed 3 times with RPMI medium at 500xg/15min/10°C. Cells were disposed in 96-well plates at a density of 1×10^5 cells per well. After 24h, the medium was removed and fresh medium, with or without different concentrations of LAAO (0.1, 0.5 and 1.0µg/mL), was added to the wells and incubated for 24h.

Cytotoxic rate was calculated as follows: % of cytotoxicity of compounds = $1 - \frac{\text{Abs drug treated}}{\text{Abs control}} \times 100$.

In some experiments, cytotoxic activity was determined on Erlich ascitic tumor (EAT) cells grown in the peritoneal cavity of Swiss mice.³⁸ EAT cells were suspended in Tyrode-Ringer buffer (4×10^6 cells in the final volume of 1mL) and incubated with several concentrations of LAAO (0.1, 0.5 and 1.0 μ g/mL) for 60min. One hundred microlitres of Trypan Blue solution (1% in saline) were then added and the unviable stained cells, as well as unstained cells, were independently counted using a haemocytometer.

3.9. DNA fragmentation assay

DNA fragmentation assays were performed by incubation of 1, 2.5, 5, 10 and 20 μ g of BpirLAAO-I with a solution containing fago DNA (300ng M13mp18/ μ L) in 10mM phosphate buffer saline (PBS) at 37°C for 24h. For negative control, fago DNA was incubated in the absence of enzyme under the same conditions. Each sample was stained with ethidium bromide and analyzed by gel electrophoresis on 2% agarose, carried out at 100V by approximately 1h. Finally, the gel was photographed on a UV transilluminator for evaluation of DNA fragmentation.

3.10- Statistical Analysis

Data are presented as mean values $\pm$ SD. For statistical significance data were analyzed by Student's unpaired *t*-test at 5% level.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. We are grateful to Prof. Dr. M.V. Souza (UnB, Brasília-DF) for amino acid sequence; Patrícia H. Ribeiro (DACTB-FCFRP-USP, Ribeirão Preto-SP) for antitumoral activity; John Pietro Nunes (Hemocentro Regional de Uberlândia-Fundação Hemominas-MG) and Danilo Menaldo (DACTB-FCFRP-USP, Ribeirão Preto-SP) for their helpful technical collaboration.

References and notes

1. Du, X.Y.; Clemetson, K.J. *Toxicon* **2002**, 40, 659-665.
2. Curti, B.; Ronchi, S.; Simonetta, P.M. *Chem. and Biochem. Flavoenzyme* **1992**, 3, 69-94.
3. Pawelek, P. D.; Cheah, J.; Coulombe, R.; Macheroux, P.; Ghisla, S.; Vrieling, A. *EMBO J.* **2000**, 19, 4204-4215.
4. Suhr, S.M.; Kim, D.S. *J. Biochem.* **1996**, 125, 305-309.
5. Macheroux, P.; Seth, O., Bollschweiler, C.; Schwarts, M.; Kurfüst, M.; Au, L.; Ghisla, S. *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 1679-1686.
6. Massey, V., Curti, B. *J. Biol. Chem.* **1976**, 242, 1259-1264.
7. Porter, D. J.; Bright, H. J. *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 2969- 2975.
8. Stabeli, R.G.; Marcussi, S.; Carlos, G.B.; Pietro, R.C.; Selistre-de-Araujo, H.S.; Oliveira, E.B.; Giglio, J.R.; Soares, A. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 2881-2886.
9. Tempone, A.G.; Andrade Jr., H.F.; Spencer, P.J.; Lourenço, C.O.; Rogero, J.R.; Nascimento, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 280, 620-624.
10. Ji-Fu, W.; Qin, W.; Qiu-Min., L.; Hong, T.; Yang, J.; Wan-Yu, W.; Yu-Liang, X. *Acta Biochim. Biophys. Sinica* **2002**, 35 (3), 219-224.
11. Butzke, D.; Hurwitz, R.; Thiede, B.; Goedert, S.; Rudel, T. *Toxicon*, **2005**, 46, 479-489.
12. Ehara, T.; Kitajima, S.; Kanzawa, N.; Tamiya, T.; Tsuchiya, T. *FEBS Letters* **2002**, 531, 509-512.

13. Toyama, M. H.; Toyama, D. O.; Passero, L. F. D.; Laurenti, M. D.; Corbett, C. E.; Tomokane, T. Y.; Fonseca, F. V.; Antunes, E.; Joazeiro, P. P.; Beriam, L. O. S.; Martins, M. A. C.; Monteiro, H. S. A.; Fonteles, M. C. *Toxicon* **2006**, 47, 47-57.
14. Ali, S. A.; Stoeva, S.; Abbasi, A.; Alam, J. M.; Kayed, R.; Faigle, M.; Neimeister, B.; Voelter, W. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, 384, 216-226.
15. Torii, S.; Yamane, K.; Haga, N.; Yamamoto, K.; Fox, J. W.; Naito, M.; Tsuruo, T. *Biochemistry* **2000**, 272, 3197-3205.
16. Souza, D.H.; Eugenio, L.M.; Fletcher, J.E.; Jiang, M.S.; Garratt, R.C.; Oliva, G.; Selistre-de-Araujo, H.S. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, 368, 285-290.
17. Ponnudurai, G.; Chung, M. C.; Tan, T. H. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, 313, 373-378.
18. Ahn, M.Y.; Lee, B.M.; Kim, Y.S. *Int. J. Biochem. Cell biol.* **1997**, 29, 911-919.
19. Abe, Y.; Shimoyama, Y.; Munakata, H.; Ito, J.; Nagata, N.; Ohtsuki, K. *Biol. Pharm. Bull.* **1998**, 21, 924-927.
20. Zhang, Y. J.; Wang, J. H.; Lee, W. H.; Wang, Q.; Liu, H.; Zheng, Y. T.; Zhang, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 309, 598-604.
21. Bjarnason, J. B.; Fox, J.W. *Pharmacol. Ther.* **1994**, 62, 325-372.
22. Mazzi, M.V.; Marcussi, S.; Carlos, G. B.; Stábeli, R.G.; Franco, J. J.; Ticli, F. K.; Cintra, A. C. O.; França, S. C.; Soares, A. M.; Sampaio, S. V. *Toxicon* **2004**, 44, 215-223.
23. Matsui, T.; Fujimura, Y.; Titani, K. *Biochim. Biophys Acta* **2000**, 1477, 146-156.

24. Soares, A. M.; Fontes, M.R.M.; Giglio, J. R. *Curr. Org. Chem.* **2004**, 8, 1677-1690.
25. Li, Z.Y.; Yu, T.F.; Lian, E.C. *Toxicon* **1994**, 32, 1349-1358.
26. Sakurai, Y.; Takatsuka, H.; Yoshioka, A.; Matsui, T.; Suzuki, M.; Titani, K.; Fujimura, Y. *Toxicon* **2001**, 39, 1827-1833.
27. Takatsuka, H.; Sakurai, Y.; Yoshioka, A.; Kokubo, T.; Usami, Y.; Suzuki, M.; Matsui, T.; Titani, K.; Yagi, H.; Matsumoto, M.; Fujimura, Y. *Biochim. Biophys Acta* **2001**, 1544, 267-277.
28. Skarnes, R. C. *Nature* **1970**, 225, 1072-1073.
29. Stiles, B.G.; Sexton, F.W.; Weinstein, S.A. *Toxicon* **1991**, 29, 1129-1141.
30. Lu, Q. M.; Wei, Q.; Jin, Y.; Wei, J.F.; Wang, W. Y.; Xiong, Y. L. *J. Nat. Toxins* **2002**, 11, 345.
31. Molyneux, D.H.; Stiles, J.K. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **1991**, 71, 151-66.
32. Itzhaki, R.F.; Gill, D. M. *Anal. Biochem.* **1964**, 9, 401-410.
33. Arantes, E.C.; Riccioppo Neto, F.; Sampaio, S.V.; Vieira, C.A.; Giglio, J.R. *Biochem. Biophys. Acta.* **1994**, 1199, 69-75.
34. Fuly, A. L.; Machado, O. L.; Alves, E. W.; Carlini, C. R.; *Thromb. Haemost.* **1997**, 78, 1372.
35. Stabeli, R.G.; Amui, S.F.; Sant'ana, C.D.; Pires, M.G.; Nomizo, A.; Monteiro, M.C.; Romão, P.R.; Guerra-Sa, R.; Vieira, C.A.; Giglio, J.R.; Fontes, M.R.; Soares, A.M.; *Comp. Biochem. Physiol.* **2006**, 142C, 371-381.

36. Lomonte, B.; Cerda-Pizarro, J.; Angulo, Y.; Gorvel, J.P.; Moreno, E. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1461, 19-26.
37. Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55.
38. Chwetzoff, S.; Tsunasawa, S.; Sakiyama, F.; Menez, A. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 13289