UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Letícia Lopes de Souza

IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES CITOTÓXICOS DO VENENO DA SERPENTE *Bothrops atrox* E CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS CELULARES E METABÓLICOS INDUZIDOS PELA PROTEÍNA RECOMBINANTE L-AMINOÁCIDO OXIDASE (LAAO)

Belo Horizonte

2022

Letícia Lopes de Souza

IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES CITOTÓXICOS DO VENENO DA SERPENTE *Bothrops atrox* E CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS CELULARES E METABÓLICOS INDUZIDOS PELA PROTEÍNA RECOMBINANTE L-AMINOÁCIDO OXIDASE (LAAO)

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Chávez Olórtegui

Coorientadora: Dra. Vânia Maria Martin Braga

Belo Horizonte

2022

043 Souza, Letícia Lopes de.
Identificação dos componentes citotóxicos do veneno da serpente bothrops atrox e caracterização dos efeitos celulares e metabólicos induzidos pela proteína recombinante L-aminoácido oxidase (LAAO) [manuscrito] / Letícia Lopes de Souza. – 2022.
211 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Carlos Chávez Olórtegui. Co-orientador: Vânia Maria Martin Braga.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e Imunologia. 2. L-Aminoácido Oxidase. 3. Proteínas Recombinante. 4. Citotoxicidade Imunológica. 5. Proteoma.I. Olórtegui, Carlos Chávez. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1

Ficha Catalográfica elaborada pelo bibliotecário Rafael Gonçalves Dias (CRB: 6 - 3277)

Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE LETÍCIA LOPES DE SOUZA. Aos dezesseis dias do mês de dezembro de 2022 às 14:00 horas, reuniu-se de forma "on line" utilizando a plataforma "Teams", no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Identificação de componentes citotóxicos do veneno da serpente Bothrops atrox e caracterização dos efeitos celulares e metabólicos induzidos pelo veneno e a proteína recombinante L-aminoácido oxidase (LAAO)", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Delfin Chávez Olórtegui, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Stephen Hyslop (Universidade Estadual de Campinas), aprovada; Dr. Andreimar Martins Soares (FIOCRUZ Rondônia), aprovada; Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Dawidson Assis Gomes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtegui - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

(X) APROVADA
( ) REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de dezembro de 2022.

Dr. Stephen Hyslop (Universidade Estadual de Campinas)

Dr. Andreimar Martins Soares (FIOCRUZ Rondônia)

gov.br Documento assinado digitalmente
ANDREIMAR MARTINS SOARES
Data: 16/12/2022 17:38:18-0300
Verifique em https://verificador.iti.br

Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (UFMG)

Dr. Dawidson Assis Gomes (UFMG)

Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtegui - Orientador (UFMG)

Profª Leda Quercia Vieira
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica e Imunologia

Este trabalho foi realizado:

No Laboratório de Imunoquímica de Proteínas, ICB, UFMG; e

No Laboratório BragaLab, Dpto. de Medicina Molecular, Imperial College London, Reino Unido.

E contou com apoio financeiro de:

Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB – UFMG; CNPq;
CAPES;
FAPEMIG.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos Chávez Olórtegui, pela orientação ao longo desses anos, por sempre me incentivar e pelas oportunidades que me proporciona.

À Dra. Vânia Braga, pela coorientação, ensinamentos e por me acolher tão bem em seu laboratório.

À Dra. Stephanie Stransky pela realização dos experimentos de proteômica e por toda ajuda e ensinamentos, sempre com carinho.

À Dra. Krisna pela ajuda com os experimentos, paciência e por estar sempre disposta a ensinar.

Ao Moacir Braga pela disponibilidade e criação do programa para organização dos dados de espectrometria.

À Dra. Clara Guerra e Fernanda Costal pela ajuda de sempre, correções e ensinamentos, mesmo que de longe.

Ao grupo Desabafo, por ser um pacote completo de suporte emocional e científico, além da amizade sempre regada com boas risadas.

Aos amigos do BragaLab, em especial à Rachel e Nuun pelas conversas, companhia, trocas científicas e amizade.

Aos colegas do Labimq pela companhia, ajuda com os experimentos e por tornar o ambiente de trabalho mais agradável.

À minha mãe por sempre se fazer presente, confiar em mim mais do que eu mesma, me dar apoio incondicional e sempre ter um colinho quando eu preciso.

Ao meu irmão Dudu por acreditar em mim, torcer e sempre estar ali quando precisamos.

À minha vó Judite pelo carinho e amor infinito e também pela melhor comida desse mundo!

Ao meu pai, Isa, Lucas e Larissa pelos momentos inesquecíveis e hilários que temos juntos, além do amor e carinho de sempre.

À família Souza em geral, em especial Deis, Mary, Marconi e Marcelo pelo incentivo e carinho.

Ao Bart, por me apresentar um amor especial e diferente de tudo que já vivi. Por ser tão paciente, disposto a ajudar e incentivador. Dziękuję bardzo, Kocham cię!

À Ju e Paloma, minhas irmãs do coração que estão comigo a 16 anos e contando! Obrigada por estarem sempre presentes e por serem um porto seguro na minha vida.

Às senhoras Sabrina, Pri e Cams pelas risadas, conselhos terapêuticos e encontrinhos maravilhosos.

Aos amigos que fiz em Londres, em especial aos poloneses, pelo carinho e momentos ótimos que passamos juntos.

À Ana Flávia pelas aulas de inglês, incentivo, carinho e por sempre torcer pelas minhas realizações.

A todos meus amigos que se fazem presentes, mesmo que distantes, pelo apoio, conversas, celebrações e risadas. Vocês são muito importantes para mim.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e pelas contribuições para esta tese.

Às agências de fomento que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao universo e à vida, por me permitirem passar por experiências singulares, vivenciar mudanças pessoais muito especiais e ainda encontrar pessoas maravilhosas no caminho.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho e para meu crescimento pessoal e profissional.

“Wherever life plants you, bloom with grace”

(Autor Desconhecido)

RESUMO

Acidentes ofídicos são um problema de saúde pública mundial e, no Brasil, mais de 20 mil casos ocorrem anualmente. A região Norte concentra mais de 40 % dos acidentes e a serpente *Bothrops atrox* é a mais importante do ponto de vista epidemiológico na floresta Amazônica da América do Sul. O envenenamento por essa serpente causa sintomas sistêmicos e locais desencadeados pela ação sinérgica das toxinas presentes na peçonha. O tratamento consiste na utilização de antivenenos, que agem neutralizando as ações das toxinas. Entretanto, nem sempre os antivenenos neutralizam o dano local de forma eficiente e, nesses casos, a pele é o principal órgão afetado. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo inicial a avaliação do efeito do veneno de *B. atrox* em queratinócitos, o principal tipo celular da pele. As Metaloproteases e L-aminoácido oxidases foram identificadas como as principais proteínas responsáveis pela citotoxicidade. Em seguida, a LAAO foi selecionada para caracterização dos seus efeitos celulares e metabólicos. Ela foi produzida em sua forma recombinante (rLAAO) e apresentou citotoxicidade frente a queratinócitos e células endoteliais humanas, afetando importantes proteínas de adesão celular. Por outro lado, a versão mutada da LAAO ($rLAAO^{R90A}$), que não apresenta atividade catalítica, demonstrou efeitos significativamente reduzidos, indicando que essas ações são catálise-dependente. Uma abordagem *high throughput* utilizando metodologias ômicas foi empregada para avaliar os efeitos da rLAAO no metabolismo. Foram analisados o proteoma, os aminoácidos e aminas biogênicas e o lipidoma de células humanas tratadas. Os dados demonstram que, na presença da LAAO, ocorre a regulação de diversas moléculas e processos celulares. Entre eles destacam-se a metilação e reparo de DNA, adesão celular, autofagia, assim como vias antioxidantes e de catabolismo de lipídeos. Esses dados apresentam uma abordagem inovadora e promissora na área da Toxinologia, que poderá ser utilizada para a identificação de moléculas que estejam envolvidas durante o envenenamento e que possam servir como alvos moleculares. Isso contribui para a caracterização de mecanismos celulares e metabólicos que ocorrem durante o envenenamento, assim como para o desenvolvimento de terapias que auxiliem no tratamento dos efeitos locais causados pelos venenos botrópicos.

Palavras-chave: L-aminoácido oxidase; recombinante; citotoxicidade; proteoma; aminas biogênicas; lipidoma.

ABSTRACT

Snakebites are a global public health problem, and in Brazil, more than 20 thousand cases occur annually. The North region accounts for more than 40% of accidents and, from an epidemiological perspective, *Bothrops atrox* snake is the most important in the Amazon rainforest of South America. Envenomation by this snake causes systemic and local symptoms triggered by the synergistic action of the toxins present in the venom. Treatment consists of antivenoms use, which act by neutralizing the toxins actions. However, antivenoms do not always neutralize local damage efficiently and, in these cases, the skin is the main organ affected. Therefore, the first objective of the project was to evaluate the effect of *B. atrox* venom on keratinocytes, the main cell type in the skin. Metalloproteases and L-amino acid oxidases were identified as the main proteins responsible for the cytotoxicity. Next, LAAO was selected for the characterization of its cellular and metabolic effects. It was produced in a recombinant form (rLAAO) and showed cytotoxicity against keratinocytes and human endothelial cells, affecting important cell adhesion proteins. On the other hand, the mutated version of LAAO ($rLAAO^{R90A}$), which does not present catalytic activity, demonstrated significantly reduced effects, indicating that those actions are catalysis dependent. A high throughput approach using omics methodologies was employed to evaluate the effects of rLAAO on metabolism. The proteome, amino acids and biogenic amines and the lipidome of treated human cells were analysed. Results demonstrate that in the presence of LAAO, several molecules and cellular processes are regulated. Among them, DNA methylation and repair, cell adhesion, autophagy, as well as antioxidant and lipid catabolism pathways are affected. These data present an innovative and promising approach in the Toxinology field, which could be used to identify molecules involved during the envenomation and could be used as molecular targets. This contributes to the characterization of cellular and metabolic mechanisms that occur during envenomation and for the development of therapies focused on these mechanisms, helping to the treatment of local effects caused by bothropic venoms.

Keywords: L-amino acid oxidase; recombinant; cytotoxicity; proteome; biogenic aminelipidoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: *Bothrops atrox* e sua distribuição geográfica. 21

Figura 2: Sintomas locais e sistêmicos desencadeados pelo veneno de *B. atrox*... 22

Figura 3: Composição proteica do veneno de *B. atrox*. 25

Figura 4: Estrutura cristalográfica da LAAO do veneno de *B. atrox*. 27

Figura 5: Esquema da reação química catalisada pela enzima L-aminoácido oxidase. 28

Figura 6: Complexo multiproteico das junções aderentes no epitélio. 33

Figura 7: Complexo multiproteico das junções celulares no endotélio. 34

Figura 8: Esquema do processo de produção e purificação da LAAO recombinante.. 52

Figura 9: Esquema do fluxo de trabalho para análise do proteoma de células endoteliais e queratinócitos. 60

Figura 10: Esquema do fluxo de trabalho para análise de aminas biogênicas e do lipidoma em células endoteliais e queratinócitos.. 66

Figura 11: Avaliação da citotoxicidade causada pelo veneno de *B. atrox*. 70

Figura 12: Perfil eletroforético e citotoxicidade das frações da S-200 do veneno de *B. atrox*.. 72

Figura 13: Atividades enzimáticas do veneno e das frações de *B. atrox*. 74

Figura 14: Composição proteica das frações citotóxicas da S-200. 78

Figura 15: Perfil eletroforético e citotoxicidade das frações da DEAE do veneno de *B. atrox*. 80

Figura 16: Composição proteica das frações citotóxicas da DEAE. 83

Figura 17: Produção da LAAO recombinante. 87

Figura 18: Avaliação da citotoxicidade da rLAAO em células endoteliais. 89

Figura 19: Avaliação da citotoxicidade da rLAAO^{R90A} em células endoteliais. 91

Figura 20: Avaliação da estrutura de células endoteliais após tratamento com rLAAO. 92

Figura 21: Avaliação da estrutura de células endoteliais após tratamento com rLAAO^{R90A}. 93

Figura 22: Avaliação da citotoxicidade da rLAAO em queratinócitos. 95

Figura 23: Avaliação da citotoxicidade da rLAAO^{R90A} em queratinócitos.. 97

Figura 24: Proteoma das células endoteliais após tratamento com rLAAO..... 100

Figura 25: Proteoma das células endoteliais após tratamento com rLAAO^{R90A}..... 103

Figura 26: Proteoma dos queratinócitos após tratamento com rLAAO..... 106

Figura 27: Proteoma de queratinócitos após tratamento com rLAAO^{R90A}. 109

Figura 28: Quantificação dos aminoácidos identificados por UPLC-MS/MS no sobrenadante de células endoteliais. 114

Figura 29: Análise de enriquecimento de vias metabólicas no sobrenadante de células endoteliais após tratamento com rLAAO. 115

Figura 30: Comparação dos níveis de aminoácidos descritos como substratos preferenciais ou não da LAAO. 116

Figura 31: Quantificação de compostos com aminas biogênicas identificados por UPLC-MS/MS no sobrenadante de células endoteliais. 120

Figura 32: Análise de enriquecimento de vias metabólicas no sobrenadante de células endoteliais após tratamento com rLAAO. 121

Figura 33: Comparação dos níveis de compostos com aminas biogênicas no sobrenadante de células endoteliais. 122

Figura 34: Quantificação dos aminoácidos identificados por UPLC-MS/MS em células endoteliais.. 125

Figura 35: Análise de enriquecimento de vias metabólicas em células endoteliais após tratamento com rLAAO. 126

Figura 36: Comparação dos níveis de aminoácidos descritos como substratos preferenciais ou não da LAAO. 127

Figura 37: Quantificação de compostos com aminas biogênicas identificadas por UPLC-MS/MS em células endoteliais. 130

Figura 38: Análise de enriquecimento de vias metabólicas em células endoteliais após tratamento com rLAAO. 131

Figura 39: Comparação dos níveis de compostos com aminas biogênicas em células endoteliais. 132

Figura 40: Quantificação dos aminoácidos identificados por UPLC-MS/MS no sobrenadante de queratinócitos. 135

Figura 41: Análise de enriquecimento de vias metabólicas no sobrenadante de queratinócitos após tratamento com rLAAO. 136

Figura 42: Comparação dos níveis de aminoácidos descritos como substratos preferenciais ou não da LAAO. 137

Figura 43: Quantificação de compostos com aminas biogênicas identificados por UPLC-MS/MS no sobrenadante de queratinócitos. 141

Figura 44: Análise de enriquecimento de vias metabólicas no sobrenadante de queratinócitos após tratamento com rLAAO. 142

Figura 45: Comparação dos níveis de compostos com aminas biogênicas no sobrenadante de queratinócitos. 143

Figura 46: Quantificação dos aminoácidos identificados por UPLC-MS/MS em queratinócitos. 146

Figura 47: Análise de enriquecimento de vias metabólicas em queratinócitos após tratamento com rLAAO. 147

Figura 48: Comparação dos níveis de aminoácidos descritos como substratos preferenciais ou não da LAAO. 148

Figura 49: Quantificação de compostos com aminas biogênicas identificados por UPLC-MS/MS em queratinócitos. 152

Figura 50: Análise de enriquecimento de vias metabólicas em queratinócitos após tratamento com rLAAO. 153

Figura 51: Comparação dos níveis de compostos com aminas biogênicas em queratinócitos. 154

Figura 52: PCA dos diferentes grupos de tratamento dos queratinócitos. 156

Figura 53: Gráficos de volcano-plot de queratinócitos tratados com rLAAO em diferentes tempos. 157

Figura 54: Lipídeos putativos alterados após tratamento de queratinócitos com a rLAAO.. 161

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpo primário utilizado nos ensaios de imunofluorescência com NHEKs. 49

Tabela 2: Anticorpos secundários utilizados nos ensaios de imunofluorescência com NHEKs. 49

Tabela 3: Anticorpo primário utilizado nos ensaios de imunofluorescência com HDMECs. 56

Tabela 4: Anticorpos secundários utilizados nos ensaios de imunofluorescência com HDMECs 56

Tabela 5: Lista dos aminoácidos e outros compostos com aminas biogênicas que podem ser identificados por UPLC-MS/MS. 61

Tabela 6: Espectrometria de massa da Fração-1 realizada comercialmente. 75

Tabela 7: Espectrometria de massa da Fração-2 realizada comercialmente. 76

Tabela 8: Espectrometria de massa da Fração-5 realizada comercialmente. 77

Tabela 9: Espectrometria de massa da Fração-2.3 realizada comercialmente. 81

Tabela 10: Espectrometria de massa da Fração-2.4 realizada comercialmente. 82

Tabela 11: Identificação das principais proteínas reguladas nas células endoteliais após tratamento com rLAAO. 101

Tabela 12: Processos e funções celulares possivelmente afetados em células endoteliais tratadas com rLAAO. 102

Tabela 13: Identificação das principais proteínas reguladas nas células endoteliais após tratamento com rLAAO^{R90A}. 104

Tabela 14: Processos e funções celulares possivelmente afetados em células endoteliais tratadas com rLAAO^{R90A}. 105

Tabela 15: Identificação das principais proteínas reguladas nos queratinócitos após tratamento com rLAAO. 107

Tabela 16: Processos e funções celulares possivelmente afetados em queratinócitos tratados com rLAAO..... 107

Tabela 17: Identificação das principais proteínas reguladas nos queratinócitos após tratamento com rLAAO^{R90A}. 110

Tabela 18: Processos e funções celulares possivelmente afetados em queratinócitos tratados com rLAAO^{R90A}..... 110

Tabela 19: Possíveis vias do metabolismo afetadas em HDMECs pelo tratamento com rLAAO..... 154

Tabela 20: Possíveis vias do metabolismo afetadas em NHEKs pelo tratamento com rLAAO.. 155

Tabela 21: Lista dos lipídeos putativos regulados negativamente em queratinócitos tratados com rLAAO..... 159

Tabela 22: Lista dos lipídeos putativos regulados positivamente em queratinócitos tratados com rLAAO..... 160

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3 R's	*Reduce, Refine, Replace*
ADP	Adenosina Difosfato
AH	Ácido Hialurônico
BSA	Albumina Sérica Bovina
CRISP	Proteína secretória rica em cisteína
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
CTL	Lectina do tipo C
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DDA	*Data-dependent acquisition*
DEAE	Dietilaminoetanol
DISL	Proteína do tipo Desintegrina
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EC_{50}	Concentração Efetiva Média
ECG-MV	*Endothelial Cell Growth Medium*
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
emPai	*Exponential Modified Protein Abundance Index*
ESI	Ionização por *Eletrospray*
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
F(ab')2	Fragmento de ligação ao antígeno bivalente
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FMN	Flavina Mononucleotídeo
FRET	*Fluorescence Resonance Energy Transfer*
GPC	Glutaminil-peptídeo ciclotransferase
HDMEC	*Human Dermal Microvascular Endothelial Cell*
HEK	*Human Embryonic Kidney*
Hial	Hialuronidase
IgG	Imunoglobulina do tipo G
LAAO	L-aminoácido oxidase
LC-MS	*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*
LNMMA	N-Metil-L-Arginina

LZTFL1	*Leucine zipper transcription factor-like protein 1*
NHEK	*Normal Human Epidermal Keratinocyte*
NT	Nucleotidase
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	Ortofenilenodiamina
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCA	Análise de Componente Principal
PDB	*Protein Data Bank*
PDE	Fosfodiesterase
PLA_2	Fosfolipase A_2
PLB	Fosfolipase B
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
QC	Controle de Qualidade
QPCT	Glutaminil-peptídeo Ciclotransferase
RFU	Unidade Relativa de Fluorescência
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
SFB	Soro Fetal Bovino
SMPDB	*Small Molecule Pathway Database*
Snaclec	Lectina do tipo-C de Serpente
SVMP	Metaloprotease de veneno de serpente
SVSP	Serinoprotease de veneno de serpente
TBS	Tampão Tris Salino
TFA	Ácido Trifluoracético
UNMSM	Universidade Nacional Maior de São Marcos
UPLC-MS	*Ultra performance liquid chromatography-Mass Spectrometry*
VF	Factor de Veneno
VNGF	Factor de crescimento de veneno

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19

1.1 Acidentes ofídicos 19

***1.2 Bothrops atrox* 20**

1.3 Soroterapia 23

1.4 Composição do veneno 24

1.5 L-aminoácido Oxidases (LAAOs) 26

1.6 Proteínas recombinantes 30

1.7 Epitélio, endotélio e junções aderentes 32

1.8 Descoberta de alvos moleculares do envenenamento botrópico 35

2. OBJETIVOS 40

2.1 Objetivo geral 40

2.2 Objetivos específicos 40

3. METODOLOGIA 43

3.1 Obtenção do veneno 43

3.2 Fracionamento do veneno e SDS-PAGE 43

3.3 Avaliação do perfil enzimático das frações de *B. atrox* 44

3.4 Cultura celular 45

3.5 Avaliação da citotoxicidade do veneno e das frações de *B. atrox* 46

3.5.1 Ensaio de viabilidade celular 46

3.5.2 Avaliação da estrutura celular utilizando marcação por imunofluorescência 48

3.6 Espectrometria de massa das frações citotóxicas 49

3.7 Produção e purificação da LAAO recombinante 50

3.4.1 Obtenção dos plasmídeos 50

3.4.2 Transfecção das células e purificação da rLAAO 51

3.8 Análise da LAAO recombinante por SDS-PAGE e *Western Blot* 52

3.9 Ensaio de atividade de L-aminoácido Oxidase 54

3.10 Avaliação dos efeitos celulares causados pela LAAO recombinante . 54

3.10.1 Ensaios de viabilidade celular 54

3.10.2 Avaliação da estrutura celular utilizando marcação por imunofluorescência 55

3.11 LC-MS/MS para análise do proteoma de células tratadas com a LAAO recombinante 57

3.11.1 Tratamento das células 57

3.11.2 Preparação das amostras 58

3.11.3 LC-MS/MS 58

3.11.4 Análise dos dados 58

3.12 UPLC-MS/MS para análise de aminas biogênicas em células tratadas com a LAAO recombinante 60

3.12.1 Tratamento das células 61

3.12.2 UPLC-MS/MS para análise de aminoácidos e aminas biogênicas 62

3.12.3 Análise dos dados 63

3.13 UPLC-MS para análise do lipidoma de células tratadas com a LAAO recombinante 64

3.13.1 UPLC-MS para análise do lipidoma de queratinócitos 64

3.13.2 Análise dos dados 65

4. RESULTADOS 68

4.1 Identificação dos componentes citotóxicos do veneno de *B. atrox*..... 68

4.2 Produção da LAAO recombinante e caracterização dos efeitos celulare 84

4.3 Caracterização das alterações metabólicas induzidas pela LAAO recombinante 98

5. DISCUSSÃO..... 162

6. CONCLUSÕES..... 185

7. PERSPECTIVAS 187

8. REFERÊNCIAS 189

9. ANEXOS..... 210

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Acidentes ofídicos

Acidente ofídico é considerado uma doença tropical negligenciada, sendo registrados aproximadamente 5,4 milhões de casos por ano no mundo e, somente em 2019, mais de 63 mil mortes foram causadas devido a envenenamentos por serpentes (FRY, 2018; GBD, 2022). Embora esses números sejam significativos, estima-se que eles sejam ainda mais altos, uma vez que os dados de prevalência são escassos, imprecisos ou não representativos. Isso ocorre devido a notificação não ser compulsória em muitas regiões e/ou os locais de ocorrência serem de difícil acesso e, por isso, as vítimas não procuram atendimento médico adequado (KNUDSEN et al., 2021). Geograficamente, a ocorrência desses acidentes é mais prevalente na Ásia, África e América Latina, devido a uma combinação de fatores como maior densidade de serpentes e subdesenvolvimento dos países, com condições sanitárias e de assistência a saúde mais precárias (HARRISON et al., 2009). Portanto, considerando a sua importância médica e socioeconômica mundial, a Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu como meta reduzir pela metade o número de mortes causadas por acidentes ofídicos até 2030 (GBD, 2022).

No Brasil, as serpentes são responsáveis por aproximadamente metade dos óbitos decorrentes de acidentes com animais terrestres e venenosos e, em 2021, mais de 20 mil casos de envenenamentos ofídicos foram reportados (DATASUS, 2021). As serpentes de maior importância médica no país pertencem aos gêneros *Micrurus*, *Lachesis*, *Crotalus* e *Bothrops*, sendo este último responsável por mais de 80 % dos casos no território brasileiro (DATASUS, 2021). Dentro deste gênero, as espécies *Bothrops jararaca*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops*

neuwiedi causam a maioria dos acidentes reportados no país (MALAQUE; GUTIÉRREZ, 2016).

A região Norte concentra o maior número de casos e, apesar de conter apenas 8 % da população nacional, quase 45 % dos acidentes ofídicos ocorrem na floresta Amazônica brasileira. Sendo assim, a incidência de envenenamentos nessa região chega a ser 5 vezes mais elevada do que em outras partes do Brasil (CRISTINO et al., 2021; SOUZA et al., 2022). A espécie *Bothrops atrox* é a mais importante do ponto de vista epidemiológico na região Amazônica da América do Sul (MONTEIRO et al., 2020).

1.2 Bothrops atrox

A espécie *B. atrox* (**Figura 1A**) é principalmente endêmica da floresta Amazônica, podendo ser encontrada na região leste dos Andes, sudeste da Colômbia, sul e leste da Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, leste do Equador e Peru, Panamá, norte da Bolívia e região norte do Brasil (**Figura 1B**). Ela habita predominantemente áreas florestadas, embora seja comumente encontrada em habitats em torno de assentamentos urbanos, incluindo pastagens e áreas de colheita.

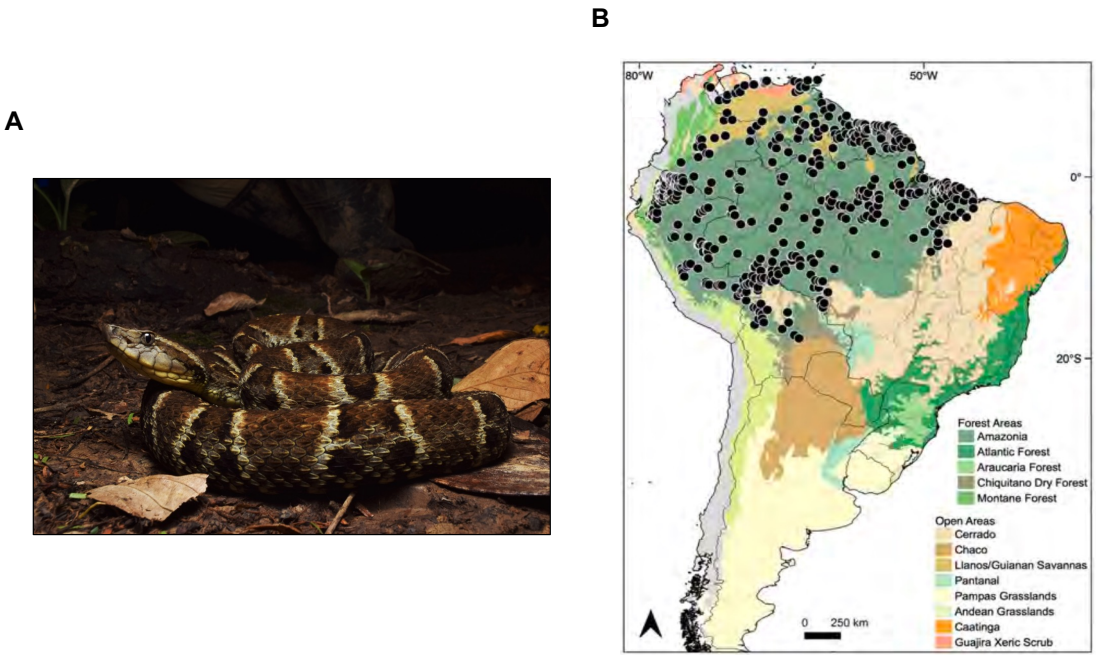


Figura 1: *Bothrops atrox* e sua distribuição geográfica. A) Serpente *Bothrops atrox*. Foto de Rainer Deo©. **B) Mapa de distribuição da serpente *B. atrox*.** América do Sul dividida em eco regiões (Retirado de: NOGUEIRA et al., 2019).

Essa serpente apresenta uma dieta generalista, alimentando-se de centípedes, peixes, sapos, lagartos, serpentes, pássaros e pequenos mamíferos. Nesse sentido, o veneno desses animais é de extrema importância para sua alimentação, uma vez que, após a inoculação, os distúrbios hemostáticos causados pelo envenenamento levam à incapacitação da presa (MONTEIRO et al., 2020). O veneno possui alta variação relacionada à ontogenia, dieta, estações do ano, gênero, localização geográfica e habitat, o que pode refletir diretamente no tipo e tamanho da presa capturada (HATAKEYAMA et al., 2020).

Em acidentes ofídicos humanos, é bem descrito que o veneno de *B. atrox* induz severa coagulopatia e extensivo dano tecidual. Uma significativa proporção de acidentados também desenvolve efeitos sistêmicos, embora a letalidade associada a este envenenamento seja baixa (MONTEIRO et al., 2020).

O envenenamento local é caracterizado por intensa dor e inchaço no local da mordida, hemorragia, equimose, formação de bolhas e necrose tecidual, podendo levar à amputação do membro afetado (DE OLIVEIRA PARDAL et al., 2004; SILVA DE OLIVEIRA et al., 2020). Já os efeitos sistêmicos causam principalmente distúrbios na coagulação sanguínea, podendo resultar em hemorragia sistêmica, trombocitopenia, hematúria e equimose (SILVA DE OLIVEIRA et al., 2020). Além disso, uma importante complicação sistêmica observada em vítimas de acidentes botrópicos é a falência renal aguda, estando diretamente relacionada a morbidade e mortalidade causadas por esses envenenamentos (ALVES et al., 2019). Além da falência renal, idade avançada e efeitos hemorrágicos favorecem o quadro de envenenamento sistêmico, assim como a ocorrência do óbito (MAGALHÃES et al., 2022). A **Figura 2** ilustra alguns dos principais sintomas locais e sistêmicos descritos nesta seção.



Figura 2: Sintomas locais (A-C) e sistêmicos (D-F) desencadeados pelo veneno de *B. atrox*. A) Extensivo edema, equimose e bolha com conteúdo sanguíneo no pé esquerdo de paciente do sexo masculino. **B)** Placa necrótica no dedo do pé direito de paciente do sexo masculino. **C)** Síndrome compartimental em toda extensão do membro inferior esquerdo, após fasciotomia. **D)** Sangramento conjuntival. **E)** Equimose no membro superior de paciente mordido na mão. **F)** Hematúria macroscópica. Imagens retiradas de MONTEIRO et al., 2020.

1.3 Soroterapia

A única terapia específica e recomendada pela OMS para o tratamento dos acidentes ofídicos é o uso de antivenenos. Estes são produzidos em animais de grande porte, normalmente cavalos, através de ciclos de imunização utilizando os venenos de interesse. A resposta imune é gerada e após estes animais atingirem um nível adequado de anticorpos produzidos, seu sangue é coletado e processado para obtenção das moléculas de IgG ou dos fragmentos Fab e F(ab')2 (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2016). Quando administrados no paciente, espera-se que os anticorpos presentes nessas formulações neutralizem as toxinas dos venenos relacionados e, consequentemente, os sintomas do envenenamento.

No Brasil, quatro instituições são responsáveis pela produção do soro antiofídico: Instituto Butantan (São Paulo - SP), Fundação Ezequiel Dias (Belo Horizonte - MG), Instituto Vital Brasil (Rio de Janeiro - RJ) e Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (Curitiba - PR). A distribuição dos soros produzidos é gratuita e financiada pelo Governo Federal, entretanto barreiras econômicas, culturais e logísticas muitas vezes impedem o suprimento adequado de antivenenos em diferentes partes do Brasil, principalmente na Amazônia. Esse fornecimento insuficiente, associado a outros desafios, como dificuldade de acesso aos hospitais e uso de práticas ineficientes, agravam ainda mais o problema de ofidismo nessa região (BECK et al., 2022).

Apesar da soroterapia ser considerada padrão ouro no tratamento dos envenenamentos por serpentes, efeitos indesejados são comumente observados. Alguns pacientes desenvolvem severas reações alérgicas e doença do soro após a administração do antiveneno (LEÓN et al., 2013). Outro ponto negativo está relacionado à sua ineficácia na neutralização dos sintomas. Embora esses soros

sejam muito eficientes em prevenir e/ou interromper os distúrbios sistêmicos, eles não são tão eficazes no controle do dano local, o que pode gerar resultados crônicos no membro afetado (GUTIÉRREZ; LEÓN; BURNOUF, 2011). Cicatrizes, atrofia muscular e amputação afetam a mobilidade do paciente e essas sequelas permanentes impactam sua qualidade de vida, trazendo também importantes consequências psicológicas e socioeconômicas (MONTEIRO et al., 2020).

1.4 Composição do veneno

Os sinais e sintomas causados pelo envenenamento são desencadeados por toxinas presentes na peçonha desses animais. Estudos demonstram que os venenos surgiram a partir de mecanismos evolutivos que envolveram o recrutamento de genes codificantes de enzimas endógenas. Embora muitas atividades biológicas pré-existentes tenham sido conservadas, houve uma importante evolução adaptativa com a duplicação e a diversificação de genes, criando uma família multigênica específica e conferindo às peçonhas ofídicas a ampla gama de atividades biológicas que elas possuem (FRY et al., 2009).

Os venenos ofídicos são uma mistura de diversas moléculas, como ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos e, principalmente, peptídeos e proteínas (MUNAWAR et al., 2018). A composição do veneno botrópico é altamente diversa, porém estudos de proteômica permitiram a identificação das principais famílias de proteínas comuns a esse gênero. Em menores quantidades são encontradas Hialuronidases, Fosfodiesterases, Nucleotidases, Peptidases, Desintegrinas e diversas outras. Todavia, usualmente as famílias mais abundantes e responsáveis pelos principais sintomas do envenenamento são as Metaloproteases, Fosfolipases,

Serinoproteases e L-Aminoácido Oxidases (**Figura 3)** (HATAKEYAMA et al., 2020; MAMEDE et al., 2020a).

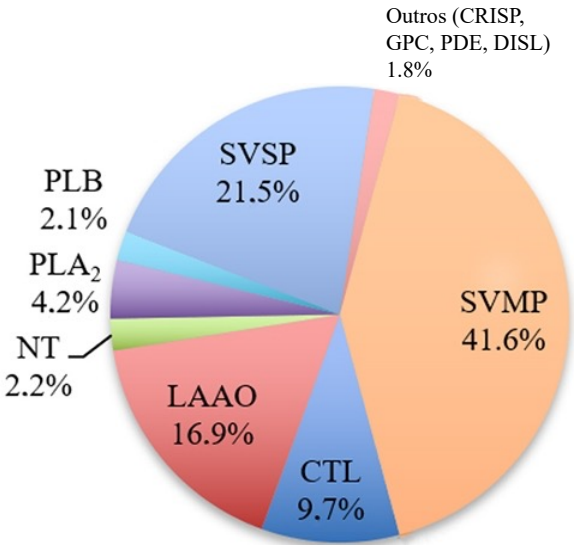


Figura 3: Composição proteica do veneno de *B. atrox*. CRISP: Proteína secretória rica em cisteína; **GPC:** Glutaminil-peptídeo ciclotransferase; **PDE:** Fosfodiesterase; **DISL:** Proteína do tipo Desintegrina; **SVMP:** Metaloprotease de veneno de serpente; **CTL:** Lectina do tipo C; **LAAO:** L-aminoácido Oxidase; **NT:** Nucleotidase; **PLA$_2$:** Fosfolipase A$_2$; **PLB:** Fosfolipase B, **SVSP:** Serinoprotease de veneno de serpente. Traduzido de HATAKEYAMA et al., 2020.

As Metaloproteases são caracterizadas por sua dependência catalítica a íons metálicos e sua alta diversidade estrutural e funcional. Vários efeitos biológicos são relacionados a essas proteases, tais como hemorragia, atividades pró e anticoagulante e fibrinólise (SANCHEZ et al., 2017). Já as Fosfolipases A$_2$ são enzimas que participam da hidrólise de glicerofosfolipídeos de membrana, resultando na produção de lisofosfolipídeos e ácidos graxos (KANG et al., 2011). Os produtos provenientes dessa reação podem desencadear uma gama de atividades farmacológicas e toxicológicas, podendo estar envolvidas no dano muscular agudo, hemólise, cardiotoxicidade e distúrbios na coagulação (XIAO et al., 2017). As Serinoproteases são enzimas estruturalmente caracterizadas por um sítio catalítico altamente conservado que inclui um resíduo de Serina reativo (Ser195) associado

com uma Histidina (His57) e um Aspartato (Asp102). Elas agem no sistema fibrinogenolítico, além de interferir em vários pontos da cascata de coagulação, o que pode causar desequilíbrio no sistema hemostático e coagulopatia (SERRANO, 2013). As L-aminoácido Oxidases, por sua vez, são o foco de estudo dessa tese e, portanto, serão descritas mais detalhadamente a seguir.

1.5 L-aminoácido Oxidases (LAAOs)

LAAOs de venenos de serpentes são proteínas homodiméricas, de aproximadamente 65 kDa cada dímero, que possuem FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo) ou FMN (Flavina Mononucleotídeo) como cofatores covalentemente ligados à sua estrutura química. Além disso, considerando as estruturas cristalográficas depositadas até o momento no PDB (*Protein Data Bank*), essas enzimas possuem uma organização básica que consiste em três domínios: um domínio de ligação ao FAD, um domínio de ligação ao substrato e um domínio helicoidal (**Figura 4**) (FELICIANO et al., 2017). Usualmente, sua estrutura tridimensional é composta de alfa-hélices, folhas-beta e muitos *loops*, os quais se dobram nos três domínios bem definidos mencionados anteriormente. Comparando a estrutura de LAAOs de diferentes espécies, as principais variações encontradas ocorrem na sequência e comprimento dos aminoácidos na região dos *loops*, o que pode explicar a preferência de substrato de diferentes enzimas (ULLAH, 2020a).

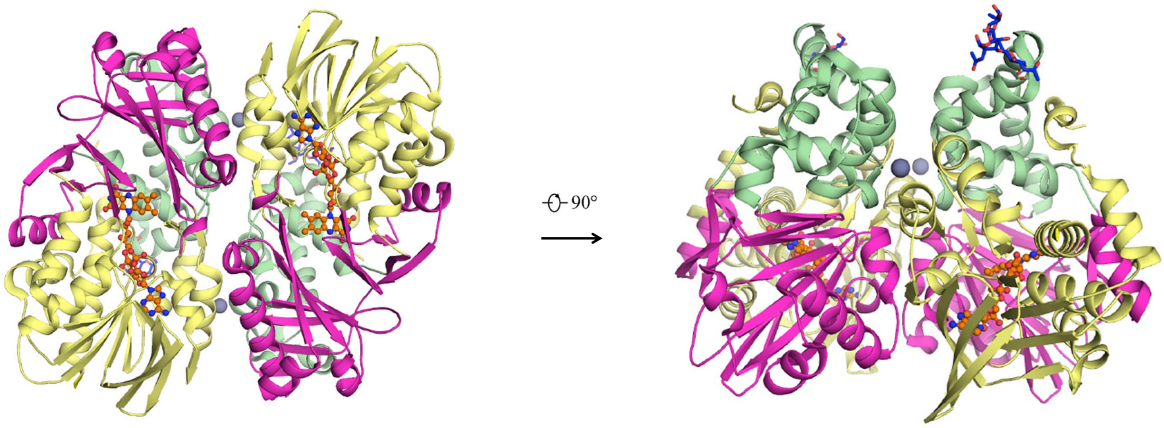


Figura 4: Estrutura cristalográfica da LAAO do veneno de *B. atrox*. Estrutura em duas posições ortogonais demonstrando os três domínios: domínio de ligação ao FAD (amarelo), domínio de ligação ao substrato (magenta) e domínio helicoidal (verde). O grupo prostético FAD está destacado em laranja. Imagem retirada de FELICIANO et al., 2017.

Um alinhamento de sequências realizado por Ullah e colaboradores (2020) demonstrou que os aminoácidos presentes na estrutura das LAAOs e que são importantes na ligação ao substrato são muito conservados entre proteínas de diferentes espécies. Os principais resíduos encontrados são Arg90, Tyr372 e Gly464 (ULLAH, 2020a). Íons Zinco têm sido encontrados em algumas LAAOs, com função de estabilizar a estrutura dimérica, sendo, portanto, considerados importantes para a atividade biológica dessas enzimas (FELICIANO et al., 2017). Outra característica relevante estruturalmente é a presença de glicosilação. Geralmente, carboidratos correspondem a 3-4 % da massa molecular total das LAAOs, porém em alguns casos essa porcentagem pode atingir até 12 % (ALVES et al., 2008a; ULLAH, 2020a). Rao e colaboradores (2006) demonstraram que essa porção glicídica é importante para a adesão na superfície celular, aumentando a concentração local de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que contribui para a morte celular por apoptose (RAO et al., 2006).

Considerando sua atividade enzimática, as LAAOs catalisam a desaminação oxidativa estereoespecífica de L-aminoácidos, levando à geração de um α-cetoácido

correspondente, com a concomitante produção de H_2O_2 e amônia (**Figura 5**) (IZIDORO et al., 2014; PAWELEK et al., 2000). Essas proteínas geralmente apresentam especificidade catalítica principalmente a aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos, porém algumas delas possuem ampla especificidade ou alta preferência por aminoácidos básicos como L-arginina (COSTA et al., 2018b; EL HAKIM et al., 2015; ULLAH, 2020a).

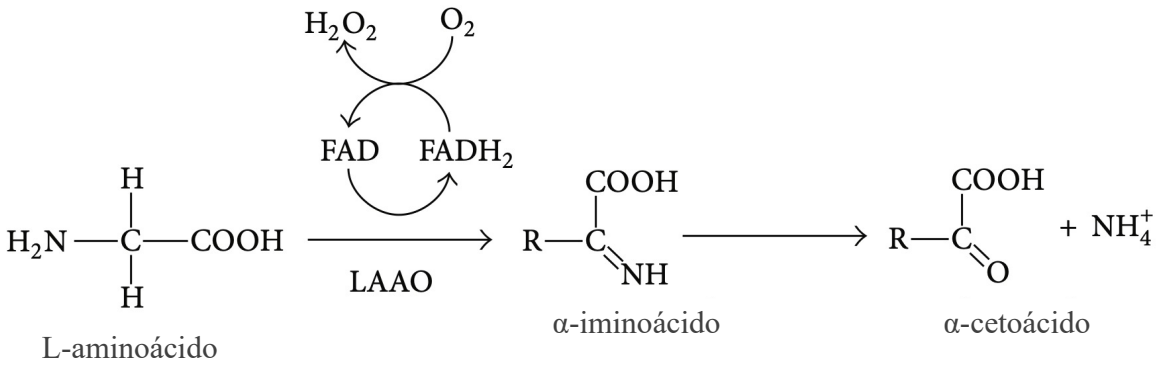


Figura 5: Esquema da reação química catalisada pela enzima L-Aminoácido Oxidase. Imagem traduzida de IZIDORO et al., 2014.

As LAAOs são consideradas uma classe de enzimas multifuncionais, pois além da produção de H_2O_2 e amônia, que possuem diferentes ações biológicas, elas também estão envolvidas em diversas vias relacionadas ao metabolismo celular e apresentam uma variedade de alvos moleculares. Diferentes ações biológicas e farmacológicas foram previamente descritas *in vitro* e *in vivo* para essas proteínas, tais como indução e inibição da agregação plaquetária, citotoxicidade, hemólise, e atividades antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral (COSTA TORRES et al., 2010; COSTAL-OLIVEIRA et al., 2019; IZIDORO et al., 2014; NAUMANN et al., 2011; TAN; BAY; GOPALAKRISHNAKONE, 2018).

Nos acidentes ofídicos, as LAAOs podem causar variados efeitos fisiológicos e patológicos, além de estarem relacionadas ao desenvolvimento das lesões locais. Costal-Oliveira e colaboradores (2019) demonstraram que a LAAO de *B. atrox* induz autofagia, apoptose e necrose em queratinócitos humanos, estando envolvida na formação de dermonecrose em camundongos (COSTAL-OLIVEIRA et al., 2019). Diferentes trabalhos descrevem efeitos citotóxicos para a LAAO, com indução de estresse oxidativo, dano ao DNA e regulação de genes relacionados à inflamação. Ainda, ela pode afetar a atividade de mitocôndrias, assim como a função lisossomal (MACHADO et al., 2018, 2019a; RIBEIRO et al., 2016). Burin e colaboradores (2020) demonstraram que a LAAO pode induzir regulação epigenética em células tumorais e Pereira-Crott *et. al* (2020) sugerem que essa enzima pode funcionar como agente imunomodulador de neutrófilos (BURIN et al., 2020; PEREIRA-CROTT et al., 2020). Devido a gama de atividades nas quais a LAAO está envolvida e sua participação nos efeitos locais causados pelo veneno, essa enzima foi escolhida como foco de estudo no presente trabalho.

Até o momento, a maioria dos dados encontrados na literatura a respeito dos efeitos causados pela LAAO utilizam células imortalizadas e/ou cancerígenas. Poucos trabalhos se baseiam em células normais humanas, com a intenção de compreender as ações dessa proteína durante o envenenamento. No caso de estudos envolvendo o dano local, a utilização de tipos celulares que representem melhor a estrutura da pele e seus componentes seria mais adequada para a investigação dos mecanismos que levam a esse dano. Sendo assim, neste estudo utilizou-se células endoteliais de micro vasculatura e queratinócitos da pele (ambos de origem primária humana) para avaliação dos efeitos citotóxicos do veneno ou da LAAO.

É importante ressaltar que as pesquisas envolvendo a LAAO proveniente de venenos de serpentes majoritariamente utilizam a proteína nativa, purificada da peçonha de interesse. Entretanto, esse processo é laborioso, envolvendo diversos passos cromatográficos, além de serem necessárias grandes quantidades de veneno para obtenção da proteína em quantidades razoáveis (NAUMANN et al., 2011; ZHONG et al., 2009). Ainda, a LAAO pode ser instável após purificação, o que dificulta a realização de ensaios que se baseiam em sua atividade enzimática (COSTAL-OLIVEIRA et al., 2019). Diante disso, a produção da LAAO de forma recombinante é uma estratégia interessante, empregada neste trabalho de tese, que elimina a necessidade do veneno bruto, além de permitir a produção da proteína em maiores escalas, possibilitando a realização de mais estudos.

1.6 Proteínas recombinantes

Proteínas recombinantes são proteínas codificadas por uma sequência de DNA previamente manipulada e que pode ser inserida em diferentes sistemas para indução da sua expressão. Os sistemas mais comuns atualmente incluem a utilização de bactérias, leveduras, fungos filamentosos, células de insetos e células de mamíferos (ROSANO; CECCARELLI, 2014). A produção de proteínas recombinantes em *Escherichia coli* é amplamente utilizada, devido a facilidade de manipulação, rápido crescimento desses organismos, baixo custo, ampla gama de vetores e protocolos disponíveis, além de um vasto conhecimento científico a respeito de metodologias que envolvem essa bactéria. Porém, a utilização de *E. coli* pode ser desafiadora, pois muitas vezes as proteínas produzidas são mal enoveladas e/ou inativas, com a formação de agregados insolúveis. Além disso, esse sistema não é recomendado para proteínas que possuem glicosilações, uma vez que a maquinaria

necessária para esse tipo de modificação pós-traducional está ausente nestes organismos (WINGFIELD, 2016).

Nesse sentido, o uso de células de mamíferos é vantajoso, uma vez que elas são capazes de realizar modificações pós-traducionais mais complexas, além de possuírem chaperonas e cofatores, o que facilita a produção de moléculas em sua forma solúvel e funcional (DYSON, 2016). A transfecção de células HEK293-T (*Human Embryonic Kidney*) tem se mostrado promissora devido ao alto rendimento e rapidez de produção, quando comparadas a outras que também são utilizadas com o mesmo propósito (FLIEDL; GRILLARI; GRILLARI-VOGLAUER, 2015).

A expressão da LAAO de diferentes espécies animais já foi testada em variados sistemas heterólogos, porém os níveis de expressão geralmente não são satisfatórios. Isso também foi observado para as LAAOs de venenos de serpente. O rendimento é baixo e, até o momento, poucas proteínas foram expressas com sucesso (CHEN et al., 2012a; KOMMOJU; MACHEROUX; GHISLA, 2007a; TORII et al., 2000a). Por esse motivo, a produção da LAAO recombinante é considerada desafiadora. Entretanto, sua obtenção é benéfica no sentido de possibilitar uma investigação mais ampla dos mecanismos desencadeados por essa enzima, uma vez que sua produção pode ser otimizada para maiores escalas, fornecendo quantidades de proteína suficientes para a realização dos ensaios necessários. Além disso, a manipulação de plasmídeos de expressão permite a produção de variantes que possuem mutações sítio-específicas em aminoácidos e regiões relevantes para a enzima, o que também contribui para análises funcionais. Visto que a LAAO está envolvida nos efeitos locais do envenenamento, estudos de caracterização são relevantes, no sentido de desvendar as ações tóxicas responsáveis pelos danos causados na pele das vítimas.

1.7 Epitélio, endotélio e junções aderentes

A pele é o principal órgão afetado pelo envenenamento local causado por serpentes do gênero *Bothrops*, sendo caracterizado por extensiva necrose no local da mordida e lesão endotelial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Estruturalmente, a pele humana é composta por três camadas: hipoderme, derme e epiderme. A hipoderme é a camada mais interna e contém principalmente adipócitos. A derme está acima desta camada e é formada por uma complexa matriz de colágeno e elastina, os quais estão em uma rede de vasos sanguíneos e fibroblastos. Já a camada mais superficial, a epiderme, é composta, em sua maioria, por queratinócitos que estão em constante renovação, e por melanócitos e células de *Langerhans* (BOURY-JAMOT et al., 2006). Essas camadas se organizam de forma a realizar as diversas funções que são mediadas pela pele, tais como barreira física, protegendo o corpo de agentes infecciosos, e funções relacionadas a termorregulação, sensações, proteção ultravioleta, reparo de feridas e regeneração (SOMEYA; AMAGAI, 2019).

Para que essas atividades estejam em perfeito funcionamento, é importante que o tecido epitelial siga uma organização característica, baseada na adesão célula-célula, mediada por junções oclusivas, aderentes e moléculas de adesão. Além da manutenção do contato entre células vizinhas, essa adesão também garante a passagem de substâncias entre elas e a polarização apical-basal da membrana plasmática, para a distinção entre compartimentos interno e externo (THUENAUER; RODRIGUEZ-BOULAN; RÜMER, 2014).

Nas células da epiderme, a junção aderente é formada pela interação homofílica entre domínios extracelulares de moléculas de E-caderina entre células vizinhas. A E-caderina é uma proteína transmembrana que possui 3 domínios:

domínio intracelular, domínio transmembrana e domínio extracelular. O domínio extracelular se liga a íons Ca^{2+} e interage com moléculas de E-caderina de células adjacentes, formando as junções aderentes. O domínio citoplasmático, por sua vez, se associa à Cateninas (α e β) e com o citoesqueleto de Actina, regulando a realização de movimentos celulares, por exemplo (**Figura 6**) (KOBIELAK; FUCHS, 2004).

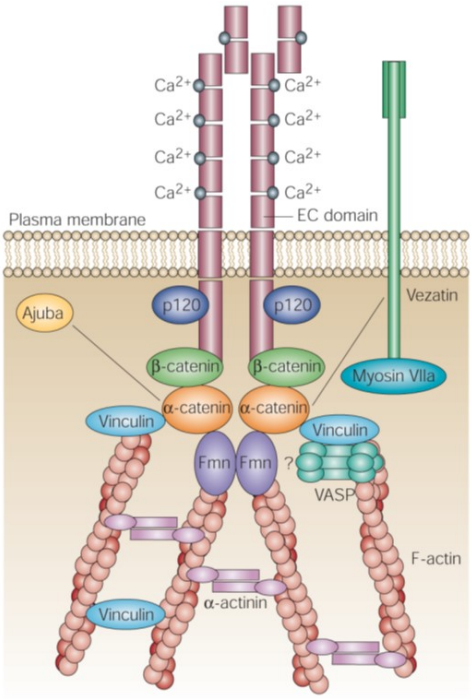


Figura 6: Complexo multiproteico das junções aderentes no epitélio. O domínio extracelular da E-caderina é sujeito a mudanças conformacionais dependentes de Ca^{2+}, as quais permitem sua homodimerização na membrana plasmática. Através de interações com E-caderinas de células vizinhas, dímeros de E-caderina opostos podem integrar os citoesqueletos de Actina. A estabilização da adesão intercelular é dependente da ligação entre o domínio citoplasmático da E-caderina e a β-catenina, que por sua vez se liga à α-catenina, proteína central para o recrutamento de diferentes moléculas do citoesqueleto (KOBIELAK; FUCHS, 2004).

Outro ponto importante a ser mencionado envolve a camada endotelial que reveste os vasos sanguíneos. Os nutrientes e oxigênio necessários para suprir as células da pele são fornecidos pelos vasos sanguíneos contidos na matriz extracelular das camadas inferiores. Esses vasos são revestidos por células endoteliais que

também estão organizadas seguindo a estrutura padrão do tecido epitelial. No caso do endotélio, a VE-caderina, proteína expressa apenas nas células endoteliais, é o componente transmembrana chave nessa regulação. Com estrutura similar à E-caderina, a VE-caderina também se associa às cateninas e à actina do citoesqueleto (**Figura 7**), o que é de vital importância para a estabilidade das junções e sua dinâmica de abertura e fechamento (CERUTTI; RIDLEY, 2017).

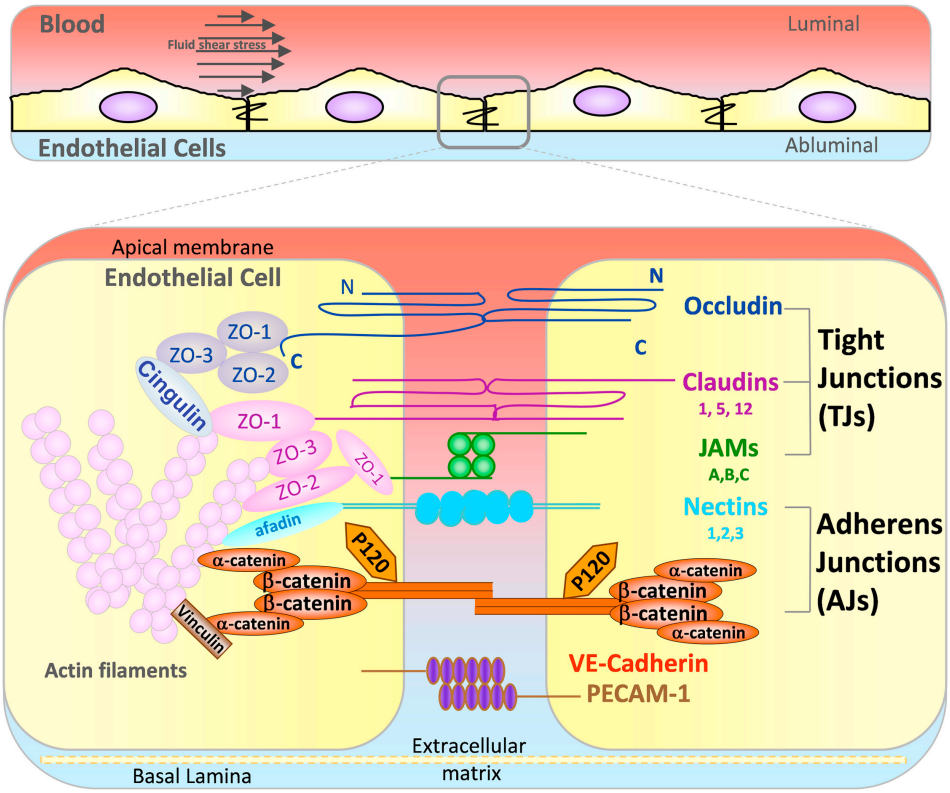


Figura 7: Complexo multiproteico das junções celulares no endotélio. Proteínas transmembranas presentes em células endoteliais formam as junções oclusivas (*tight junctions*) e aderentes (*adherens junctions*). VE-Caderina é a molécula chave das junções aderentes e, através das proteínas α e β-catenina, se conecta indiretamente aos filamentos de actina citoplasmáticos, o que é essencial para o funcionamento adequado das junções (CERUTTI; RIDLEY, 2017).

Até o momento, poucos trabalhos na área de Toxinologia investigam a estrutura celular e moléculas de adesão. Ensaios utilizando modelos celulares têm auxiliado na caracterização das ações tóxicas causadas nas células e têm demonstrado correlação com os efeitos observados *in vivo* (DE SOUZA et al., 2015;

GUTIÉRREZ et al., 2021). Diante da importância das moléculas de adesão celular e do citoesqueleto na manutenção da integridade da pele, considera-se relevante seu estudo. Alguns trabalhos têm demonstrado que venenos ofídicos e suas toxinas causam danos ao citoesqueleto de diferentes tipos celulares, o que pode contribuir para sua toxicidade (NASCIMENTO et al., 2007a; WU; HUANG, 2003). Nosso grupo de pesquisa demonstrou anteriormente que queratinócitos tratados com a LAAO do veneno de *B. atrox* apresentam desorganização da E-caderina e prolongamentos anormais no citoesqueleto, com desarranjo dos feixes de actina (COSTAL-OLIVEIRA, 2017).

Entretanto, devido à complexidade dos venenos e ação de diferentes toxinas, é importante primeiramente determinar quais componentes prejudicam a adesão celular e causam citotoxicidade. A partir disso, pode-se direcionar o estudo a eles, com o objetivo de caracterizar os efeitos causados. Considerando isto, o presente trabalho inicialmente avaliou o efeito do veneno de *B. atrox* na estrutura de queratinócitos da pele, a fim de identificar quais proteínas são as principais responsáveis pelos efeitos citotóxicos observados, para então caracterizá-los. Entender como essas ações tóxicas acontecem é importante, no sentido de identificar possíveis alvos celulares que possam servir de base no desenvolvimento de novas terapias visando impedir ou interromper os mecanismos citotóxicos.

1.8 Descoberta de alvos moleculares no envenenamento botrópico

No ramo da Toxinologia, as estratégias mais utilizadas para a busca de novas terapias envolvem a descoberta de moléculas que possam ser direcionadas de forma a bloquear componentes específicos do veneno de interesse (BULFONE et al., 2018). Diferentes abordagens que substituam os antivenenos vêm sendo investigadas, como

o desenvolvimento de anticorpos monoclonais, assim como a busca por componentes naturais (principalmente de plantas), inibidores peptídicos e pequenas moléculas inibidoras. Entretanto, desvantagens como toxicidade, inespecificidade, dificuldade de obtenção dos compostos ou baixo rendimento de produção têm impedido a implementação dessas terapias alternativas (ALANGODE; RAJAN; NAIR, 2020).

Outra abordagem na procura por novos tratamentos seria a busca por alvos moleculares endógenos que possam ser regulados de modo a impedir o desencadeamento de determinadas vias de sinalização. Esse tipo de estratégia já vem sendo utilizada para tratamento de algumas patologias, como em doenças autoimunes, diferentes tipos de inflamação, além de sepse e câncer, apresentando resultados promissores (BANERJEE et al., 2017; BULGIN; PODCHEKO, 2016; NAILWAL; DOSHI, 2021; ZHANG; NING, 2021). Para que isso seja possível, é necessário o entendimento dos efeitos metabólicos que ocorrem na célula durante o evento de interesse, a fim de identificar moléculas que sejam essenciais para esses processos e que, portanto, possam ser utilizadas como alvos na terapia.

Estudos de fenotipagem metabólica oferecem uma enorme possibilidade de descoberta de biomarcadores e alvos moleculares (GAVAGHAN; WILSON; NICHOLSON, 2002). A utilização de técnicas baseadas em Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (LC-MS) é amplamente empregada nesses estudos, uma vez que permitem a detecção e posterior identificação de um elevado número de metabólitos em amostras complexas. Métodos não-direcionados (*untargeted*) são os mais comuns, fornecendo resultados relativos e dados qualitativos. Nos métodos direcionados (*targeted*), há a combinação de apropriados controles internos, o que possibilita a obtenção de dados quantitativos (GRAY et al., 2017a).

As proteínas são uma das classes de moléculas mais estudadas através dessas abordagens, por apresentarem extrema importância nas células, com funções estruturais, papéis regulatórios e em vias do metabolismo (LARANCE; LAMOND, 2015a). Estudos de análises do proteoma celular têm sido realizados para identificação de características metabólicas específicas, relacionadas a determinadas patologias, que podem ser inferidas baseando-se em diferenças encontradas no conjunto de proteínas das células. Essas informações são úteis no sentido de propor terapias que sejam direcionadas a essas mudanças metabólicas (GEBERT et al., 2021; RAFFEL et al., 2020).

Aminoácidos ou compostos contendo o grupamento amino são outra classe importante de moléculas avaliadas em análises direcionadas, uma vez que são modulados em resposta a diferentes estímulos. Eles são os principais blocos que constroem as proteínas e funcionam também como importantes reguladores da expressão gênica, e de hormônios e neurotransmissores (FERRÉ et al., 2019). Alterações em seus níveis têm sido associadas com desordens do metabolismo, e esta flutuação tem sido proposta como potencial biomarcador de algumas patologias (GAO et al., 2016). Atualmente, diversos métodos têm sido desenvolvidos para esse tipo de estudo e muitos deles utilizam espectrometria de massa para detecção dessas moléculas (KASPAR et al., 2009).

Os lipídeos, por sua vez, compõem outro grupo de metabólitos essenciais que apresentam funções fundamentais e podem fornecer uma leitura do estado metabólico da célula. O conteúdo total de lipídeos celular é chamado lipidoma e sua análise tem permitido a descoberta de biomarcadores lipídicos em condições patológicas. Diferenças nos níveis de lipídeos podem simultaneamente revelar

variações nas concentrações e atividade de enzimas, assim como nos padrões de expressão gênica (HAN, 2016).

Diante da importância dessas moléculas mencionadas, uma análise utilizando Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS) foi utilizada neste trabalho para avaliação do proteoma, dos níveis de aminoácidos e aminas biogênicas e do lipidoma de células endoteliais e queratinócitos tratados com amostras da LAAO recombinante. A hipótese desse trabalho é de que diferentes eventos celulares são afetados na presença da LAAO, principalmente processos oxidativos, e que esses efeitos são catálise-dependente. Essa avaliação pode auxiliar na busca integrada por alvos moleculares que possam ser considerados para o desenvolvimento de terapias alternativas para o tratamento dos efeitos locais causados pelo veneno da serpente *B. atrox*.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar as principais proteínas presentes no veneno de *Bothrops atrox* responsáveis pelos efeitos citotóxicos e caracterizar as alterações celulares e metabólicas desencadeadas pela L-aminoácido oxidase recombinante (rLAAO), em células endoteliais e queratinócitos humanos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade e efeitos na estrutura celular causados pelo veneno de *Bothrops atrox* em queratinócitos humanos;
- Obter frações do veneno através de cromatografia por exclusão molecular e de troca iônica;
- Avaliar a citotoxicidade e efeitos na estrutura celular causados pelas frações do veneno de *B. atrox*;
- Determinar as atividades enzimáticas presentes nas frações do veneno;
- Identificar as principais proteínas responsáveis pela citotoxicidade das frações;
- Produzir a LAAO de *B. atrox* em sua forma recombinante (rLAAO) através da transfecção de células de mamífero (HEK 293T);
- Obter uma versão mutada da LAAO em sua forma recombinante ($rLAAO^{R90A}$);
- Avaliar a pureza e atividade enzimática das proteínas recombinantes obtidas;
- Verificar a citotoxicidade e alterações celulares causadas pela rLAAO e $rLAAO^{R90A}$ em células endoteliais e queratinócitos humanos;

- Analisar o proteoma de células endoteliais e queratinócitos tratados com rLAAO e rLAAO^{R90A};
- Quantificar o nível de aminoácidos e aminas biogênicas de células endoteliais e queratinócitos tratados com rLAAO e rLAAO^{R90A};
- Analisar o lipidoma de queratinócitos tratados com a rLAAO;
- Determinar possíveis vias do metabolismo relacionadas às alterações encontradas no proteoma, nos níveis de aminoácidos e aminas biogênicas e no lipidoma das células avaliadas;

Material e métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do veneno

O veneno de *B. atrox* utilizado nesse estudo foi gentilmente cedido pelo professor Armando Yarlequé, da Universidade Nacional Maior de São Marcos (UNMSM) em Lima, Peru e foi estocado a -20 ºC até o uso. Quando necessário, o veneno foi diluído em água ultrapura e seu conteúdo proteico foi determinado através do *BCA Protein Assay Kit* (Pierce, 23227), ou pelo método de Lowry (1951) (DC™ Protein Assay – Bio-Rad), utilizando Albumina Sérica Bovina (BSA) como padrão.

3.2 Fracionamento do veneno e SDS-PAGE

O veneno de *B. atrox* foi previamente fracionado no laboratório por Costal-Oliveira (2019) utilizando duas etapas cromatográficas. Resumidamente, o veneno (2 g) foi aplicado em duas colunas 2,5 x 100 cm em série empacotadas com Sephacryl S-200, que foram anteriormente equilibradas com tampão acetato de amônio. As amostras foram eluídas no mesmo tampão, a um fluxo de 7 mL/h e as frações foram monitoradas a 280 nm. Em seguida, a fração que apresentou maior citotoxicidade (Fração-2, ≅150 mg) foi aplicada em uma coluna DEAE Sepharose CL 6B (1,5 x 20 cm), previamente equilibrada com tampão Tris pH 8.5. As proteínas foram eluídas em um gradiente linear de NaCl de 0-0,3 M no mesmo tampão, a um fluxo de 12 mL/h, e as frações foram monitoradas a 280 nm.

As frações (15 μg) foram posteriormente avaliadas por SDS-PAGE. O ensaio foi realizado em gel de poliacrilamida 12 % em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), de acordo com o método proposto por Laemmli (1970). Tampão de amostra (5x concentrado: 0,2 mM Tris-HCl pH 6.8, 50 % glicerol, 5 % SDS, 0,25 M DTT, 250

mg azul de bromofenol) foi adicionado às amostras, que foram aquecidas por 5 minutos a 100 ºC antes da aplicação no gel. A corrida foi realizada a 200V. A coloração das proteínas foi feita utilizando *Comassie Blue.*

3.3 Avaliação do perfil enzimático das frações de *B. atrox*

As atividades enzimáticas das frações provenientes da primeira etapa cromatográfica (coluna S-200) foram mapeadas através de diferentes ensaios *in vitro*.

L-aminoácido oxidase: A atividade de LAAO foi avaliada conforme descrito por Costal-Oliveira (2019), com pequenas modificações. O veneno ou as frações (2 µg) foram incubados com 100 mM de tampão Tris-HCl pH 8.5, 5 mM L-Leucina como substrato, peroxidase (5 U/mL) e 2 mM ortofenilenodiamina (OPD) por 1 hora a 37 ºC. H_2SO_4 (50 µL) foi utilizado para parar a reação. A absorbância foi determinada a 490 nm utilizando um leitor de microplacas (Bio-Rad - modelo 680, Hercules, California, EUA). A atividade específica das amostras foi expressa como $\Delta A_{492\ nm/min}$, relativo à concentração proteica (mg).

Hialuronidase: O veneno de *B. atrox* ou as frações (50 µg) foram incubados em tampão acetato (0,2 M acetato de sódio e 0,15 M NaCl) contendo 12,5 µg de Ácido Hialurônico (AH) em placa de 96 poços, conforme descrito por Rodrigues e colaboradores (2018). Uma curva contendo cinco pontos com diferentes concentrações de AH, que indiretamente correspondem a 0 %, 25 %, 50 %, 75 % e 100 % de atividade hialuronidásica, foi utilizada como curva controle. A placa foi incubada por 15 minutos a 37 ºC, seguida pela adição de 200 µL de 2,5 % (m/v) de Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) dissolvido em 2 % (m/v) de NaOH em cada poço. A turbidez resultante foi medida a 405 nm em leitora de placas (Bio-Rad - modelo 680, Hercules).

Atividades proteolíticas: O peptídeo FRET (SCHNEIDER et al., 2014) Abz-LVEALYQ-EDDnp (20 µL), que contêm um sítio de clivagem específico para metaloproteases, foi diluído em 100 mM de tampão Tris-HCl contendo 50 mM NaCl (60 µL) e então incubado com o veneno ou as frações (1 µg) por 30 minutos. A placa foi lida em fluorímetro (Synergy, BioTek) a 340 nm de excitação e 440 nm de emissão. Para a atividade de serinoproteases, a mesma quantidade de veneno ou frações foi pré-incubada com 0.2 µM EDTA (Labsinth) por 1 hora para inibição das metaloproteases. O ensaio foi realizado conforme já descrito, porém utilizando um peptídeo FRET que contêm um sítio de clivagem específico para serinoproteases (Abz-FLPRSFRQ-EDDnp) (RODRIGUES et al., 2018). Os valores foram plotados como Unidade Relativa de Fluorescência (RFU).

Atividade de Fosfolipase A_2: A atividade fosfolipásica do veneno ou das frações (2 µg) foi avaliada utilizando o kit EnzChek® Phospholipase A_2 Assay (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. Os valores foram expressos em relação ao controle positivo (PLA_2 purificada do veneno de abelha).

3.4 Cultura celular

Células HEK 293T, provenientes de rim embrionário humano, foram cultivadas em placas de 10 cm (Corning) em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Gibco) suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco), 2 mM L-Glutamina (Sigma) e 2,5 % de Penicilina-Estreptomicina (Sigma).

Fibroblastos (J2-3T3) foram mantidos para serem utilizados como cama alimentadora para queratinócitos e foram cultivados nas mesmas condições que as células HEK 293T. Quando confluentes, os fibroblastos foram tratados por 2 horas

com 4 µg/mL de Mitomicina C (Sigma), com o objetivo de inibir a síntese de DNA, e em seguida foram tripsinizados e semeados juntamente com os queratinóticos.

Queratinócitos humanos primários (*Normal Human Epidermal Keratinocytes* – NHEKs, Lonza) foram cultivados em placas de 10 cm (Corning) em meio FAD (DMEM:F12, BioWittaker, Lonza) suplementado com 10 % de SFB, 1,8 mM $CaCl_2$, 2 mM L-Glutamina, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 5 ng/mL de insulina, 0,5 µg/mL de hidrocortisona, 0,1 nM de toxina colérica (todos adquiridos de Sigma) e 10 ng/mL de fator de crescimento epidermal (Stratech).

Células primárias endoteliais de microvasculatura da derme humana (*Human Dermal Microvascular Endothelial Cells* – HDMECs, PromoCell) foram cultivadas em placas de 10 cm (Corning) em meio ECG-MV (*Endothelial Cell Growth*-MV, PromoCell, C-22020) suplementado com 1 % de Penicilina-Estreptomicina (Sigma) e *Supplement Mix* (PromoCell, C-39225), o qual contêm 5 % de SFB, 0,004 mL/mL de suplemento para crescimento de célula endotelial, 10 ng/mL de fator de crescimento epidermal, heparina (90 µg/mL) e hidrocortisona (1 µg/mL).

Todas as células foram mantidas em atmosfera controlada a 37 ºC e 5 % de CO_2.

3.5 Avaliação da citotoxicidade do veneno e das frações de *B. atrox*

3.5.1 *Ensaio de viabilidade celular*

A fim de investigar os efeitos do veneno e identificar quais frações apresentam citotoxicidade, a viabilidade de células tratadas com o veneno ou com as frações foi avaliada utilizando o reagente Alamar Blue, segundo a metodologia descrita por Damico e colaboladores (2007), com modificações (DAMICO et al., 2007). O Alamar Blue é um indicador de oxidação/redução e, quando ele recebe elétrons, o composto

Resazurina passa de um estado oxidado (azul e não fluorescente), para um estado reduzido (Resorufina), o qual é rosa e fluorescente, indicando a presença de células viáveis em cultura (RAMPERSAD, 2012).

Queratinócitos foram semeados em microplaca de 96 poços (5 x 10^3 células/poço) contendo fibroblastos (7 x 10^3 células/poço) em meio FAD completo (conforme descrito no item 3.4). Quando as células atingiram 60-80 % de confluência, o meio foi substituído por DMEM sem vermelho de fenol contendo 1 % de SFB e 2 mM L-Glutamina por 3 horas. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações de veneno (0,15 – 20 μg/mL) ou com as frações (40 μg/mL) diluídas em meio FAD contendo 1 % de SFB. Após 24 horas, o meio foi removido e substituído por Alamar Blue 10 % (diluído em DMEM) e as placas foram novamente incubadas por 3 horas. A fluorescência foi determinada a 560 nm de excitação e 590 nm de emissão utilizando fluorímetro POLARstar Galaxy fluorimeter com FLUOstar Galaxy *software* (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany) ou SpectraMax® iD3.

A porcentagem de viabilidade celular foi calculada considerando a média dos valores de fluorescência das células não tratadas como 100 % de viabilidade. Os valores dos poços contendo apenas meio (branco), sem células, foi subtraído dos outros para corrigir qualquer leitura residual do meio de cultura. Os valores representam a média de três replicatas biológicas independentes. A concentração efetiva de veneno capaz de reduzir em 50 % a viabilidade celular (EC_{50}) foi determinada utilizando uma curva concentração-resposta no *software* GraphPad Prism 8.0.

3.5.2 *Avaliação da estrutura celular utilizando marcação por imunofluorescência*

Para avaliar os efeitos do veneno e das frações na morfologia de queratinócitos, ensaios de imunofluorescência foram realizados. Os NHEKs (2 x 10^4 células/poço), juntamente com os fibroblastos (4,4 x 10^4 células/poço), foram cultivados em lamínulas de 13 mm de diâmetro (Scientific Laboratory Supplies) dispostas em placas de 24 poços, conforme descrito por Costal-Oliveira e colaboradores (2019). Após 2 dias, as células foram tratadas com 1 EC_{50} do veneno por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas ou com 10 μg/mL de cada uma das frações por 3 horas, diluídos em meio FAD completo. As células não-tratadas, cultivadas em meio completo foram utilizadas como controle negativo.

Após os tratamentos, as células foram fixadas com 4 % de paraformaldeído (Thermo Fisher) por 10 minutos a temperatura ambiente e mantidas *overnight* a 4 ºC em Tampão Fosfato Salino (PBS). Em seguida, as lamínulas foram colocadas em câmara úmida, coberta com papel alumínio, de forma a mantê-las úmidas e protegidas da luz. As células foram então bloqueadas e permeabilizadas em PBS contendo 10 % de SFB e 0,1 % de Triton X-100 por 10 minutos a temperatura ambiente. O anticorpo primário (**Tabela 1**) diluído em PBS contendo 10 % de SFB foi incubado posteriormente por 1 hora a temperatura ambiente. Após 9 lavagens com PBS, os anticorpos secundários e sondas apropriados (**Tabela 2**) foram adicionados e incubados por mais 1 hora. Após as lavagens com PBS e, em seguida, com água, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro (VWR) com Mowiol (Sigma).

Tabela 1: Anticorpo primário utilizado nos ensaios de imunofluorescência com NHEKs.

Anticorpo	Clone	Fornecedor	Animal de origem	Diluição
E-caderina	HECD1	Cedido por M. Takeichi, Keio University, Japão	Camundongo	1:1000

Tabela 2: Anticorpo secundário e sondas utilizados nos ensaios de imunofluorescência com NHEKs.

Conjugado	Fornecedor	Animal de origem	Diluição
Alexa Fluor 488 - conjugado anti-IgG de camundongo	Jackson Immuno Research Laboratories	Cabra	1:1000
Phalloidin-Atto-565	Sigma-Aldrich	---	1:1000
DAPI	Sigma-Aldrich	---	1:3000

As imagens foram adquiridas em microscópio Olympus Provis BX51 (aumento: 40x ou 60x), acoplado à câmera monocromática SPOT RT, usando o *software* Andor Solis. As imagens foram processadas utilizando o *software* Image J.

3.6 Espectrometria de massa das frações citotóxicas

As frações de veneno obtidas após cromatografia em coluna S-200 (Frações 1, 2 e 5) e DEAE (Frações 2.3 e 2.4), identificadas como as mais citotóxicas do veneno, foram submetidas a espectrometria de massa para análise de sua composição. Essa etapa foi realizada comercialmente pela FingerPrints Proteomics, na Universidade de Dundee, Escócia.

Os resultados foram analisados pelo MASCOT (www.matrixscience.com), integrado ao banco de dados SwissProt, utilizando como parâmetros: tolerância de massa do íon precursor de 10 ppm e tolerância do fragmento iônico de 0.6 Da. Carbamidometilação de resíduos de Cisteína foi definida como modificação fixa e oxidação (M), dioxidação (M), acetilação N-terminal (N-term), Piro-glu de Q (N-term Q) como modificações variáveis, além de duas clivagens enzimáticas incorretas permitidas. A abundância de peptídeos foi estimada por *Exponential Modified Protein Abundance Index* (emPai), o qual é baseado na cobertura da proteína pelo número de *matches* encontrados em uma busca em banco de dados (SHINODA; TOMITA; ISHIHAMA, 2009).

3.7 Produção e purificação da LAAO recombinante

3.4.1 *Obtenção dos plasmídeos*

O plasmídeo contendo a sequência gênica da LAAO nativa de *B. atrox* foi previamente produzido no laboratório Braga Lab, Imperial College London, pela Dra. Krisna Prak e as informações referentes a ele estão sendo atualmente compiladas para publicação.

A LAAO produzida contém uma cauda de histidina (6-His *tag*), sendo esta uma característica que auxilia na purificação e detecção da proteína recombinante ao final do processo. Além disso, a fim de se produzir uma proteína mutante sem atividade catalítica, um plasmídeo com uma mutação que codifica para a substituição de uma Arginina por uma Alanina, na posição 90 da sequência de aminoácidos, também foi produzido. Ambos os plasmídeos foram utilizados para a transfecção de células HEK 293T e consequente obtenção das proteínas recombinantes. A LAAO contendo a

sequência original da proteína nativa foi denominada rLAAO e a LAAO com a mutação foi denominada rLAAO^{R90A} (**Figura 8A**).

3.4.2 *Transfecção das células e purificação da rLAAO*

Células HEK 293T foram semeadas em placas de cultura quadradas de dimensões 245 x 245 x 25 mm (Thermo Scientific) e incubadas em estufa a 37 ºC e 5 % de CO_2, até atingirem aproximadamente 70 % de confluência. Os plasmídeos para a produção da rLAAO ou rLAAO^{R90A} foram utilizados para transfecção das células e o sobrenadante celular (contendo a LAAO secretada) foi coletado por 5 dias. Ao final do processo, os respectivos sobrenadantes foram combinados separadamente e concentrados para purificação (os detalhes metodológicos estão contidos no manuscrito que está em processo de preparação pelo laboratório Braga Lab) (**Figura 8B**).

As proteínas foram purificadas baseando-se na afinidade da cauda de histidina por níquel utilizando *beads* de Agarose contendo esse íon imobilizado em sua superfície (Ni-NTA Agarose, Qiagen). A purificação foi realizada conforme as instruções do fabricante (**Figura 8B**).

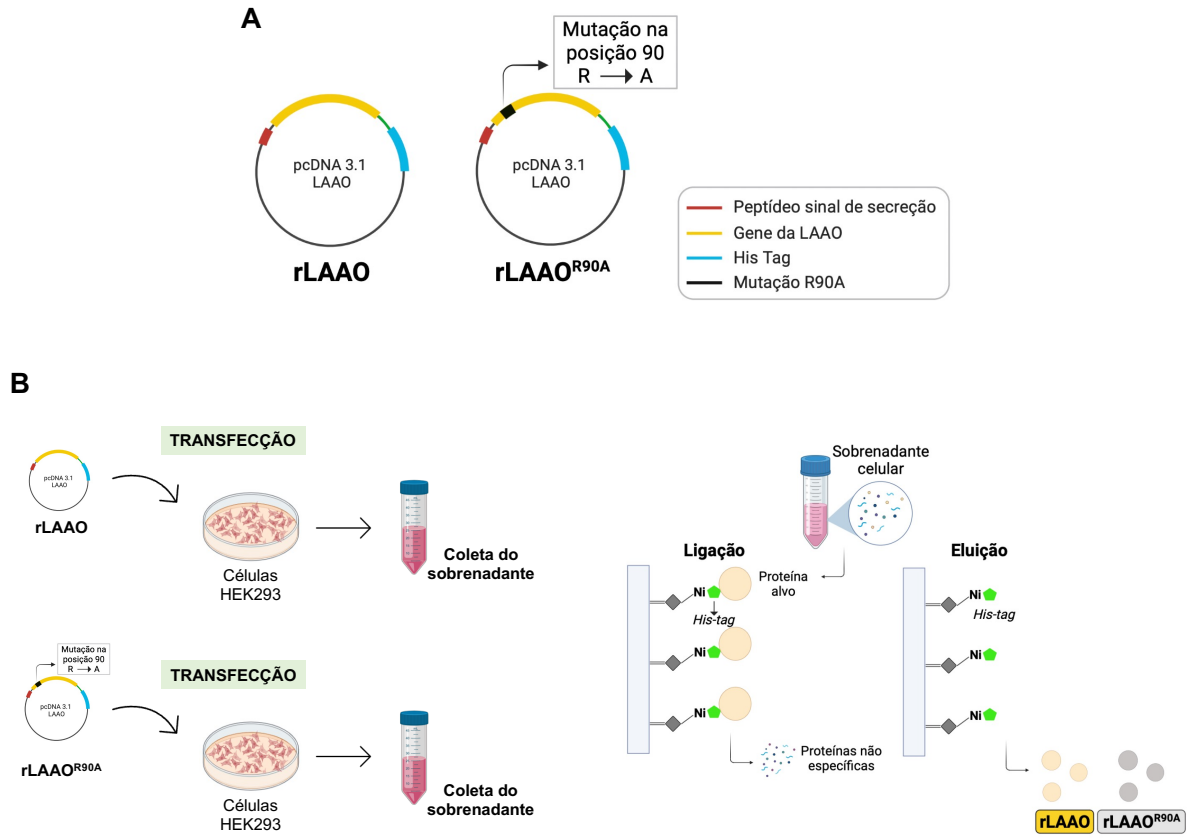


Figura 8: Esquema do processo de produção e purificação da LAAO recombinante. A) Plasmídeos utilizados para transfecção das células. rLAAO: plasmídeo contendo a sequência gênica da LAAO nativa para produção da LAAO recombinante. rLAAO^{R90A}: plasmídeo com a mesma sequência do rLAAO, porém contendo uma mutação que codifica para a substituição de uma Arginina por uma Alanina na posição 90 da sequência de aminoácidos da proteína. **B) Processo de transfecção e purificação da LAAO recombinante.** Os plasmídeos para produção da rLAAO ou rLAAO^{R90A} foram utilizados para transfecção de células HEK293T. O sobrenadante celular de cada uma das culturas transformadas foi coletado, concentrado e utilizado separadamente para purificação com *beads* Ni-NTA Agarose, de acordo com instruções do fabricante. Imagem produzida no BioRender.

3.8 Análise da LAAO recombinante por SDS-PAGE e *Western Blot*

Amostras de LAAO recombinante após a purificação foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12 %, para avaliação de seu conteúdo proteico. rLAAO ou rLAAO^{R90A} (1, 2 ou 4 µL) foram utilizadas. Diferentes quantidades de BSA (0,5, 1, 2 ou 4 µg) foram aplicadas no gel para servirem de curva padrão na quantificação das amostras. A corrida foi realizada a 200V, sob condições redutoras, e um padrão de massa molecular (Thermo Scientific™, 26612) foi utilizado. Para

visualização das bandas, o gel foi corado com *Comassie Blue* e escaneado para quantificação relativa do conteúdo proteico, utilizando o *software* ImageJ.

Para confirmar a presença de LAAO nas amostras após purificação, o ensaio de *Western Blot* foi realizado. rLAAO ou rLAAO^{R90A} (0,5, 1 ou 2 µg) foram submetidas ao procedimento descrito acima até a etapa de separação das proteínas no gel. BSA (1 µg) foi utilizado como controle negativo e 1 µg de uma proteína recombinante sabidamente contendo cauda de Histidina (*Leucine zipper transcription factor-like protein 1* - LZTFL1) foi considerada como controle positivo do ensaio. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,45 µm (Immobilon, Merck Millipore) por transferência úmida (Tampão de transferência: 50 mM Tris-HCl, 380 mM glicina e 20 % metanol, pH 8.3), por 1 hora a 100V. *Ponceau* 2 % foi utilizado para confirmar a transferência das proteínas. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1 hora com 5 % de leite desnatado em tampão Tris-salino (TBS) pH 7.5, contendo 0,1 % de Tween 20 (TBS-T). Após esse período, o anticorpo primário anti-6x His *tag* (Abcam, Ab18184) foi adicionado em tampão de bloqueio na proporção de 1:1000 e a membrana foi incubada *overnight* nesta solução. Em seguida, 3 lavagens de 5 minutos com TBS-T foram realizadas e a membrana foi incubada por 1 hora com o anticorpo secundário IRDye® 800CW *Donkey anti-mouse* IgG, diluído em tampão de bloqueio na proporção de 1:15.000. Após outras três lavagens, as bandas reconhecidas pelos anticorpos foram visualizadas no equipamento Li-cor Odyssey FC Imager, de acordo com as instruções do fabricante.

3.9 Ensaio de atividade de L-aminoácido Oxidase

Para acompanhar a produção da LAAO pelas células HEK 293T, a atividade de L-aminoácido oxidase foi avaliada no sobrenadante de células transfectadas com os plasmídeos para expressão de rLAAO ou rLAAO^{R90A}.

O sobrenadante (25 μL) de cada dia de meio coletado foi utilizado para determinação da sua atividade enzimática. Esse sobrenadante foi incubado com 100 mM de tampão Tris-HCl pH 8.5, 5 mM L-Leucina como substrato, peroxidase (5 U/mL) e 2 mM ortofenilenodiamina (OPD) por 1 hora a 37 ºC. H_2SO_4 (50 μL) foi utilizado para parar a reação. A absorbância foi determinada a 492 nm em leitor de microplacas SpectraMax® iD3.

Após a etapa de purificação, a atividade de LAAO foi novamente avaliada utilizando 1, 2, 4 ou 8 μL de cada amostra. O veneno de *B. atrox* (2 μg) foi utilizado como controle positivo dos ensaios. Além disso, para avaliar a estabilidade da proteína ao longo do tempo, o ensaio foi repetido 2 e 5 meses após a etapa de purificação.

3.10 Avaliação dos efeitos celulares causados pela LAAO recombinante

3.10.1 *Ensaios de viabilidade celular*

As células endoteliais (HDMECs) foram cultivadas em microplacas de 96 poços (6,4 x 10^3 células/poço) em meio completo ECG-MV (conforme descrito na seção 3.3). Dois dias após as células atingirem confluência, formando uma monocamada celular, o meio foi substituído por meio ECG-MV contendo 1 % de SFB e a placa foi incubada por 3 horas. Ao término desse período, diferentes concentrações de rLAAO ou rLAAO^{R90A} (0,698 a 2,5 μg/mL) foram diluídas em ECG-MV contendo 1 % de SFB e adicionadas aos poços. Após 24 horas de incubação, Alamar Blue foi adicionado, em

uma concentração final de 10 %, e a placa foi novamente incubada por 3 horas. Após esse período, a fluorescência foi determinada a 560 nm de excitação e 590 nm de emissão utilizando SpectraMax® iD3.

Para avaliação da viabilidade de queratinócitos após tratamento com a LAAO, o ensaio foi realizado conforme descrito na seção 3.5.1. Diferentes concentrações de rLAAO ou rLAAO^{R90A} (0,059 a 7,5 μg/mL) foram adicionadas e o ensaio prosseguiu conforme detalhado anteriormente.

A porcentagem de viabilidade celular foi calculada em relação às células que não receberam tratamento e a EC_{50} da rLAAO foi determinada por meio de uma curva-concentração resposta, utilizando o *software* GraphPad Prism 8.0.

3.10.2 *Avaliação da estrutura celular utilizando marcação por imunofluorescência*

Células endoteliais foram cultivadas em lamínulas de 13 mm de diâmetro dispostas em placas de 24 poços (3,8 x 10^4 células/poço) em meio completo ECG-MV. Dois dias após atingirem a confluência, 2 EC_{50} de rLAAO ou rLAAO^{R90A} foram adicionadas em meio ECG-MV completo por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. Em seguida, as lamínulas foram colocadas em câmara úmida e as células foram fixadas, bloqueadas e permeabilizadas conforme descrito na seção 3.5.2. O anticorpo primário (**Tabela 3**) foi incubado posteriormente por 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagens, os anticorpos secundários ou sondas apropriadas (**Tabela 4**) foram adicionados e incubados por mais 1 hora. Após as lavagens, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro com Mowiol.

Tabela 3: Anticorpos primários utilizados nos ensaios de imunofluorescência com HDMECs.

Anticorpo	Fornecedor	Animal de origem	Diluição
α-catenina (VB1)	Vânia Braga, Imperial College London	Coelho	1:2000
VE-Caderina (CD144)	Invitrogen	Camundongo	1:2000

Tabela 4: Anticorpos secundários e sondas utilizados nos ensaios de imunofluorescência com HDMECs

Conjugado	Fornecedor	Animal de origem	Diluição
Cy™3 AffiniPure - conjugado anti-IgG de coelho	Jackson Immuno Research Laboratories	Burro	1:1000
Alexa Fluor 488 - conjugado anti-IgG de camundongo	Jackson Immuno Research Laboratories	Cabra	1:1000
Phalloidin-Atto-488	Sigma-Aldrich	---	1:2000
DAPI	Sigma-Aldrich	---	1:3000

Para os queratinócitos, a mesma metodologia detalhada na seção 3.5.2 foi realizada. Após atingirem a confluência desejada, as células foram tratadas com 2 EC_{50} de rLAAO ou $rLAAO^{R90A}$ diluídos em meio FAD completo por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. O anticorpo primário descrito na **Tabela 1** e os anticorpos secundários e sondas da **Tabela 2** foram utilizados.

As imagens de ambos os tipos celulares foram adquiridas em microscópio Olympus Provis BX51 (aumento: 60x) acoplado à câmera monocromática SPOT RT usando *software* Andor Solis. As imagens foram processadas utilizando o *software* Image J.

3.11 LC-MS/MS para análise do proteoma de células tratadas com a LAAO recombinante

3.11.1 *Tratamento das células*

HDMECs foram cultivadas em placas de 6 poços (1,9 x 10^5 células/poço) em meio ECG-MV completo. Dois dias após as células atingirem confluência, o meio foi substituído por ECG-MV contendo 1 % de SFB e a placa foi incubada por 3 horas. Ao término desse período, 2 EC_{50} de rLAAO ou $rLAAO^{R90A}$ foram diluídos em ECG-MV contendo 1 % de SFB e adicionados aos poços por 3 horas. As células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1000 RPM por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com PBS para remoção do SFB residual. As células foram novamente centrifugadas e os *pellets* armazenados a -80 ºC até o uso.

Os NHEKs foram cultivados em placas de 6 poços (3 x 10^5 células/poço) juntamente com fibroblastos (4,3 x 10^5 células/poço) por 3 dias. Os fibroblastos foram então removidos dos poços através de lavagens com Versene (PBS contendo 0,54 mM EDTA) e as NHEKs foram novamente incubadas por 3 horas. Após esse período, as células foram tratadas com 2 EC_{50} de rLAAO ou $rLAAO^{R90A}$ por 3 horas. Ao final, os queratinócitos foram tripsinizados e preparados conforme descrito para as células endoteliais.

Os ensaios foram realizados em três replicatas biológicas independentes, em duplicata.

3.11.2 *Preparação das amostras*

Para extração das proteínas celulares, os *pellets* foram ressuspendidos em 2,5 % de SDS em 50 mM de tampão bicarbonato de amônio. As amostras foram então centrifugadas a 14.000 RPM por 5 minutos a 4 ºC e o sobrenadante transferido para um novo tubo. As proteínas foram congeladas a -80 ºC e, em seguida, enviadas para o Sidoli Lab, no Albert Einstein College of Medicine, EUA, onde foram processadas para análises de LC-MS/MS pela Doutora Stephanie Stransky Lauar.

O processamento das amostras e análises foi realizado conforme descrito por Dixon e colaboradores (2021). De forma resumida, as proteínas foram alquiladas com 20 mM de iodoacetamida, digeridas com 1 μg de tripsina, dessalinizadas utilizando resina Oasis HLB C-18 (Waters) e então secas em centrífuga a vácuo.

3.11.3 *LC-MS/MS*

As amostras foram ressuspendidas em 0,1 % TFA e injetadas em um Dionex RSLC Ultimate 300 (Thermo Scientific), acoplado a um Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Scientific). A separação cromatográfica foi realizada em um sistema contendo 2 colunas, consistindo em uma C-18 (300 μm ID, 5 mm comprimento) e uma coluna analítica PicoFrit (75 μm ID, 25 cm comprimento) empacotada com resina de fase reversa Repro-Sil Pur C18-AQ (3 μm). Para análise do proteoma, os peptídeos foram separados utilizando um gradiente de 60 minutos de 4-30 % de tampão B (tampão A: 0,1 % de ácido fórmico; tampão B: 80 % de acetonitrila + 0,1 % de ácido fórmico) a um fluxo de 300 nl/min. O espectrômetro de massa foi configurado para aquisição dos espectros no modo *data-dependent acquisition* (DDA).

3.11.4 *Análise dos dados*

Os dados brutos foram analisados no *software* Proteome Discoverer (v2.4, Thermo Scientific), utilizando a ferramenta de pesquisa SEQUEST e o banco de

dados de proteínas humanas do SwissProt. Acetilação N-terminal foi incluída como modificação variável e carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa. Tripsina foi especificada como enzima de digestão, com até 2 clivagens incorretas permitidas. A tolerância de massa foi de 10 ppm para os íons precursores e 0.2 Da para os íons produzidos. A porcentagem de taxa de proteínas e peptídeos incorretos foi configurada para 1 %.

Após a busca, os dados foram processados da seguinte forma: os valores foram transformados para log2 (*fold-change*), normalizados pelo valor médio de cada amostra e os valores faltantes foram inseridos utilizando uma distribuição normal de 2 desvios padrão abaixo da média. As análises estatísticas foram realizadas utilizando T-test (valor $p < 0.05$). A lista das proteínas identificadas foi organizada de forma ascendente de acordo com seu *score* (*fold-change* x valor p). Essa lista foi utilizada para busca na plataforma GOrilla (http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il), a qual realiza análises de enriquecimento para identificação de possíveis vias do metabolismo que estejam relacionadas às proteínas mais reguladas.

O fluxo de trabalho utilizado nessa etapa do estudo está esquematizado na **Figura 9**.

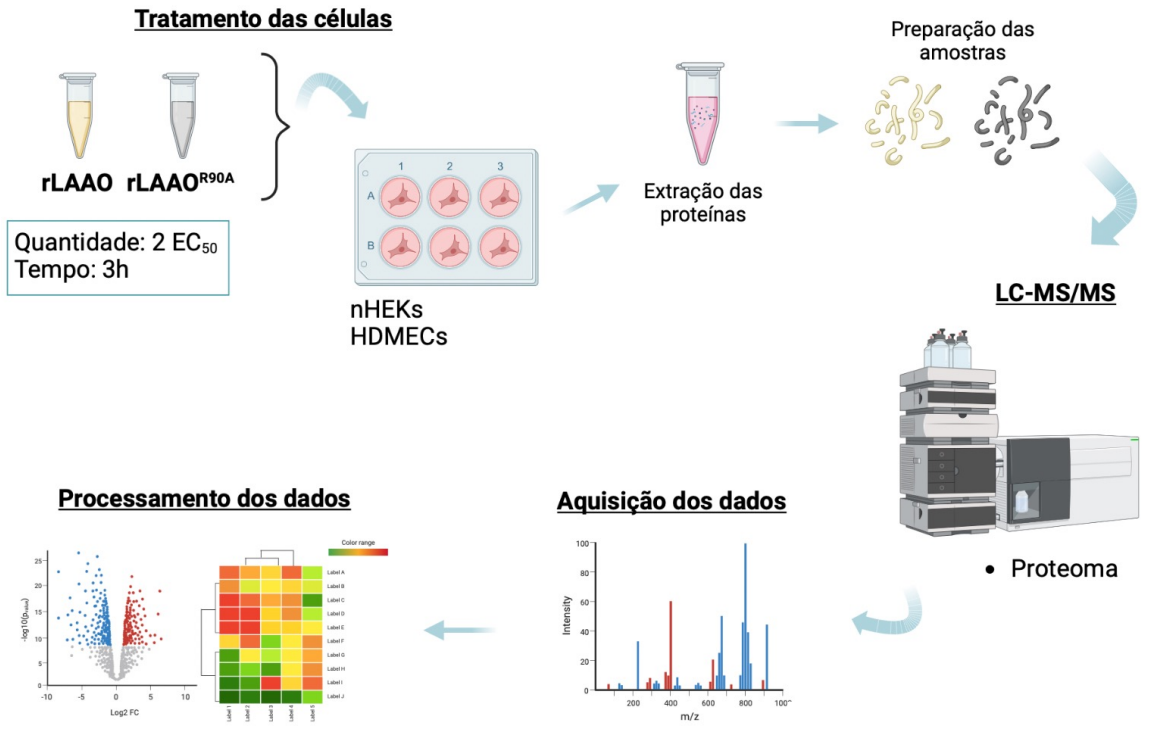


Figura 9: Esquema do fluxo de trabalho para análise do proteoma de células endoteliais e queratinócitos. HDMECs ou NHEKs foram tratados com 2 EC_{50} de rLAAO ou $rLAAO^{R90A}$ por 3 horas. As proteínas foram extraídas das células e as amostras preparadas para análises por LC-MS/MS, utilizando uma abordagem do tipo *untargeted*. Os dados foram coletados, normalizados e analisados estatisticamente por T-test (valor p < 0.05) ou na plataforma GOrilla, para análises de enriquecimento. Imagem preparada no BioRender.

3.12 UPLC-MS/MS para análise de aminas biogênicas em células tratadas com a LAAO recombinante

O perfil metabólico de aminas biogênicas em células tratadas com LAAO recombinante foi avaliado por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, acoplada a Espectrometria de Massa (UPLC-MS/MS), utilizando uma abordagem do tipo *targeted*. A **Tabela 5** lista os possíveis aminoácidos e outros compostos contendo aminas biogênicas que podem ser identificados pela técnica realizada.

Tabela 5: Lista dos aminoácidos e outros compostos com aminas biogênicas que podem ser identificados pelo UPLC-MS/MS realizado.

Lista de possíveis moléculas identificadas por UPLC-MS/MS		
Aminoácidos	**Outros compostos**	
Glicina	Hidroxiprolina	Metilamina
Alanina	Carnosina	O-fosfoetanolamina
Leucina	Cistina	Ácido aminoadípico
Isoleucina	Etanolamina	Galactosamina
Valina	Ácido β-amino isobutírico	Cistationina
Prolina	Citrulina	Metilhistidina
Fenilalanina	Homoserina	Beta-alanina
Serina	Hidroxilisina	Glutationa
Treonina	Ornitina	Ácido oftálmico
Cisteína	Ácido α-amino butírico	Putrescina
Tirosina	Fosfoserina	Anserina
Asparagina	Sarcosina	Ácido hidroxiquinurênico
Glutamina	Taurina	Ácido aminohipúrico
Ácido aspártico	Ácido γ-aminobutírico	
Ácido glutâmico	Triptamina	
Arginina	Alantoína	
Lisina	LNMMA	
Histidina	Octopamina	
Triptofano	Tiramina	
Metionina	Glicilglicina	

3.12.1 *Tratamento das células*

HDMECs foram cultivadas em placas de 6 poços (1,9 x 10^5 células/poço) em meio ECG-MV completo. Dois dias após as células atingirem confluência, o meio foi substituído por ECG-MV contendo 1 % de SFB e a placa foi incubada por 3 horas. Ao término desse período, 2 EC_{50} de rLAAO ou $rLAAO^{R90A}$ foram diluídos em ECG-MV contendo 1 % de SFB e adicionados aos poços por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. Após os tratamentos, o sobrenadante celular foi coletado e o lisado das células foi obtido adicionando-se 1 mL de metanol nos poços. Dessa forma, dois grupos foram utilizados para as análises: amostras de sobrenadante celular e amostras de células, as quais foram armazenadas a -20 ºC até o uso.

NHEKs foram cultivados em placas de 6 poços (8 x 10^4 células/poço) juntamente com fibroblastos (1,8 x 10^5 células/poço) em meio FAD completo e

incubados até atingirem aproximadamente 60-80 % de confluência. Em seguida, o meio foi substituído por DMEM sem vermelho de fenol, contendo 1 % de SFB e 2 mM L-Glutamina. Após 3 horas, as células foram tratadas com 2 EC_{50} de rLAAO ou $rLAAO^{R90A}$ por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. O sobrenadante foi coletado e o lisado celular obtido conforme descrito para as células endoteliais.

Os ensaios foram realizados em três replicatas biológicas independentes, em triplicata.

3.12.2 *UPLC-MS/MS para análise de aminoácidos e aminas biogênicas*

Antes da realização das análises, as amostras foram preparadas para derivatização utilizando o reagente 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AccQTag Ultra, Waters), segundo protocolo do fabricante.

As condições configuradas para as análises de UPLC-MS/MS foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Gray e colaboradores (2017b). Resumidamente, o método foi realizado utilizando o sistema Acquity UPLC (Waters), acoplado com espectrômetro de massa do tipo quadrupolo Xevo TQ-S (Waters). A detecção em MS/MS foi realizada utilizando ionização por *eletrospray* (ESI) em modo positivo, com monitoramento de reações múltiplas (MRM) para a quantificação de cada composto. A separação cromatográfica foi realizada utilizando cromatografia de fase reversa em coluna HSS T3 2.1 x 150 mm, 1.8 μm (Waters). Ácido fórmico 0,1 % em água (A) e ácido fórmico 0,1 % em acetonitrila (B) foram utilizados como fase móvel. A eluição em gradiente linear foi realizada a 0.6 mL/min, iniciando a 4 % de reagente B por 0,5 minutos, antes de aumentar para 10 % por 2 minutos, 20 % por 2,5 min e, finalmente, aumentar para 95 % por 1 minuto, antes de retornar a 4 % de reagente B (1,3 min) para reequilíbrio. Antes do início das análises, injeções apenas

de metanol em água (branco) foram realizadas, para garantir a estabilidade e limpeza do sistema, seguido de um teste de "adequação do sistema", com a injeção de um controle de qualidade (QC), composto por um *pool* de todas as amostras utilizadas. Para as análises, as amostras foram injetadas de forma randômica, a fim de evitar qualquer viés que possa ser introduzido no equipamento. Cada amostra foi injetada três vezes.

3.12.3 *Análise dos dados*

Para os aminoácidos, os valores de concentração (em μmol/mL) foram obtidos de cálculos realizados pelo *software* MassLynx (Waters), o qual se baseia em uma curva padrão que contêm quantidades conhecidas de cada aminoácido. Para os outros compostos que não possuem essa curva, os valores da área de cada pico foram utilizados para a quantificação relativa desses metabólitos.

A injeção das amostras de forma randômica no equipamento faz com que a separação dos grupos na etapa de análise seja mais complicada. Sendo assim, um código no *software* R, denominado MassSpec Helper, foi gentilmente criado pelo cientista computacional Moacir Braga. Essa ferramenta organiza os dados brutos em uma planilha de Excel, agrupando cada um dos componentes identificados por grupo e tempo de tratamento. Após essa ordenação, a porcentagem de cada metabólito foi calculada em relação ao controle das células não-tratadas (considerado como 100 %). Em seguida, os grupos foram comparados por one-way ANOVA (valor $p < 0,05$) para identificação dos compostos significativamente regulados. Além disso, as porcentagens relativas dos metabólitos encontrados foram analisadas no *software* MetaboAnalist 5.0 (https://www.metaboanalyst.ca), utilizando a ferramenta de *Enrichment analysis*, a fim de identificar possíveis vias do metabolismo que supostamente possam ser afetadas pela LAAO. A busca foi integrada ao banco de

dados SMPDB (*The Small Molecule Pathway Database*), uma vez que possui o maior número de conjuntos metabólicos relacionados a vias de seres humanos. *Heatmaps* também foram criados nessa plataforma, para visualização das principais diferenças nas concentrações relativas dos compostos encontrados.

3.13 UPLC-MS para análise do lipidoma de células tratadas com a LAAO recombinante

Para análise do conjunto de lipídeos celulares, as mesmas amostras do ensaio de aminas biogênicas foram utilizadas e, portanto, o tratamento das células foi realizado conforme descrito na seção 3.12. Porém, no UPLC-MS realizado aqui, a abordagem foi do tipo *untargeted*. As análises de espectrometria para as células endoteliais ainda não foram realizadas. Dessa forma, apenas os ensaios em queratinócitos serão apresentados.

3.13.1 *UPLC-MS para análise do lipidoma de queratinócitos*

As amostras do lisado das células (em metanol) tratadas com rLAAO ou rLAAO^{R90A} foram injetadas no UPLC Acquity (Waters) equipado com uma coluna CSH C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 μm – Waters) para cromatografia de fase reversa. A fase móvel A consistiu em acetonitrila:água (60:40) com 10 mM de formato de amônio e 0,1 % de ácido fórmico, enquanto a fase móvel B foi composta de isopropanol:acetonitrila (90:10) com 10 mM de formato de amônio e 0,1 % de ácido fórmico. O fluxo foi de 400 μL/mL com um tempo de gradiente de 20 minutos. UPLC foi acoplado com Synapt G2-S QToF MS (Waters) e configurado para análises nos dois modos de ESI (positivo e negativo). Porém, no presente estudo, apenas as análises para o modo negativo serão apresentadas. Amostras de branco (metanol em água) e de QC também foram injetadas para garantir a estabilidade, limpeza e

funcionamento do equipamento. As amostras do lisado celular foram injetadas de forma randômica.

3.13.2 *Análise dos dados*

Os dados brutos foram obtidos através do *software* MassLynx v4.1 (Waters) e convertidos para o formato mzXML, no modo centroide, utilizando o programa ProteoWizard. Em seguida, os arquivos foram inseridos no *software* online XCMS (https://xcmsonline.scripps.edu), no qual a seleção dos picos, alinhamento dos cromatogramas e correção dos tempos de retenção foram realizados. Essas etapas resultaram em uma planilha contendo a relação m/z, o tempo de retenção e a intensidade de cada um dos *features* identificados nas amostras (*Feature* = sinal encontrado no espectrômetro de massa com valor específico de m/z e tempo de retenção).

As análises estatísticas foram realizadas no *software* MetaboAnalyst 5.0, no qual os valores das tabelas foram normalizados pela soma (*row-wise*), transformados em log e *auto-scaling* (*column-wise*) foi realizado. Análise de Componente Principal (PCA) foi feita para visualizar o agrupamento das amostras. T-test (valor $p < 0,05$) foi realizado e *Fold-change* calculado para avaliar *features* significativamente regulados após tratamento das células com LAAO.

A identidade putativa dos principais *features* foi determinada utilizando a plataforma LIPID MAPS (https://lipidmaps.org), na qual é realizada a busca das moléculas, baseada em suas massas moleculares (em Da), previamente medidas por UPLC-MS. Para o modo de ionização negativo, apenas adutos M-H foram selecionados, com a tolerância de variação da massa molecular de $\pm$ 0,05 Da. Os lipídeos identificados foram agrupados de acordo com sua classificação bioquímica,

a fim de entender melhor quais categorias de lipídeos são mais afetadas pelo tratamento com a LAAO.

A **Figura 10** resume o fluxo de trabalho utilizado nas seções 3.13 e 3.14.

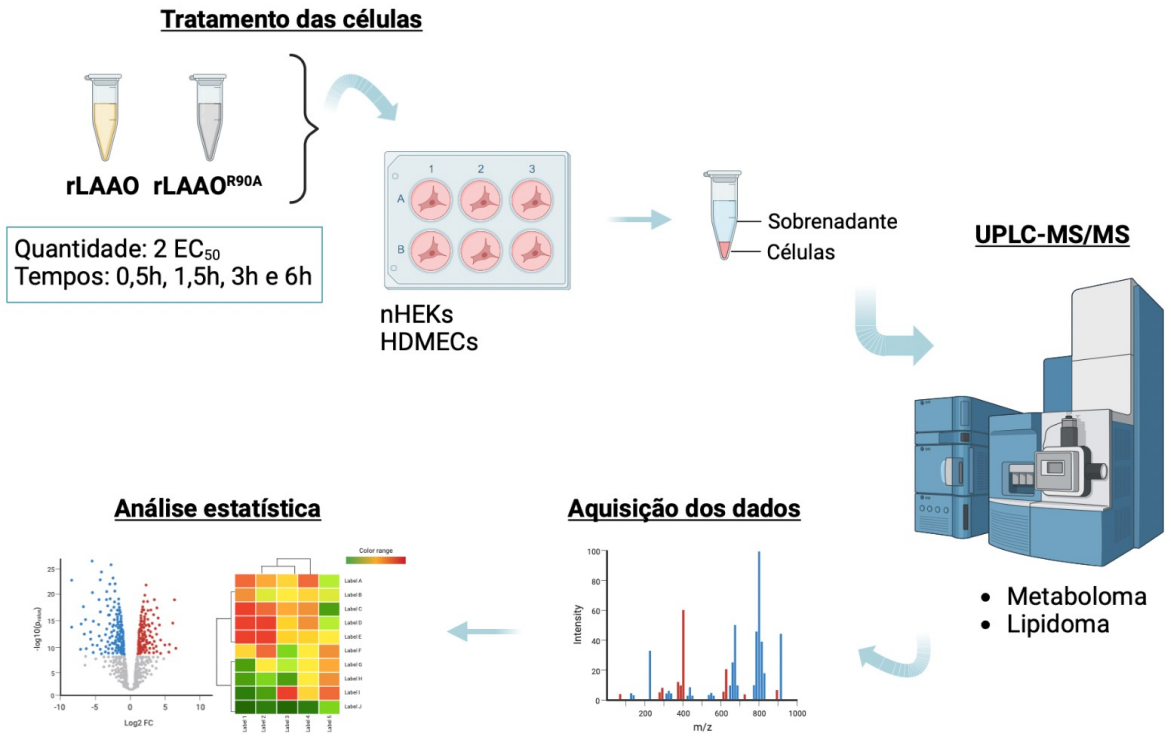


Figura 10: Esquema do fluxo de trabalho para análise de aminas biogênicas e do lipidoma em células endoteliais e queratinócitos. HDMECs ou NHEKs foram tratados com 2 EC_{50} de rLAAO ou $rLAAO^{R90A}$ por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. O sobrenadante foi coletado e o lisado celular obtido após adição de metanol aos poços. Para as aminas biogênicas, as amostras foram derivatizadas utilizando o reagente AccQTag Ultra (Waters) e submetidas a análises por UPLC-MS/MS, utilizando uma abordagem do tipo *targeted*. Para o lipidoma, o lisado celular em metanol foi submetido às análises e a abordagem foi do tipo *untargeted*. Os dados foram coletados, normalizados e analisados estatisticamente por one-way ANOVA (valor $p < 0,05$) na plataforma MetaboAnalyst 5.0. Imagem preparada no BioRender.

Resultados

4. RESULTADOS

Visto que a citotoxicidade dos venenos botrópicos pode ser um importante parâmetro no estudo dos efeitos do envenenamento, a ação do veneno e de toxinas em células humanas é um dos principais focos desse estudo. Primeiramente, foram identificados os principais componentes do veneno de *B. atrox* que estão envolvidos na citotoxicidade. Uma vez que a L-aminoácido oxidase é uma das principais toxinas que participam desse processo, essa proteína foi produzida em sua forma recombinante e os efeitos celulares desencadeados por ela foram investigados. Em seguida, a fim de compreender como o metabolismo das células é afetado na presença da LAAO, o proteoma, os aminoácidos e aminas biogênicas e o lipidoma de células humanas tratadas foram analisados.

4.1 Identificação dos componentes citotóxicos do veneno de *B. atrox*

Além de entender como o veneno e suas toxinas agem nas células durante o envenenamento, também é importante identificar quais componentes são responsáveis pelos principais efeitos tóxicos, o que pode auxiliar futuramente no desenvolvimento de abordagens terapêuticas que visem bloquear essas moléculas. Diante disso, o presente trabalho teve como um dos objetivos identificar potenciais toxinas envolvidas na citotoxicidade causada pelo veneno, utilizando duas abordagens: 1) fracionamento do veneno para identificar os subgrupos de proteínas citotóxicas e 2) espectrometria de massa para determinar a identidade dessas toxinas.

Primeiramente, foi avaliado se o veneno de *B. atrox* reduz a viabilidade de queratinócitos, principal tipo celular afetado durante o envenenamento local. O ensaio

foi realizado em microplaca de 96 poços, utilizando o reagente Alamar Blue®. O veneno reduziu a viabilidade das células de forma concentração-dependente, a partir de 2,5 µg/mL. Essa citotoxicidade foi ainda mais acentuada em concentrações maiores que 5 µg/mL. A concentração efetiva capaz de reduzir em 50 % a viabilidade celular (EC_{50}) foi definida como 3,61 µg/mL (**Figura 11A**).

Além disso, foi avaliado se a morfologia dos queratinócitos também é afetada após tratamento com o veneno. As células foram marcadas por imunofluorescência para análise de moléculas de F-actina e E-caderina, proteínas importantes na adesão e estabilidade celular. Os NHEKs foram tratados por 0,5, 1,5, 3 ou 6 h com o veneno de *B. atrox*, e células não-tratadas (tempo 0 h), foram consideradas como controle negativo. O veneno causou o aparecimento de espaços nas junções celulares (setas vermelhas) onde a E-caderina está localizada, e reduziu a concentração dessa proteína nas células, uma vez que sua intensidade diminuiu ao longo do tempo (seta verde). Além disso, os filamentos de actina parecem estar mais difusos no citoplasma (setas brancas), o que não é observado nas células não-tratadas (**Figura 11B**).

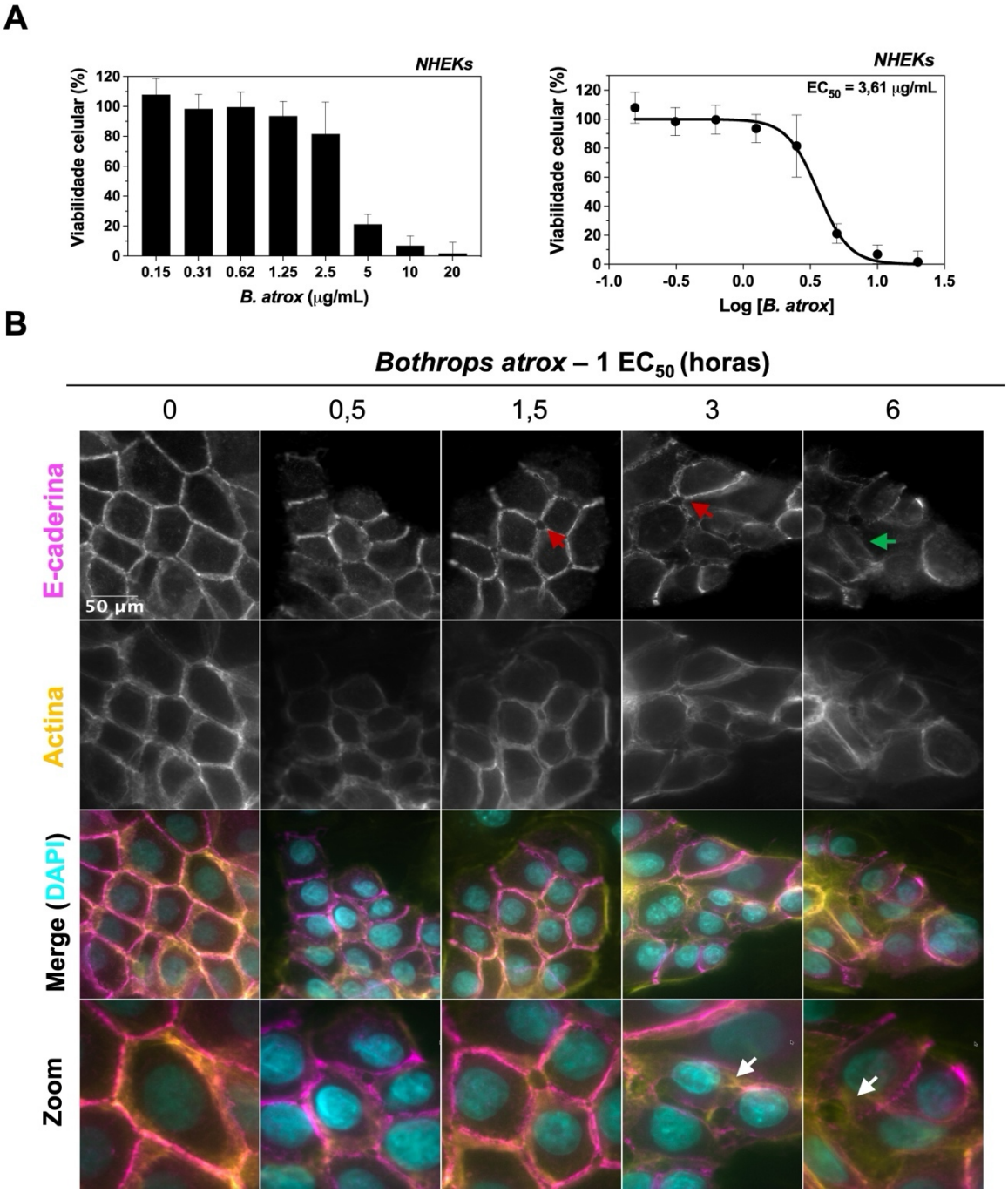


Figura 11: Avaliação da citotoxicidade causada pelo veneno de *B. atrox*. A) Ensaio de viabilidade celular. NHEKs foram incubados com diferentes concentrações de veneno (0,156 a 20 µg/mL) e o reagente Alamar Blue® foi adicionado após 24 horas de tratamento. A fluorescência foi determinada a 560 nm de excitação e 590 nm de emissão. Os valores representam a média de três ensaios independentes e as barras de erro indicam o desvio padrão. A concentração efetiva de veneno capaz de reduzir 50 % da viabilidade celular (EC_{50}) foi calculada utilizando uma curva concentração-resposta no *software* GraphPad Prism 8.0. **B) Ensaio de imunofluorescência.** NHEKs foram incubados com 1 EC_{50} do veneno por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. Células não-tratadas (tempo 0 h) foram consideradas como controle negativo. Após incubação, as células foram fixadas e marcadas para F-actina (em amarelo), E-caderina (em magenta) e núcleo (DAPI, em azul) por imunofluorescência. Imagens representativas (n=2) adquiridas em microscópio de campo aberto, com objetiva de 60x. **Setas vermelhas:** espaços formados nas junções célula-célula. **Seta verde:** diminuição da intensidade de E-caderina. **Setas brancas:** actina difusa no citoplasma das células. Escala = 50 µm.

O veneno de *B. atrox* foi então fracionado por Costal-Oliveira (2019) por cromatografia de exclusão molecular, em coluna Sephacryl S-200. Cinco frações foram obtidas (**Figura 12A**) e seu conteúdo proteico foi avaliado por SDS-PAGE sob condições redutoras. Como esperado para esse tipo de cromatografia, as primeiras frações eluídas apresentaram proteínas de maior massa molecular, enquanto componentes menores foram observados nas últimas frações coletadas. Todas as frações apresentaram conteúdo heterogêneo, com a presença de diferentes bandas na mesma fração. Entretanto, a Fração 5 foi a mais homogênea dentre elas, sendo composta, principalmente, por proteínas de cerca de 26 kDa (**Figura 12B**).

A citotoxicidade de cada fração foi testada em queratinócitos, utilizando o veneno de *B. atrox* como controle. A Fração-1, Fração-2 e Fração-5 foram capazes de reduzir a viabilidade das células de forma significativa, enquanto a Fração-3 e Fração-4 não foram citotóxicas nas condições testadas (**Figura 12C**). Em seguida, a estrutura das moléculas de E-caderina e F-actina foi avaliada por microscopia de fluorescência após tratamento dos queratinócitos com as frações. As células do controle (não-tratadas) apresentaram morfologia normal e E-caderina concentrada nas junções célula-célula. Por outro lado, nos NHEKs tratados, essa proteína está mais difusa, uma vez que as bordas das células aparentam se sobrepor (setas verdes). Além disso, as células tratadas com as frações citotóxicas (Frações 1, 2 e 5) apresentaram retração da colônia e células alongadas (setas vermelhas) (**Figura 12D**).

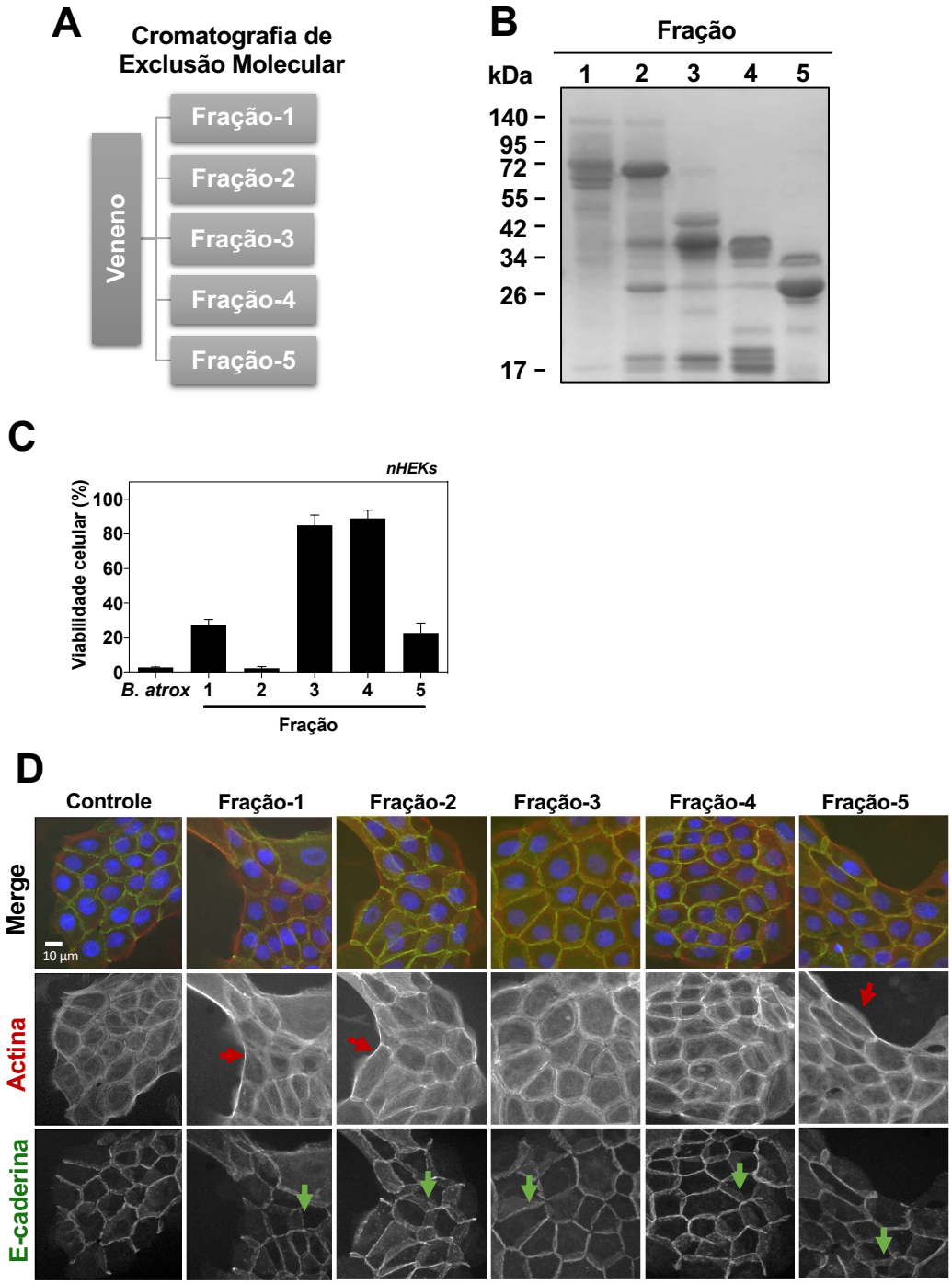


Figura 12: Perfil eletroforético e citotoxicidade das frações da S-200 do veneno de *B. atrox*. A) Esquema da cromatografia de exclusão molecular. Realizado previamente por Costal-Oliveira (2019). **B) Conteúdo proteico das Frações-1 a -5.** SDS-PAGE (12 %) foi realizado com cada uma das frações (15 µg) sob condições redutoras e o gel foi corado com *Comassie Blue*. **C) Ensaio de viabilidade em queratinócitos.** As células foram incubadas com 40 µg/mL de cada uma das frações (1 a 5) e o reagente Alamar Blue® foi adicionado após 24 horas de tratamento. Os valores representam a média de três ensaios independentes e as barras de erro indicam o desvio padrão. **D) Ensaio de imunofluorescência.** NHEKs foram incubados com 10 µg/mL das frações por 1,5, 3 ou 6 horas. As células não tratadas (tempo 0 h) foram consideradas como controle negativo. Após incubação, as células foram fixadas e marcadas para F-actina (em vermelho), E-caderina (em verde) e núcleo (DAPI, em azul) por imunofluorescência. Imagens representativas (n=3) adquiridas em microscópio de campo aberto, com objetiva de 40x. **Setas verdes:** E-caderina nas junções celulares. **Setas vermelhas:** retração das células. Escala = 10 µm.

Após a avaliação dos efeitos citotóxicos causados pelas frações, as atividades enzimáticas presentes nessas amostras foram avaliadas, considerando as principais classes de toxinas dos venenos botrópicos: LAAO (**Figura 13A**), Hial (**Figura 13B**), SVSP (**Figura 13C**), SVMP (**Figura 13D**) e PLA_2 (**Figura 13E**). A atividade de LAAO foi encontrada exclusivamente na Fração-2, enquanto a atividade hialuronidásica foi detectada apenas na Fração-1. Já outras atividades enzimáticas foram observadas em diferentes frações, como por exemplo de Serinoproteases (na Fração-3 e -4) e de Fosfolipase A_2 (Fração-4 e -5). A atividade de Metaloproteases, por sua vez, foi mais elevada na Fração-5, porém níveis consideráveis também foram detectados nas frações 1 e 2 (**Figura 13**). Esses resultados refletem a variedade de diferentes proteases que são geralmente encontradas nos venenos botrópicos (AMAZONAS et al., 2019; HATAKEYAMA et al., 2020).

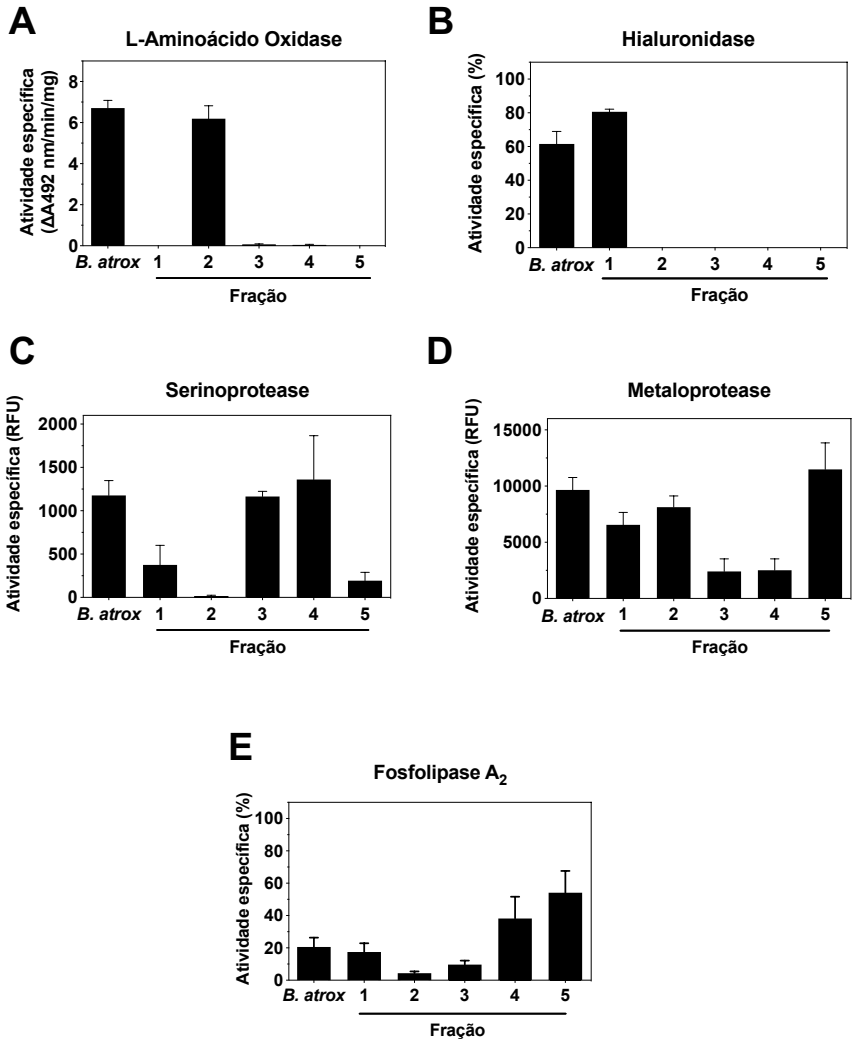


Figura 13: Atividades enzimáticas do veneno e das frações de *B. atrox*. A) Atividade de L-aminoácido oxidase: O veneno ou cada fração (2 μg) foram incubados por 1 hora na presença de L-Leucina, peroxidase e OPD. A absorbância resultante foi determinada a 490 nm. **B) Atividade hialuronidásica:** O veneno ou as frações (50 μg) foram avaliados através de um ensaio turbidimétrico utilizando ácido hialurônico (AH) como substrato. Uma curva padrão com diferentes concentrações de AH foi utilizada para estimar a atividade das amostras. A turbidez resultante foi medida a 405 nm. **C) Atividade de serinoprotease** e **D) Atividade de metaloprotease:** a atividade proteolítica do veneno ou das frações (1 μg) foi analisada pela hidrólise de substratos FRET contendo sítios de clivagem específicos para ambas as enzimas. As amostras foram pré-incubadas ou não com EDTA (0,2 μM) e a fluorescência medida a 340 nm de excitação e 440 nm de emissão. RFU: Unidade Relativa de Fluorescência. **E) Atividade de Fosfolipase A_2:** O veneno ou as frações (2 μg) foram avaliados utilizando o kit EnzChek® Phospholipase A_2 Assay, de acordo com as instruções do fabricante. A fluorescência foi determinada a 490 nm de excitação e 570 nm de emissão. Os resultados representam a média de três replicatas independentes, testadas em duplicata. As barras de erro indicam o desvio padrão.

Em seguida, para determinar a identidade dos subgrupos de toxinas que compõem as frações citotóxicas, análises por espectrometria de massa foram realizadas utilizando a Fração-1, Fração-2 e Fração-5, que apresentaram efeitos

tóxicos em queratinócitos. Os dados corroboraram o perfil enzimático demonstrado na **Figura 13**: distribuição de proteases em diferentes frações e maior heterogeneidade de classes de toxinas na Fração-1. A composição de cada fração está detalhada na **Tabela 6** (Fração-1), **Tabela 7** (Fração-2) e **Tabela 8** (Fração-5), as quais contêm também o nome da família da toxina, o número de acesso do SwissProt, massa molecular, ponto isoelétrico, número de peptídeos e *score* de cada componente encontrado.

Tabela 6: Espectrometria de massa da Fração-1 realizada comercialmente. Os resultados foram analisados pelo MASCOT integrado ao banco de dados SwissProt. A abundância peptídica foi estimada por *Exponential Modified Protein Abundance Index* (emPai). **SVMP**: Metaloprotease de Veneno de Serpente; **PLB**: Fosfolipase B; **PDE:** Fosfodiesterase; **5'NT**: 5' Nucleotidase; **VF**: Fator de Veneno; **Snaclec**: Lectina do tipo-C de Serpente; **PLA_2**: Fosfolipase A_2; **SVSP**: Serinoprotease de Veneno de Serpente.

Identificação das proteínas da Fração-1 por LC-MS/MS				
Família da Toxina/Código de acesso	**Massa Molecular**	**pI Calc.**	**Número de peptídeos**	**Score**
SVMP/ C5H5D2	46.3	5.68	16	2943.12
SVMP/ C5H5D4	46.4	6.60	12	2645.64
PLB/ F8S101	64.0	8.51	22	2331.33
SVMP/ C5H5D3	46.3	7.44	4	2165.31
PDE/ J3SBP3	91.7	8.07	15	1806.52
SVMP/ Q8AWI5	67.6	6.07	5	1430.43
SVMP/ P30431	63.9	5.39	13	1321.80
SVMP/ Q0NZX9	24.3	5.62	6	1029.98
SVMP/ Q8UVG0	68.5	5.73	10	947.41
SVMP/ P86092	36.2	5.74	4	699.22
5'NT/ B6EWW8	64.4	8.38	18	638.80
5'NT/ F8S0Z7	64.6	8.34	13	613.97
SVMP/ Q0NZX7	10.5	5.44	6	553.74
SVMP/ Q0NZX8	21.5	4.70	2	437.29
SVMP/ P83912	54.6	5.48	3	364.86
SVMP/ O42138	69.5	6.57	4	362.38
VF/ J3S836	184.8	6.23	6	221.61
Snaclec/ P22029	15.2	6.96	2	156.08
SVMP/ C9E1R9	53.8	5.31	3	154.75
SVMP/ P85420	22.9	6.33	9	150.70
SVMP/ Q92043	46.8	6.39	3	143.83
PLA_2/ Q92043	15.5	8.81	3	129.09
PLA_2/ P60592	22.2	6.39	2	126.19
SVSP/ Q6IWF1	25.6	7.77	2	116.75
SVMP/ P0DL29	22.5	6.89	3	95.55
SVSP/ Q8QG86	28.3	8.46	2	78.21
SVSP/ P81661	25.6	6.93	3	69.50
SVSP/ Q5W958	27.8	8.35	2	65.08
SVSP/ Q5W959	27.8	5.57	2	39.05
SVSP/ Q072L6	28.0	5.58	2	36.61
SVSP/ Q7T229	28.6	8.46	2	31.74

Tabela 7: Espectrometria de massa da Fração-2 realizada comercialmente. Os resultados foram analisados pelo MASCOT integrado ao banco de dados SwissProt. A abundância peptídica foi estimada por *Exponential Modified Protein Abundance Index* (emPai). **SVSP**: Serinoprotease de Veneno de Serpente; **PLB**: Fosfolipase B; **SVMP**: Metaloprotease de Veneno de Serpente; **PLA_2**: Fosfolipase A_2; **PDE:** Fosfodiesterase; **5'NT**: 5' Nucleotidase; **VNGF**: Fator de crescimento de veneno; **QPCT:** Glutaminil-peptídeo Ciclotransferase; **LAAO:** L-aminoácido oxidase.

Identificação das proteínas da Fração-2 por LC-MS/MS				
Família da Toxina/Código de acesso	**Massa Molecular**	**pI Calc.**	**Número de peptídeos**	**Score**
SVSP/ P82981	25.4	5.12	2	302.70
PLB/ F8S101	64.0	8.51	11	777.56
SVMP/ O42138	69.5	6.57	3	370.64
SVMP/ Q8UVG0	68.5	5.73	4	678.32
PLA_2/ Q9PVE3	15.5	8.81	2	151.49
PLA_2/ P0C616	15.7	8.34	2	102.49
SVMP/ O93523	68.2	5.31	26	10647.01
SVMP/ Q8AWI5	67.6	6.07	3	315.13
SVMP/ Q90Y44	23.1	4.81	8	1324.70
PDE/ J3SBP3	91.7	8.07	13	1250.29
5'NT/ F8S0Z7	64.6	8.34	8	345.52
5'NT/ B6EWW8	64.4	8.38	10	424.35
SVSP/ Q5W960	28.0	8.09	5	344.65
SVSP/ P81661	25.6	6.93	7	361.81
SVSP/ P0DJ86	25.4	6.93	7	494.83
SVSP/ Q6IWF1	25.6	7.77	4	442.53
Snaclec/ P0C929	15.2	5.53	4	624.55
Snaclec/ P22029	15.2	6.96	7	1616.01
Snaclec/ P22030	15.0	4.55	2	186.20
Snaclec/ Q7LZI6	4.9	5.66	2	80.15
SVMP/ P85420	22.9	6.33	14	3279.88
SVMP/ Q92032	46.1	5.33	2	446.14
SVMP/ C5H5D2	46.3	5.68	3	120.08
SVMP/ C5H5D4	46.3	6.60	6	453.12
CRISP/ Q7ZT99	26.6	8.06	3	54.11
CRISP/ Q8JI40	26.9	5.96	2	96.28
VNGF/Q90W38	27.1	8.29	3	257.33
SVMP/ P83912	54.6	5.48	2	109.16
QPCT/ A7ISW1	42.0	7.91	4	125.72
LAAO/Q6TGQ8	54,4	6.37	31	8132.0
LAAO/ X2JCV5	58.5	6.43	8	3025.68
LAAO/ P0DI84	54.7	7.75	8	657.30

Tabela 8: Espectrometria de massa da Fração-5 realizada comercialmente. Os resultados foram analisados pelo MASCOT integrado ao banco de dados SwissProt. A abundância peptídica foi estimada por *Exponential Modified Protein Abundance Index* (emPai). **SVMP**: Metaloprotease de Veneno de Serpente; **PLA_2**: Fosfolipase A_2; **CRISP:** Proteína de Veneno Rica em Cisteína; **QPCT:** Glutaminil-peptídeo Ciclotransferase; **SVSP**: Serinoprotease de Veneno de Serpente; **Snaclec**: Lectina do tipo-C de Serpente; **VNGF**: Fator de crescimento de veneno; **5'NT**: 5' Nucleotidase.

Identificação das proteínas da Fração-5 por LC-MS/MS				
Família da Toxina/Código de acesso	**Massa Molecular**	**pI Calc.**	**Número de peptídeos**	**Score**
SVMP/ P85420	22.9	6.33	19	10574.45
SVMP/ Q92032	46.1	5.33	3	5073.67
SVMP/ Q98SP2	53.4	5.78	8	4697.13
SVMP/ P85314	23.3	6.79	8	2334.93
SVMP/ P84907	23.0	7.25	10	1694.73
PLA_2/ P86389	14.2	5.29	9	1661.01
CRISP/ Q7ZTA0	26.7	7.64	4	1306.32
CRISP/ Q7ZT99	26.6	8.06	4	1024.69
CRISP/ P0DMT4	24.7	7.46	3	704.49
SVMP/ P30431	63.9	5.39	6	601.40
QPCT/ Q90YA8	42.2	8.10	10	455.43
SVSP/ Q9PT51	25.7	5.81	2	340.58
SVMP/ Q8AWI5	67.6	6.07	2	337.52
PLA_2/ P20474	15.7	8.35	3	282.62
SVSP/ P81661	25.6	6.93	7	261.41
Snaclec/ P22029	15.2	6.96	3	182.17
SVSP/ Q5W959	27.8	5.57	3	181.68
SVSP/ Q072L6	28.0	5.58	3	165.56
SVMP/ Q0NZY0	17.9	6.43	2	161.42
VNGF/ Q90W38	27.1	8.29	2	90.17
Snaclec/ P0C929	15.2	5.53	3	90.05
PLA_2/ P0C616	15.7	8.34	2	76.33
SVMP/ Q8UVG0	68.5	5.73	2	60.89
5'NT/ B6EWW8	64.4	8.38	2	48.34

A abundância relativa das proteínas encontradas foi calculada, e as análises semiquantitativas mostram que a Fração-1 é composta principalmente por Metaloproteases (60,14 %, SVMP da classe P-III), seguida por Serinoproteases (SVSP - 12,59 %) e uma menor proporção relativa de 2,29 % e 1,36 % de Metaloproteases das classes P-II e P-I, respectivamente. Fosfolipase B também foi encontrada nessa fração (PLB - 7,07 %), assim como Lectinas do tipo-C (Snaclec – 4,45 %), 5'nucleotidase (5'NT – 3,38 %), Fosfodiesterase (PDE – 2,38 %), Fosfolipase A_2 (PLA_2 – 2,35 %) e outras (**Figura 14A**). Já na Fração-2, Metaloprotease da classe P-I foi o componente mais abundante (92,44 %), seguido por L-aminoácido oxidase (LAAO – 3,43 %) e SVMP da classe P-III (2,59 %). SVMP da classe P-II também foi encontrado (0,44 %), entre outros componentes (**Figura 14B**). A Fração-5 é

basicamente composta por SVMP da classe P-I (99,97 %) e PLA_2 (0,02 %) (**Figura 14C**).

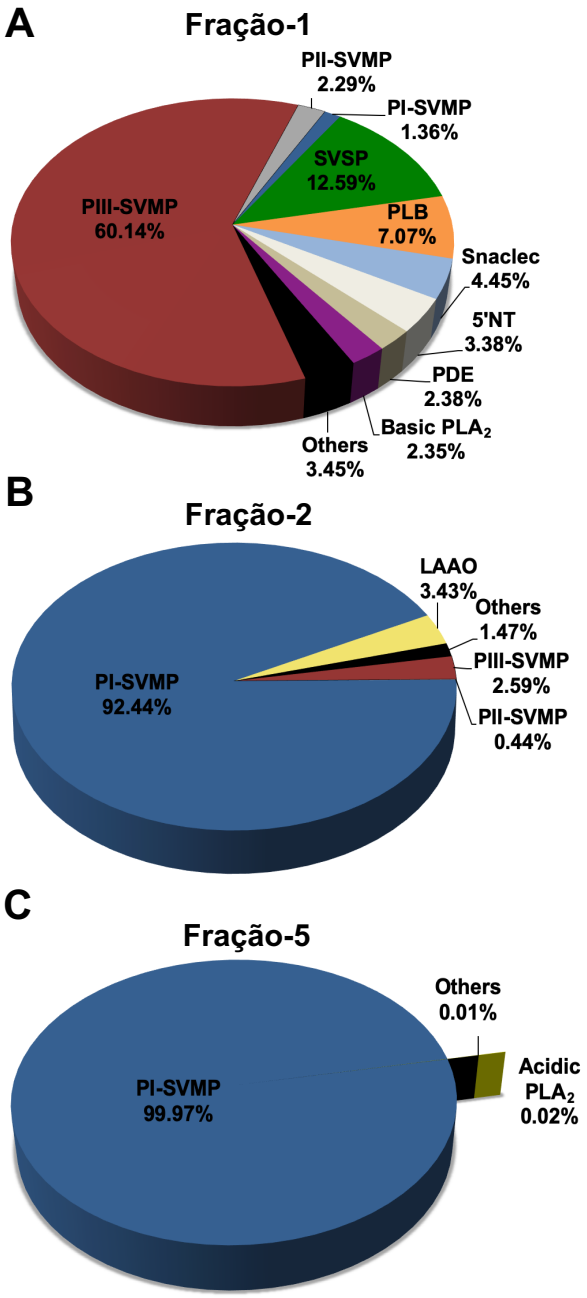


Figura 14: Composição proteica das frações citotóxicas da S-200. Espectrometria de massa da **Fração-1 (A)**, **Fração-2 (B)** e **Fração-5 (C)** foi realizada comercialmente. Os resultados foram analisados pelo MASCOT integrado ao banco de dados SwissProt. A abundância peptídica foi estimada por *Exponential Modified Protein Abundance Index* (emPai). **SVMP**: Metaloprotease de Veneno de Serpente; **SVSP**: Serinoprotease de Veneno de Serpente; **PLB**: Fosfolipase B; **Snaclec**: Lectina do tipo-C de Serpente; **5'NT**: 5' Nucleotidase; **PDE:** Fosfodiesterase; **PLA_2**: Fosfolipase A_2; **LAAO**: L-aminoácido oxidase.

Para então identificar quais proteínas são as principais responsáveis pela citotoxicidade do veneno, a Fração-2, que apresentou maior citotoxicidade, foi selecionada para dar continuidade às análises. Essa fração foi aplicada em uma coluna DEAE para cromatografia de troca iônica e cinco frações (Fração 2.1 a 2.5) foram obtidas ao final do processo (**Figura 15A**). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE e apresentaram composição variada, com proteínas de baixa e alta massa molecular (**Figura 15B**).

A citotoxicidade de cada fração (40 μg/mL) foi testada em queratinócitos, utilizando o veneno de *B. atrox* como controle (**Figura 15C**). As Frações 2.3 e 2.4 reduziram a viabilidade celular após 24 horas de tratamento, enquanto as Frações 2.1, 2.2. e 2.5 não foram citotóxicas nas condições testadas. Em seguida, as alterações morfológicas foram investigadas, utilizando marcação para E-caderina e F-actina (**Figura 15D**). De forma geral, os fenótipos observados em relação a adesão celular foram menos intensos que os observados para as frações provenientes da cromatografia de exclusão molecular (**Figura 12**). Para a Fração 2.3 há uma diminuição na intensidade da E-caderina (seta branca) e as células tratadas com a Fração 2.4 apresentaram retração celular na borda da colônia (seta vermelha). Ao contrário, os queratinócitos tratados com as Frações 2.1, 2.2 e 2.5 apresentaram morfologia muito similar às células do controle (não-tratadas).

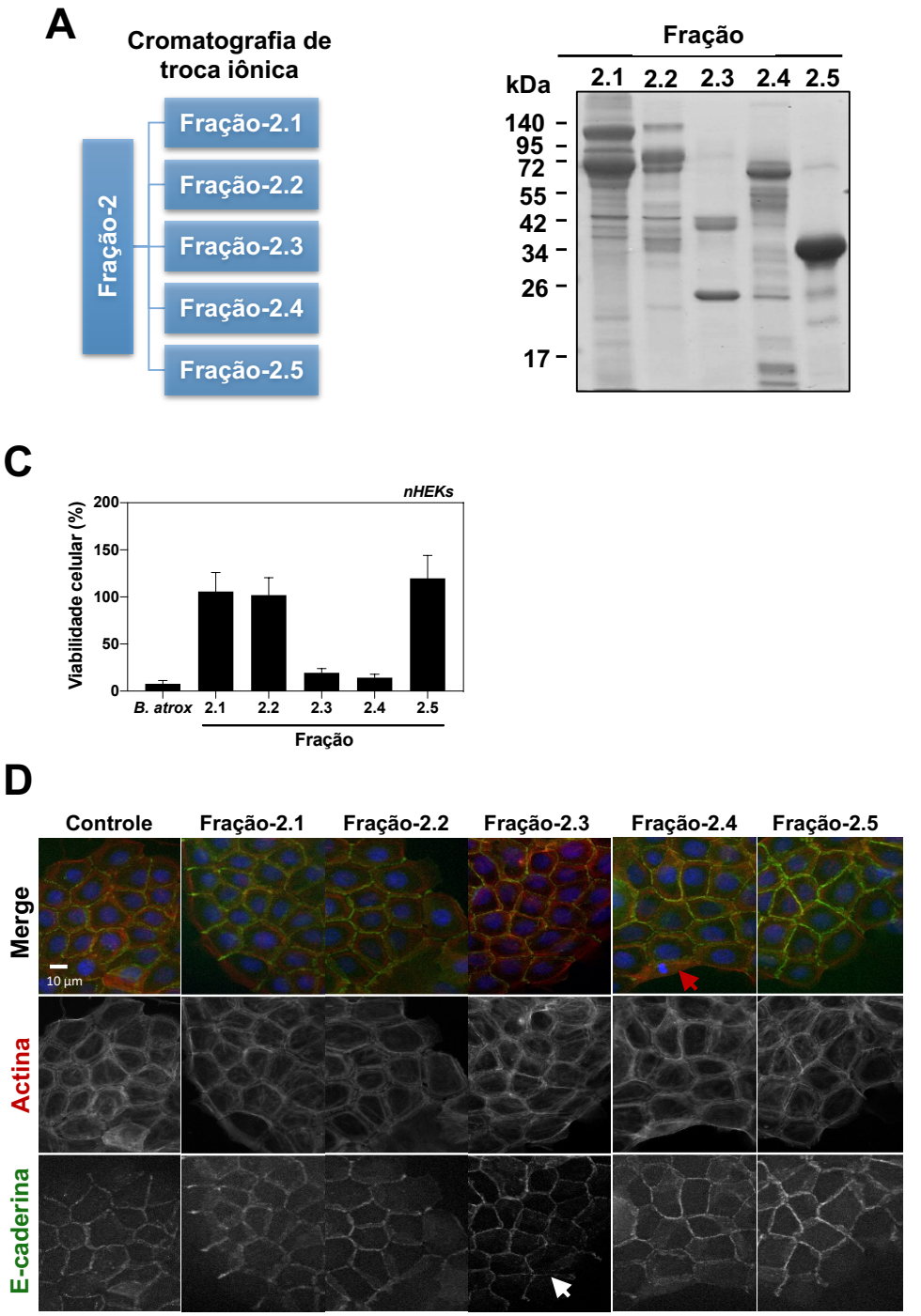


Figura 15: Perfil eletroforético e citotoxicidade das frações da DEAE do veneno de *B. atrox*. A) Esquema da cromatografia de troca iônica. Realizado por Costal-Oliveira, 2019. **B) Conteúdo proteico das frações 2.1 a 2.5.** SDS-PAGE (12 %) foi realizado com cada uma das frações (15 µg) sob condições redutoras e o gel foi corado com *Comassie Blue*. **C) Ensaio de viabilidade em queratinócitos.** As células foram incubadas com 40 µg/mL de cada uma das frações (2.1 a 2.5) e o reagente Alamar Blue® foi adicionado após 24 horas de tratamento. Os valores representam a média de três ensaios independentes e as barras de erro indicam o desvio padrão. **D) Ensaio de imunofluorescência.** NHEKs foram incubados com 10 µg/mL das frações por 1,5, 3 ou 6 horas. As células não tratadas (tempo 0 h) foram consideradas como controle negativo. Após incubação, as células foram fixadas e marcadas para F-actina (em vermelho), E-caderina (em verde) e núcleo (DAPI, em azul) por imunofluorescência. Imagens representativas (n=3) adquiridas em microscópio de campo aberto, com objetiva de 40x. **Seta branca:** E-caderina nas junções celulares. **Seta vermelha:** retração das células. Escala = 10 µm.

Espectrometria de massa foi realizada para identificar as proteínas que compõem as frações citotóxicas. Analisando a lista dos componentes encontrados (**Tabelas 9 e 10** para frações 2.3 e 2.4, respectivamente), pode-se concluir que as proteínas das famílias SVMP e LAAO são as mais abundantes, o que sugere que elas são as principais toxinas envolvidas nos efeitos citotóxicos observados.

Tabela 9: Espectrometria de massa da Fração-2.3 realizada comercialmente. Os resultados foram analisados pelo MASCOT integrado ao banco de dados SwissProt. A abundância peptídica foi estimada por *Exponential Modified Protein Abundance Index* (emPai). **SVMP**: Metaloprotease de Veneno de Serpente; **SVSP**: Serinoprotease de Veneno de Serpente; **LAAO:** L-aminoácido oxidase; **Snaclec**: Lectina do tipo-C de Serpente; **PDE:** Fosfodiesterase; **CRISP:** Proteína de Veneno Rica em Cisteína; **5'NT**: 5' Nucleotidase.

Identificação das proteínas da Fração-2.3 por LC-MS/MS				
Família da Toxina/Código de acesso	**Massa Molecular**	**pI Calc.**	**Número de peptídeos**	**Score**
SVMP/ P85420	22.9	6.33	17	4458.99
SVMP/ Q92032	46.1	5.33	3	1574.14
SVSP/ P81661	25.6	6.93	10	1459.90
SVSP/ P0DJ86	25.4	6.93	9	1407.12
SVMP/ Q8UVG0	68.5	5.73	8	1182.72
LAAO/ Q6TGQ8	54.4	6.37	12	781.62
SVMP/ Q0NZY0	17.9	6.43	2	525.64
SVMP/ P83912	54.6	5.48	3	465.47
SVMP/ P30431	63.9	5.39	6	410.49
SVSP/ Q5W960	28.0	8.09	6	360.97
SVMP/ O42138	69.5	6.57	5	327.58
SVMP/ Q0NZX9	24.3	5.62	4	303.08
SVMP/ C5H5D4	46.3	6.60	4	293.65
SVMP/ Q0NZX8	21.5	4.70	2	280.74
SVSP/ Q6IWF1	25.6	7.77	2	235.59
SVSP/ Q072L6	28.0	5.58	5	189.73
SVSP/ Q5W959	27.8	5.57	3	165.54
SVMP/ P34182	53.6	5.60	3	150.00
Snaclec/ P22029	15.2	6.96	3	128.89
SVMP/ Q8AWI5	67.6	6.07	3	120.25
PDE/ J3SBP3	91.7	8.07	5	109.57
CRISP/ Q8JI40	26.9	5.96	2	99.37
5'-NT/ B6EWW8	64.4	8.38	3	99.23

Tabela 10: Espectrometria de massa da Fração-2.4 realizada comercialmente. Os resultados foram analisados pelo MASCOT integrado ao banco de dados SwissProt. A abundância peptídica foi estimada por *Exponential Modified Protein Abundance Index* (emPai). **LAAO:** L-aminoácido oxidase; **SVMP**: Metaloprotease de Veneno de Serpente; **VF:** Fator de Veneno; **SVSP**: Serinoprotease de Veneno de Serpente; **Snaclec**: Lectina do tipo-C de Serpente; **VNGF**: Fator de crescimento de veneno; **5'NT**: 5' Nucleotidase; **CRISP:** Proteína de Veneno Rica em Cisteína; **QPCT:** Glutaminil-peptídeo Ciclotransferase; **PDE:** Fosfodiesterase.

Identificação das proteínas da Fração-2.4 por LC-MS/MS				
Família da Toxina/Código de acesso	**Massa Molecular**	**pI Calc.**	**Número de peptídeos**	**Score**
LAAO/ Q6TGQ8	54.4	6.37	38	10164.24
LAAO/B5AR80	56.8	6.76	30	5319.82
LAAO/ X2JCV5	58.5	6.43	13	2672.98
SVMP/ P85420	22.9	6.33	15	1666.57
SVMP/ Q98UF9	67.7	5.35	8	1152.89
SVMP/ Q0NZX9	24.3	5.62	6	1146.56
LAAO/ Q0NZY0	58.6	6.77	11	914.44
SVMP/ Q8UVG0	68.5	5.73	11	860.17
SVMP/ O42138	69.5	6.57	5	822.22
SVMP/ Q92032	46.1	5.33	3	724.64
SVMP/ P83912	54.6	5.48	3	693.60
SVMP/ P30431	63.9	5.39	9	667.38
LAAO/ P0DI84	54.7	7.75	11	539.84
SVMP/ P0C6E3	32.3	5.49	3	256.44
VF/ J3S836	184.8	6.23	5	256.37
SVMP/ Q92043	46.8	6.39	5	244.24
SVMP/ C5H5D2	46.3	5.68	6	235.74
SVMP/ C5H5D4	46.3	6.60	2	229.83
LAAO/ P0DI89	3.5	4.15	3	207.08
SVSP/ P81661	25.6	6.93	4	175.44
SVMP/Q0NZX8	21.5	4.70	2	175.43
Snaclec/ P22029	15.2	6.96	2	164.19
VNGF/ Q9DEZ9	27.1	8.60	2	157.57
SVSP/ Q072L6	28.0	5.58	3	143.14
SVMP/ Q0NZX6	16.8	4.88	3	132.20
SVSP/ Q6IWF1	25.6	7.77	3	121.42
SVMP/Q8AWI5	67.6	6.07	2	116.51
5'-NT/B6EWW8	64.4	8.38	3	112.14
SVSP/Q5W960	28.0	8.09	4	103.21
CRISP/Q7ZT99	26.6	8.06	2	80.19
QPCT/Q9YIB5	42.2	8.51	2	75.17
PDE/J3SBP3	91.7	8.07	2	74.63
SVMP/Q9PSN7	23.6	4.67	2	62.42

A Fração 2.3 apresenta quase sua totalidade composta por Metaloprotease da classe P-1 (99,97 %), com uma menor proporção relativa de SVMPs das classes P-II e P-III, SVSP, Snaclec e LAAO (**Figura 16A**). Na Fração 2.4, a LAAO é o componente mais abundante (62,9 %), seguido pelas Metaloproteases da classe P-I (21,9 %), P-II (8,5 %) e P-III (6,3 %) (**Figura 16B**).

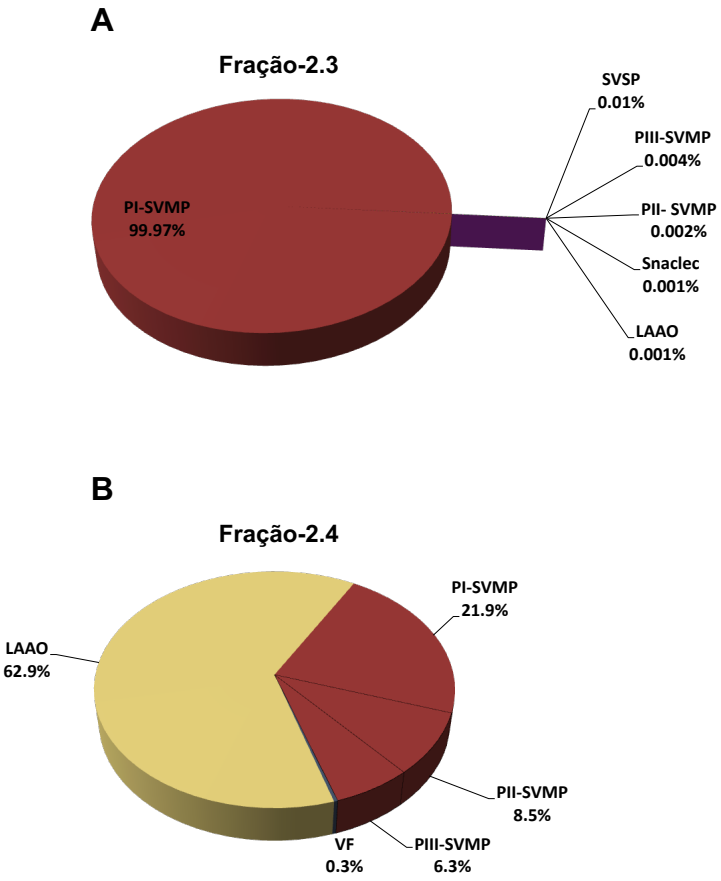


Figura 16: Composição proteica das frações citotóxicas da DEAE. Espectrometria de massa da **Fração 2.3 (A)** e **Fração 2.4 (B)** foi realizada comercialmente. Os resultados foram analisados pelo MASCOT integrado ao banco de dados SwissProt. A abundância peptídica foi estimada por *Exponential Modified Protein Abundance Index* (emPai). **SVMP**: Metaloprotease de Veneno de Serpente; **SVSP**: Serinoprotease de Veneno de Serpente; **Snaclec**: Lectina do tipo-C de Serpente; **LAAO**: L-aminoácido oxidase; **VF:** Fator de Veneno.

Em suma, as Metaloproteases e as L-aminoácido oxidases foram identificadas como as proteínas-chave envolvidas nos efeitos citotóxicos do veneno de *B. atrox*. Por ser uma das toxinas mais abundantes em venenos botrópicos, as SVMPs são proteínas amplamente estudadas, enquanto a caracterização das LAAOs ainda não é tão expressiva. Dessa forma, a fim de entender melhor os efeitos causados por ela nas células e no metabolismo celular, a LAAO foi escolhida para dar prosseguimento a este trabalho.

4.2 Produção da LAAO recombinante e caracterização dos efeitos celulares

O isolamento da LAAO nativa a partir de amostras de veneno não é uma tarefa trivial. Por esse motivo, nesse trabalho a LAAO foi produzida em sua forma recombinante, a fim de caracterizar seus efeitos em células humanas. Além da produção dessa proteína com a mesma sequência de sua forma nativa (rLAAO), outra proteína contendo uma mutação sítio-específica foi produzida (rLAAO^{R90A}). O resíduo de Arg90 já é bem descrito na literatura como um dos resíduos mais conservados e importantes para a ligação da LAAO ao substrato (ULLAH, 2020a). Portanto, a fim de avaliar a importância deste resíduo para as atividades desta proteína, a rLAAO^{R90A} foi desenvolvida. O processo de produção e purificação da LAAO está resumido na **Figura 8**.

Os plasmídeos contendo a sequência codificante para a expressão da rLAAO ou da rLAAO^{R90A} foram utilizados para transfecção de células HEK 293T. No primeiro dia após o procedimento, o ensaio de atividade de LAAO foi realizado utilizando o sobrenadante das células transfectadas, a fim de avaliar se a proteína estava sendo expressa. Da mesma forma, o meio de cultura foi coletado durante os 5 dias em que as células foram cultivadas e sua atividade foi avaliada. O veneno de *B. atrox* foi utilizado como controle positivo do experimento. No primeiro dia após a transfecção, já é possível detectar a presença de rLAAO ativa no sobrenadante celular. A atividade foi mais alta no segundo dia de produção e diminuiu gradativamente ao longo do tempo. Como esperado, a rLAAO^{R90A} não apresentou atividade catalítica frente ao substrato L-Leucina, demonstrando assim, que essa proteína é cataliticamente inativa nas condições testadas (**Figura 17A**).

Uma vez que a transfecção foi bem-sucedida, os sobrenadantes de cada uma das proteínas foram combinados separadamente e concentrados para purificação utilizando *beads* Ni-NTA Agarose. Após a realização do procedimento, as amostras foram submetidas a SDS-PAGE para avaliação de seu conteúdo proteico. A LAAO recombinante apresentou massa molecular próxima ao esperado (em torno de 65 kDa) e o seu grau de pureza foi satisfatório (**Figura 17B**). Diferentes concentrações de BSA foram aplicadas no mesmo gel, com o objetivo de realizar a quantificação relativa do conteúdo proteico das amostras de LAAO, utilizando o *software* ImageJ. Estima-se que, a cada processo de produção da LAAO recombinante, obtêm-se em torno de 300 µg de proteína purificada.

Sabe-se que a albumina é o principal componente do soro fetal bovino, representando mais de 60 % de seu conteúdo proteico total (FRANCIS, 2010). Devido a sua massa molecular (66,5 kDa) ser muito similar à da LAAO recombinante, se fez necessário provar que a banda observada no gel de eletroforese é referente à LAAO e não ao BSA proveniente do soro fetal utilizado para cultivo das células. Para isto, foi realizado um ensaio de *Western blot*, utilizando o anticorpo primário anti-6His *Tag*, o qual reconhece especificamente a cauda de histidina presente nas proteínas recombinantes. O anticorpo apresentou reatividade frente a uma banda de massa molecular em torno de 65 kDa, nas amostras de rLAAO e rLAAO^{R90A} (**Figura 17C**). Por outro lado, a banda correspondente ao BSA (**Figura 17C**, C-, à direita) não foi reconhecida, comprovando assim a presença da LAAO nas amostras provenientes da transfecção. Como controle positivo, utilizou-se uma proteína que sabidamente possui cauda de histidina (LZTFL1), e ela também foi reconhecida (**Figura 17C**, C+, à direita).

Uma vez que a presença da LAAO após a purificação foi confirmada, um ensaio de atividade enzimática foi realizado com essas amostras. Diferentes quantidades de rLAAO ou rLAAO^{R90A} foram utilizadas e a reatividade foi comparada com o veneno de *B. atrox*. Foi possível observar que a rLAAO apresentou elevada atividade enzimática frente à L-Leucina (utilizado como substrato), e esta atividade foi concentração-dependente. Por outro lado, a rLAAO^{R90A} não apresentou atividade catalítica frente a este aminoácido (**Figura 17D**).

Para avaliar a estabilidade da atividade enzimática da rLAAO ao longo do tempo, o ensaio foi repetido nas mesmas condições, 2 e 5 meses após a produção e purificação da proteína. Observou-se que a atividade enzimática reduziu em mais de 30 % após 2 meses e em mais da metade após 5 meses, quando comparada ao mesmo ensaio realizado com a amostra recém-purificada (**Figura 17E**).

Diante da diminuição da atividade da LAAO ao longo do tempo, não é recomendado o uso do mesmo lote de proteína recombinante por mais de 3 meses, uma vez que sua atividade diminui consideravelmente, assim como sua citotoxicidade. Além disso, também foi verificado que a atividade da rLAAO varia de acordo com o lote, podendo ser mais ou menos ativa (dados não mostrados). Por esses motivos, padronizou-se que a cada lote de LAAO produzido, sua atividade deve ser checada por ensaio enzimático e de viabilidade celular, a fim de assegurar que a quantidade de proteína utilizada nos experimentos é proporcional à sua atividade.

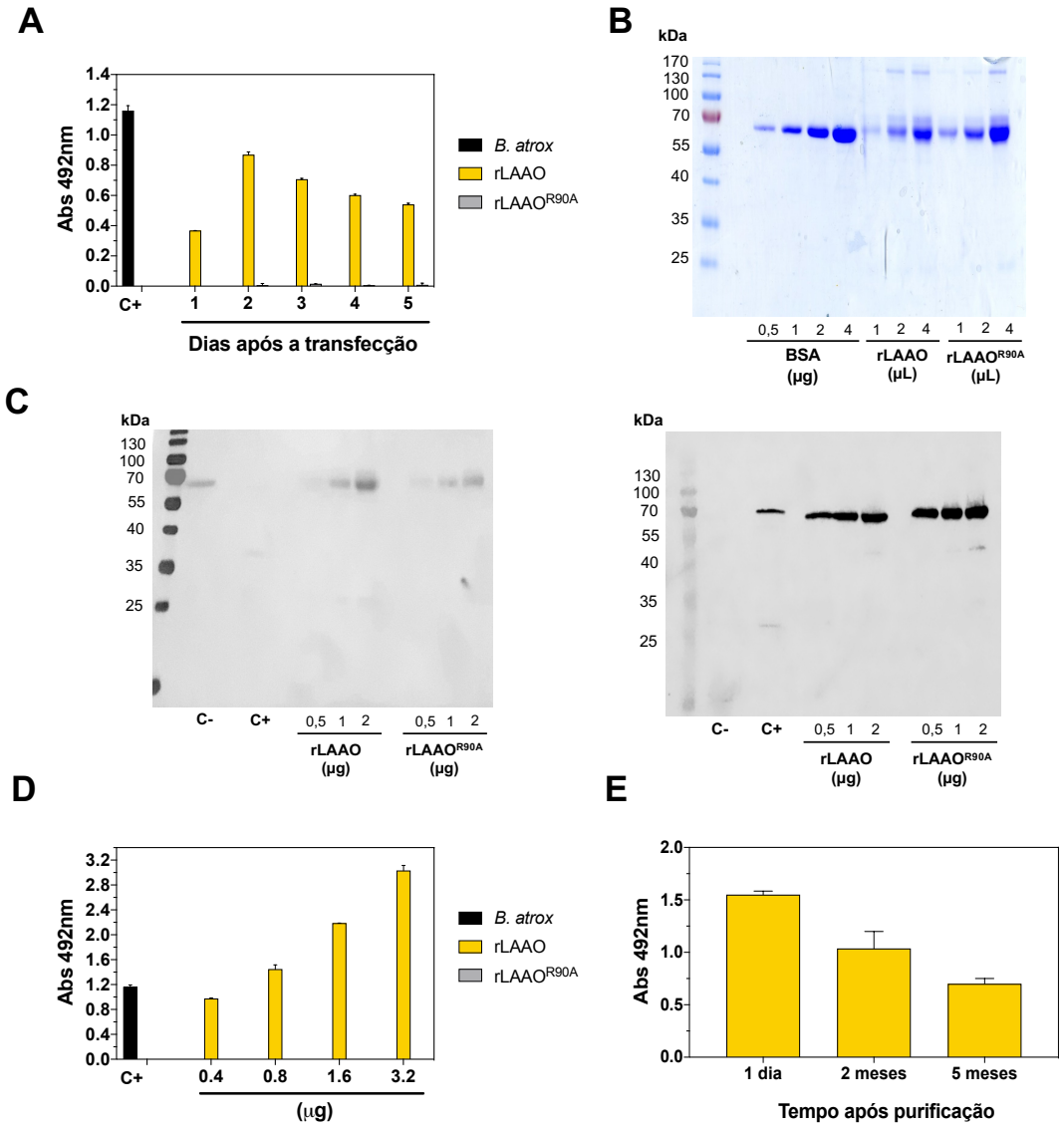


Figura 17: Produção da LAAO recombinante. A) Ensaio de atividade de LAAO. Células HEK 293-T foram transfectadas com os plasmídeos da rLAAO ou rLAAO^{R90A}. O sobrenadante da cultura celular (25 µL) do 1º ao 5º dia foi utilizado para avaliação da atividade enzimática, utilizando L-Leucina como substrato. **B) Perfil eletroforético da LAAO recombinante**. rLAAO ou rLAAO^{R90A} após purificação foram separadas em SDS-PAGE e BSA foi utilizado como curva padrão para estimar a concentração de proteínas. **C) *Western Blot* da LAAO recombinante.** Membrana corada com Ponceau (à esquerda). Membrana após revelação (à direita). Anti-6x His-Tag (1:1000) foi utilizado como anticorpo primário. Controle negativo (**C-**): BSA (1 µg). Controle positivo (**C+**): HisTag-LZTFL1 (1 µg). **D) Ensaio de atividade da rLAAO e rLAAO^{R90A} purificadas.** O veneno de *B. atrox* (2 µg) foi utilizado como controle positivo (**C+**) do ensaio. **E) Atividade enzimática da rLAAO ao longo do tempo.** rLAAO purificada (1 µg) foi submetida ao ensaio de LAAO, 1 dia, 2 ou 5 meses após sua purificação.

Após essa análise inicial da LAAO recombinante, foi avaliado o efeito das proteínas produzidas na viabilidade de células primárias humanas. Diante da

importância das células endoteliais e dos queratinócitos para o envenenamento local, essas células foram escolhidas como modelo de estudo no presente trabalho.

Primeiramente, avaliou-se o efeito citotóxico das amostras de LAAO recombinante nas células endoteliais. Diferentes concentrações de LAAO foram incubadas com HDMECs e a viabilidade celular foi avaliada utilizando Alamar Blue®. A rLAAO apresentou citotoxicidade nas condições testadas, diminuindo a viabilidade das células em concentrações a partir de 1,21 μg/mL de proteína. Esse efeito foi ainda mais acentuado em concentrações maiores que 1,45 μg/mL e a concentração efetiva capaz de reduzir em 50 % a viabilidade celular (EC_{50}) foi calculada como 1,26 μg/mL (**Figura 18A**).

Em seguida, as células endoteliais após tratamento com a rLAAO foram avaliadas quanto à organização das moléculas de F-actina e VE-caderina, utilizando anticorpos que reconhecem especificamente estas proteínas (**Figura 18B**). Células que não receberam nenhum tratamento (tempo 0 h) foram consideradas como controle negativo do ensaio. As células foram tratadas por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas e efeitos foram observados após 1,5 h de tratamento, visto que a reatividade dos anticorpos frente à actina nessas células aparenta estar mais intensa (seta vermelha), quando comparadas ao controle. Além disso, ao longo do tempo observa-se comprometimento das junções celulares, caracterizada pela diminuição de sua espessura (setas verdes). Também é possível observar fragmentação das células, com o aparecimento de espaços na monocamada celular (setas brancas).

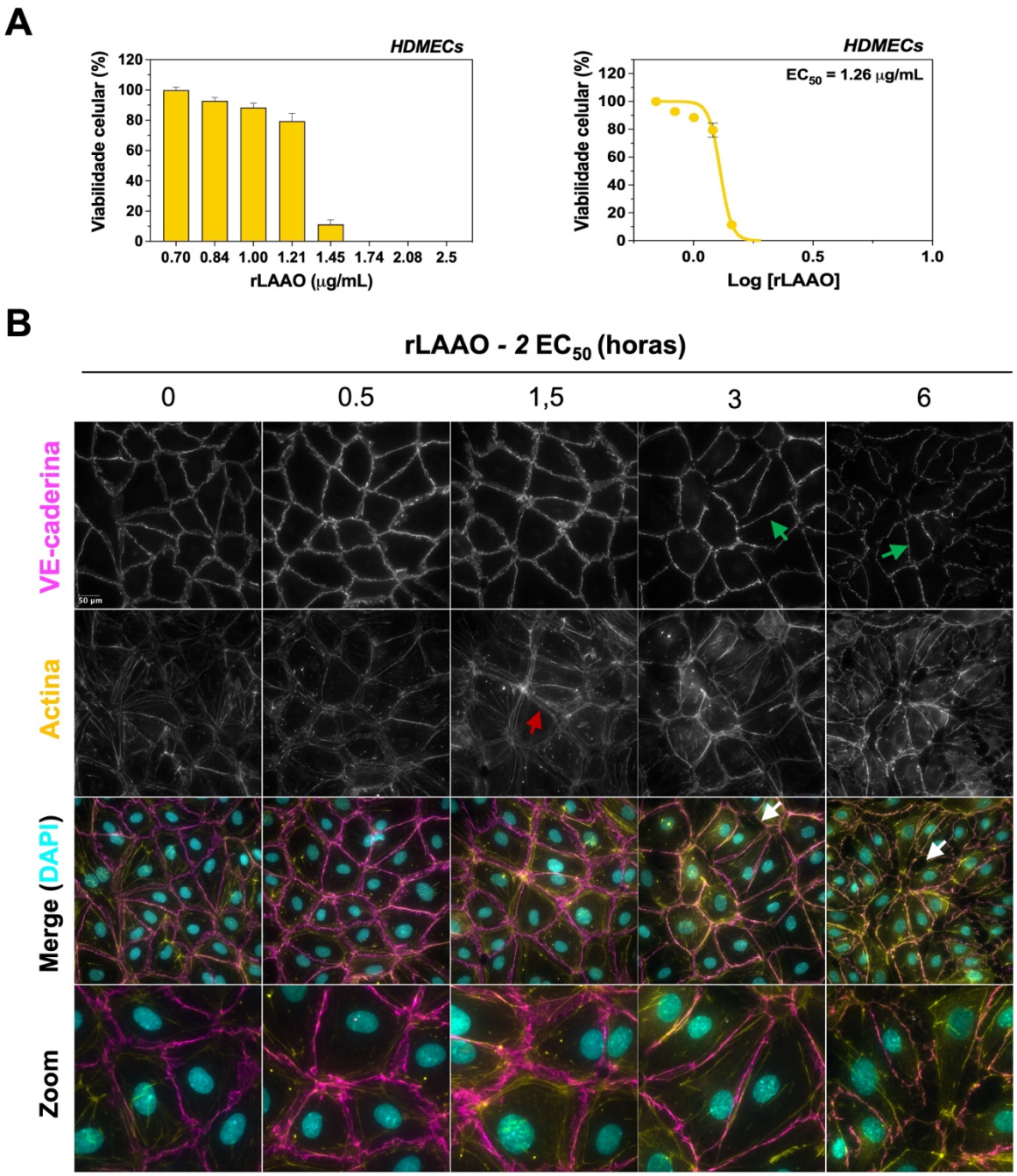


Figura 18: Avaliação da citotoxicidade da rLAAO em células endoteliais. A) Ensaio de viabilidade celular. HDMECs foram incubados com diferentes concentrações de rLAAO (0,70 a 2,5 µg/mL) e o reagente Alamar Blue® foi adicionado após 24 horas de tratamento. A fluorescência foi determinada a 560 nm de excitação e 590 nm de emissão. Os valores representam a média de três ensaios independentes e as barras de erro indicam o desvio padrão. A concentração efetiva de rLAAO capaz de reduzir 50 % da viabilidade celular (EC_{50}) foi calculada utilizando uma curva concentração-resposta no *software* GraphPad Prism 8.0. **B) Ensaio de imunofluorescência.** HDMECs foram incubadas com 2 EC_{50} de rLAAO por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. Células não-tratadas (tempo 0 h) foram consideradas como controle negativo. Após incubação, as células foram fixadas e marcadas para F-actina (em amarelo), VE-caderina (em magenta) e núcleo (DAPI, em azul) por imunofluorescência. Imagens representativas (n=3) adquiridas em microscópio de campo aberto, com objetiva de 60x. **Seta vermelha:** Marcação de actina mais intensa. **Setas verdes:** redução da espessura nas junções celulares formadas por VE-caderina. **Setas brancas:** espaços na monocamada celular. Escala = 50 µm.

Em seguida, foi avaliado se a rLAAO^{R90A} é capaz de causar efeitos citotóxicos nas células endoteliais, mesmo não apresentando atividade catalítica. Diferentes quantidades da proteína foram testadas, porém ela não reduziu a viabilidade das HDMECs em nenhuma das concentrações (**Figura 19A**). Como não houve diminuição de células viáveis e o cálculo do valor de EC_{50} para essa amostra não foi possível, o mesmo valor de EC_{50} determinado para a rLAAO foi utilizado nos experimentos seguintes com a rLAAO^{R90A}.

Embora não apresente atividade catalítica e não seja capaz de reduzir a viabilidade celular, foi avaliado se a rLAAO^{R90A} apresenta algum efeito na actina e VE-caderina de células endoteliais. Entretanto, a integridade da monocamada e a intensidade das proteínas celulares avaliadas não se alteraram em relação à condição controle (**Figura 19B**).

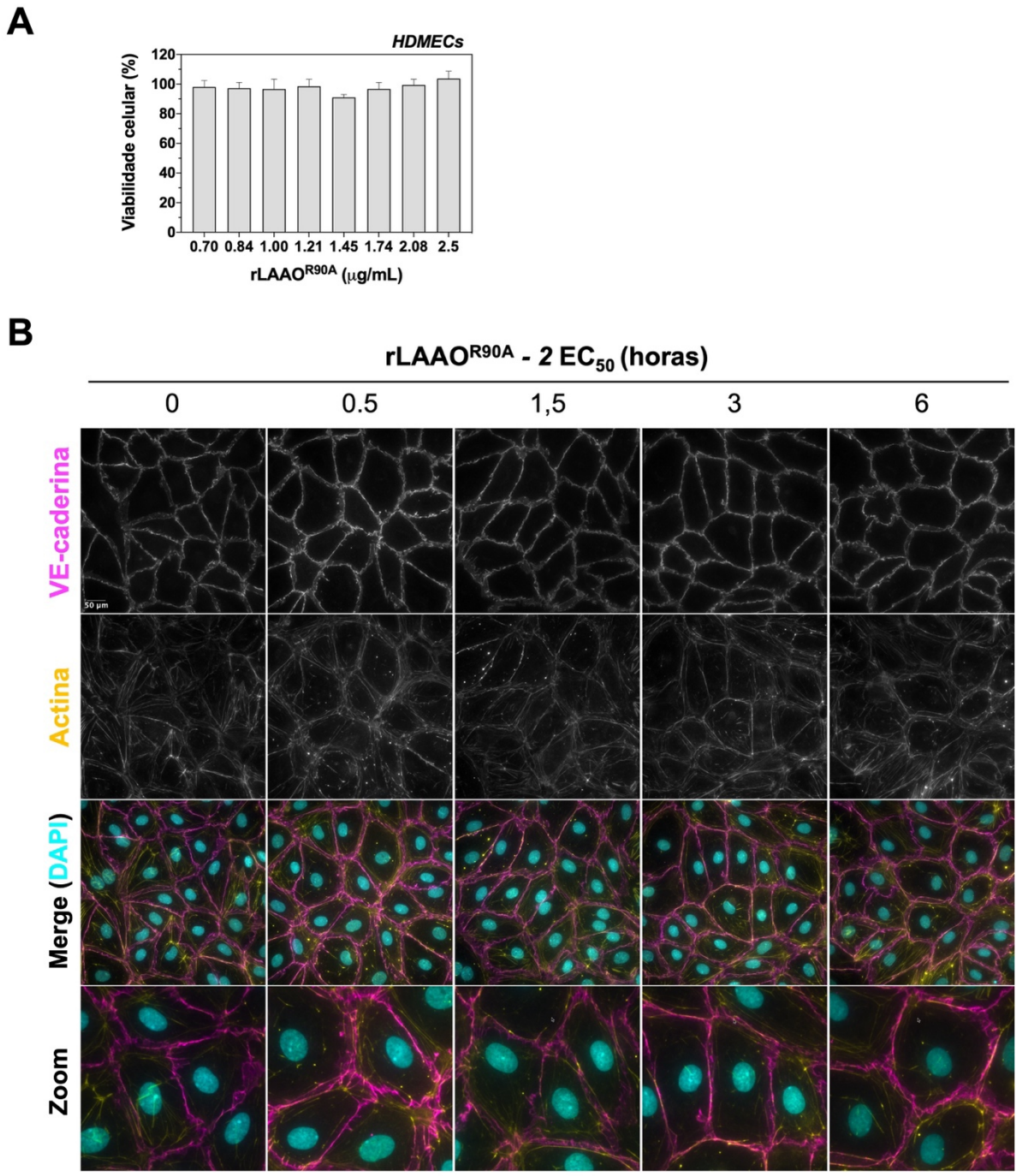


Figura 19: Avaliação da citotoxicidade da rLAAO^{R90A} em células endoteliais. A) Ensaio de viabilidade celular. HDMECs foram incubados com diferentes concentrações de rLAAO^{R90A} (0,70 a 2,5 µg/mL) e o reagente Alamar Blue® foi adicionado após 24 horas de tratamento. A fluorescência foi determinada a 560 nm de excitação e 590 nm de emissão. Os valores representam a média de três ensaios independentes e as barras de erro indicam o desvio padrão. **B) Ensaio de imunofluorescência.** HDMECs foram incubadas com 2 EC_{50} de rLAAO^{R90A} por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. Células não-tratadas (tempo 0 h) foram consideradas como controle negativo. Após incubação, as células foram fixadas e marcadas para F-actina (em amarelo), VE-caderina (em magenta) e núcleo (DAPI, em azul) por imunofluorescência. Imagens representativas (n=3) adquiridas em microscópio de campo aberto, com objetiva de 60x. Escala = 50 µm.

Outra proteína importante para a adesão celular também foi testada neste trabalho: a α-catenina. O experimento foi conduzido conforme o anterior, porém utilizou-se anticorpos específicos contra essa proteína. Após tratamento com a rLAAO, foi possível observar o aparecimento de espaços entre as células após 1,5 h de tratamento (setas vermelhas). A α-catenina foi consideravelmente comprometida ao longo do tempo, não sendo mais detectada em algumas junções celulares (setas verdes). Também é possível observar a formação de aglomerados de actina (setas brancas), indicando a ocorrência de retração nessas células (**Figura 20**).

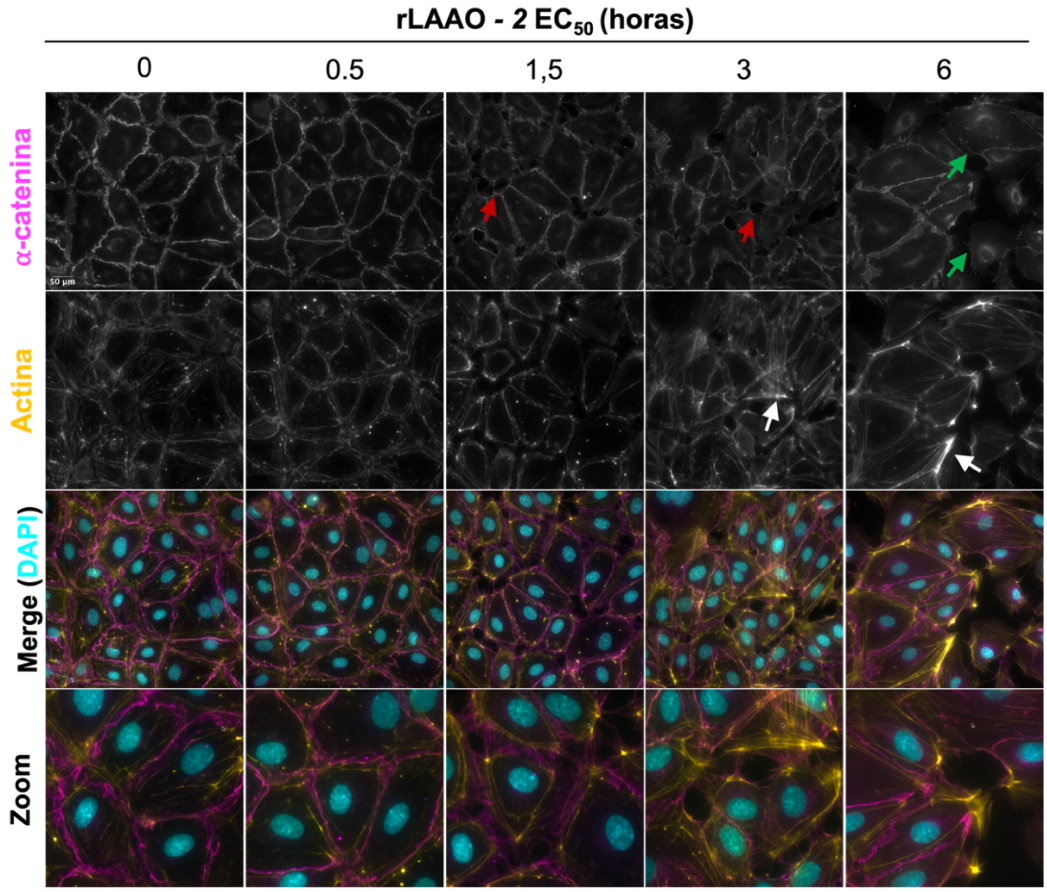


Figura 20: Avaliação da estrutura de células endoteliais após tratamento com rLAAO. Ensaio de imunofluorescência. HDMECs foram incubadas com 2 EC_{50} de rLAAO por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. Células não-tratadas (tempo 0 h) foram consideradas como controle negativo. Após incubação, as células foram fixadas e marcadas para F-actina (em amarelo), α-catenina (em magenta) e núcleo (DAPI, em azul) por imunofluorescência. Imagens representativas (n=3) adquiridas em microscópio de campo aberto, com objetiva de 60x. **Setas vermelhas:** espaços na monocamada celular; **Setas verdes:** ausência de α-catenina nas junções celulares; **Setas brancas:** aglomerado de actina. Escala = 50 µm.

O efeito da rLAAO^{R90A} nas moléculas de α-catenina também foi analisado e os resultados corroboraram o fenótipo observado na **Figura 19**. A rLAAO^{R90A} não causou considerável alteração na actina e α-catenina das células endoteliais, visto que em todos os tempos testados as células apresentaram morfologia similar ao controle (**Figura 21**).

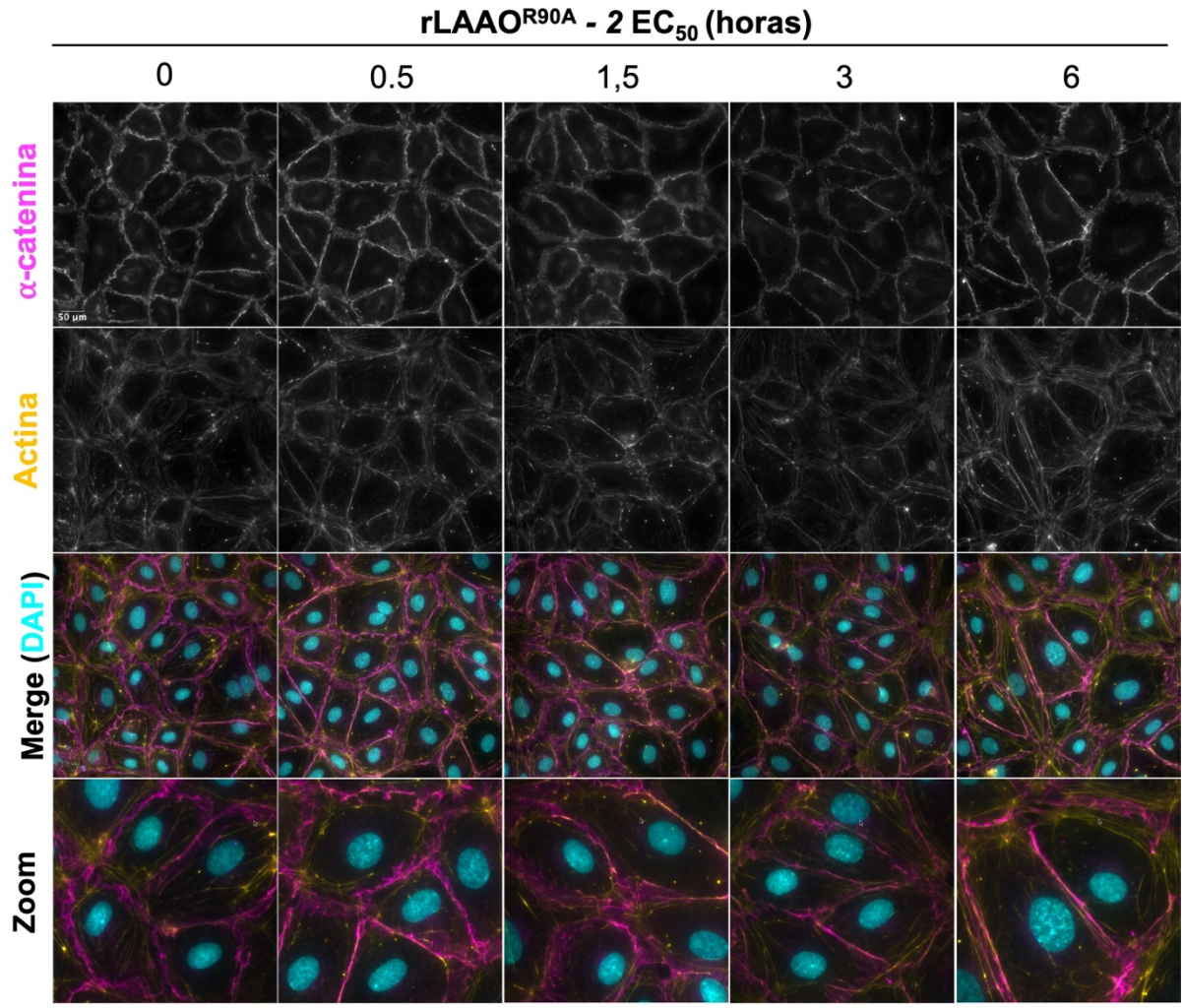


Figura 21: Avaliação da estrutura de células endoteliais após tratamento com rLAAO^{R90A}. Ensaio de imunofluorescência. HDMECs foram incubadas com 2 EC$_{50}$ de rLAAO^{R90A} por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. Células não-tratadas (tempo 0 h) foram consideradas como controle negativo. Após incubação, as células foram fixadas e marcadas para F-actina (em amarelo), α-catenina (em magenta) e núcleo (DAPI, em azul) por imunofluorescência. Imagens representativas (n=3) adquiridas em microscópio de campo aberto, com objetiva de 60x. Escala = 50 µm.

Queratinócitos humanos foram testados frente às amostras de LAAO recombinante, a fim de avaliar se essas células também são suscetíveis aos efeitos citotóxicos da enzima. A rLAAO reduziu a viabilidade das células de forma concentração-dependente, sendo essa diminuição mais expressiva em concentrações acima de 1,87 μg/mL. A EC_{50} da rLAAO nessas células foi de 1,47 μg/mL (**Figura 22A**).

Em relação à estrutura celular, as moléculas de E-caderina e actina das células foram avaliadas, após tratamento dos queratinócitos por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas (**Figura 22B**). Em todos os tempos testados, a rLAAO parece afetar a E-caderina das células e esse efeito aumenta ao longo do tempo. É possível observar uma fragmentação nas junções das células, com a formação de espaços entre elas (setas vermelhas). Também é importante destacar o aparecimento de aglomerados de E-caderina no citoplasma das células tratadas por 3 horas (setas verdes). A intensidade de ambas as proteínas analisadas (actina e E-caderina) também diminui consideravelmente após 6 horas de tratamento (setas brancas).

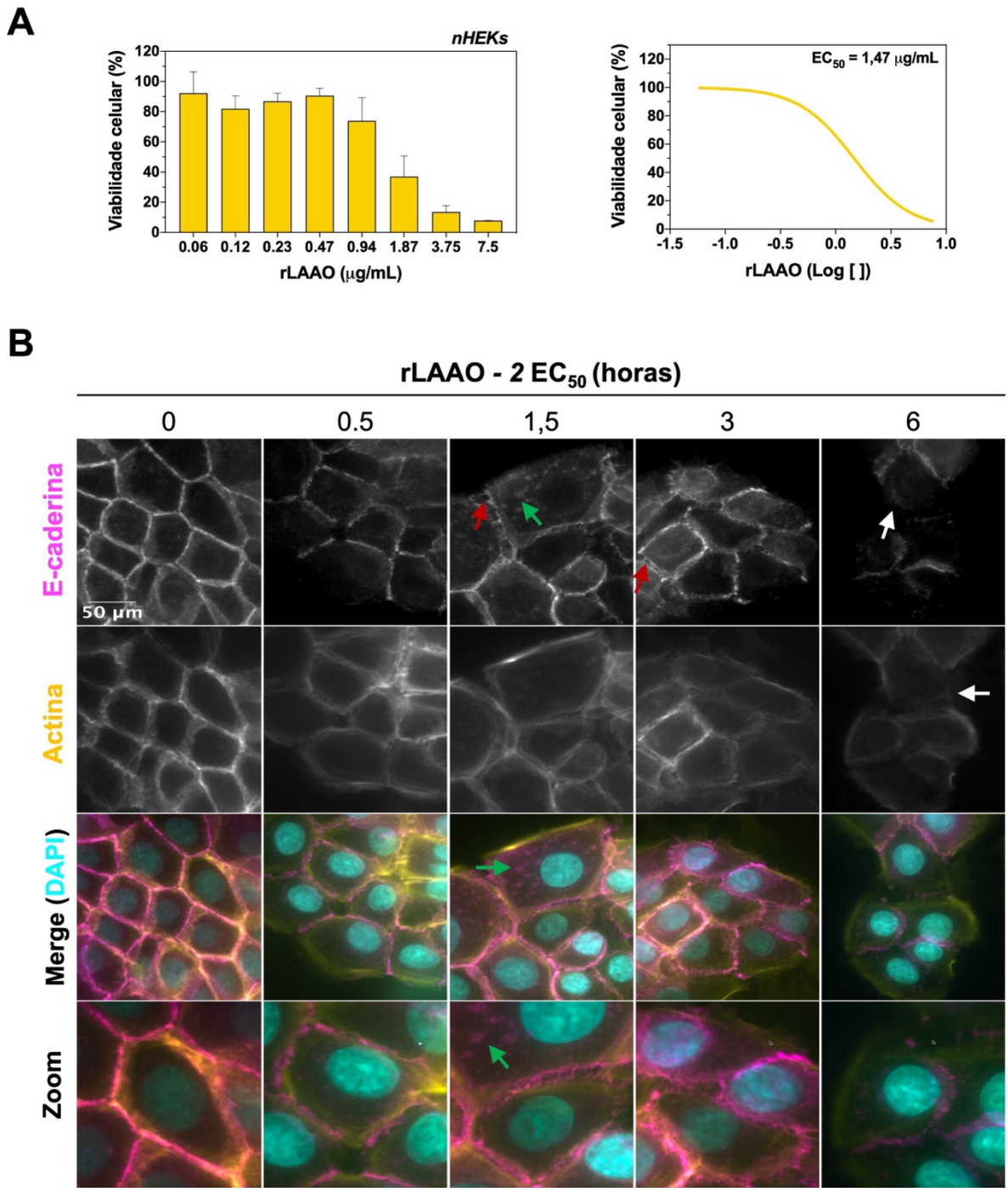


Figura 22: Avaliação da citotoxicidade da rLAAO em queratinócitos. A) Ensaio de viabilidade celular. NHEKs foram incubados com diferentes concentrações de rLAAO (0,06 a 7,5 µg/mL) e o reagente Alamar Blue® foi adicionado após 24 horas de tratamento. A fluorescência foi determinada a 560 nm de excitação e 590 nm de emissão. Os valores representam a média de três ensaios independentes e as barras de erro indicam o desvio padrão. A concentração efetiva de rLAAO capaz de reduzir 50 % da viabilidade celular (EC_{50}) foi calculada utilizando uma curva concentração-resposta no *software* GraphPad Prism 8.0. **B) Ensaio de imunofluorescência.** NHEKs foram incubadas com 2 EC_{50} de rLAAO por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. Células não-tratadas (tempo 0 h) foram consideradas como controle negativo. Após incubação, as células foram fixadas e marcadas para F-actina (em amarelo), E-caderina (em magenta) e núcleo (DAPI, em azul) por imunofluorescência. Imagens representativas (n=2) adquiridas em microscópio de campo aberto, com objetiva de 60x. **Seta vermelha:** espaços nas junções celulares; **Setas verdes:** aglomerado de E-caderina no citoplasma celular; **Setas brancas:** diminuição da intensidade da E-caderina e da actina. Escala = 50 µm.

Em seguida, os queratinócitos tratados com a rLAAO^{R90A} foram avaliados. Em relação à viabilidade celular, nenhuma redução significativa foi encontrada e, novamente, o cálculo da EC_{50} não foi possível (**Figura 22A**). Porém, quando a estrutura das células foi analisada, observou-se uma redução considerável na intensidade da E-caderina (setas vermelhas) ao longo do tempo. A actina, por sua vez, apresentou-se mais difusa, com prolongamentos no citoplasma das células (setas brancas) (**Figura 22B**), o que não ocorre nos queratinócitos não tratados. Esses efeitos são diferentes do que foi observado para as células endoteliais e, portanto, experimentos adicionais para a análise dessas proteínas celulares precisam ser realizados para confirmar se a LAAO^{R90A} realmente apresenta efeitos citotóxicos que independem de sua atividade catalítica.

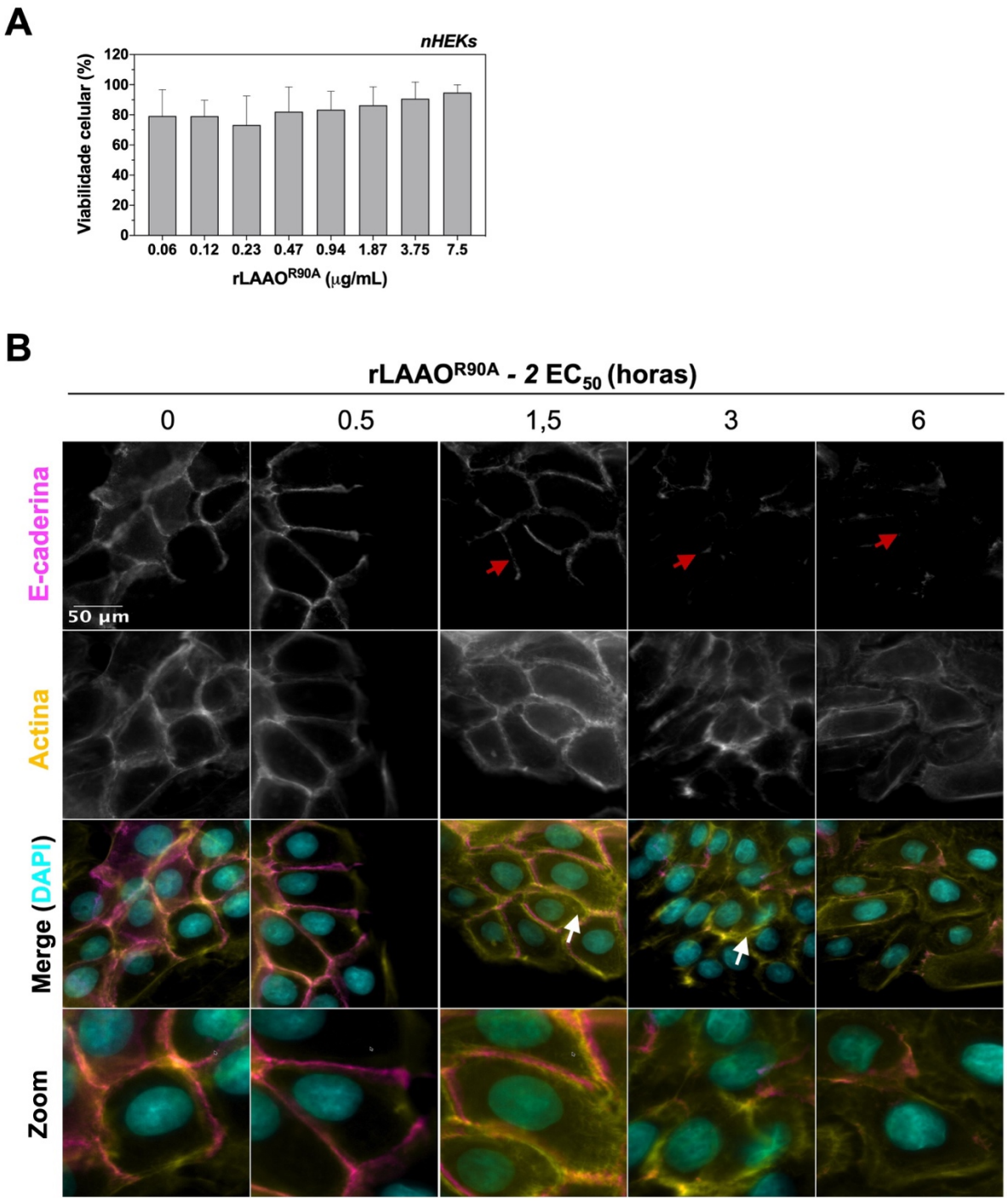


Figura 23: Avaliação da citotoxicidade da rLAAO^{R90A} em queratinócitos. A) Ensaio de viabilidade celular. NHEKs foram incubados com diferentes concentrações de rLAAO^{R90A} (0,06 a 7,5 µg/mL) e o reagente Alamar Blue® foi adicionado após 24 horas de tratamento. A fluorescência foi determinada a 560 nm de excitação e 590 nm de emissão. Os valores representam a média de três ensaios independentes e as barras de erro indicam o desvio padrão. **B) Ensaio de imunofluorescência.** NHEKs foram incubadas com 2 EC_{50} de rLAAO^{R90A} por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. Células não-tratadas (tempo 0 h) foram consideradas como controle negativo. Após incubação, as células foram fixadas e marcadas para F-actina (em amarelo), E-caderina (em magenta) e núcleo (DAPI, em azul) por imunofluorescência. Imagens representativas (n=2) adquiridas em microscópio de campo aberto, com objetiva de 60x. **Seta vermelha:** diminuição ou ausência da E-caderina nas junções celulares; **Setas brancas:** actina difusa no citoplasma celular. Escala = 50 µm.

4.3 Caracterização das alterações metabólicas induzidas pela LAAO recombinante

Com o objetivo de compreender os processos celulares que são desencadeados pela LAAO durante o envenenamento, este trabalho teve como objetivo final a caracterização dos efeitos metabólicos causados por essa toxina. Essa investigação foi baseada em análises por espectrometria de massa, que permitem a identificação e, em alguns casos, a quantificação de uma grande variedade de compostos, permitindo a obtenção de um painel de substâncias potencialmente reguladas em determinadas situações. No presente estudo, foi avaliado o proteoma, o perfil metabólico de aminoácidos e aminas biogênicas, e o lipidoma de células humanas tratadas com a LAAO.

4.3.1. *Análise do proteoma de células tratadas com LAAO recombinante*

As proteínas formam o primeiro grupo de moléculas investigadas neste trabalho, devido a sua ampla participação na maior parte dos processos metabólicos celulares, incluindo mecanismos regulatórios (LARANCE; LAMOND, 2015b). Sendo assim, o proteoma de células endoteliais e queratinócitos humanos foi investigado. As células foram tratadas com rLAAO ou rLAAO^{R90A} por 3 horas e as proteínas celulares foram extraídas para análises por LC-MS/MS (**Figura 9**).

Células endoteliais

Primeiramente, após processamento dos dados de espectrometria das HDMECs tratadas com rLAAO, o número de proteínas encontradas nessas células foi contabilizado, e 4439 proteínas foram identificadas. A intensidade dessas proteínas

no grupo tratado foi comparada à do grupo controle (células não-tratadas) e 181 proteínas tiveram seus níveis significativamente regulados (valor p < 0,05) após o tratamento (**Figura 24A**). Além disso, o *fold-change* das proteínas foi calculado, a fim de se identificar quantas vezes determinada molécula está diminuída ou aumentada, em relação ao controle. Considerando um *fold-change* igual a 2 (ou seja, a intensidade da proteína está vezes menor ou maior do que o controle), foram observadas 124 proteínas reguladas negativamente (*down-regulated*) e 54 proteínas reguladas positivamente (*up-regulated*). Foi então verificado se essa regulação era significativa (valor p < 0,05) e, a partir dessa análise, das 124 proteínas *down-regulated*, 20 delas foram significativas. Já em relação às proteínas *up-regulated*, 15 delas apresentaram valor p < 0,05 (**Figura 24B**).

Um gráfico do tipo *volcano plot* foi construído utilizando os dados de valor p e *fold-change* de todas as proteínas identificadas e, através dele, é possível observar a dispersão dos dados de forma conjunta. Todas as proteínas com valor p < 0,05 (log2 = 4.32) e *fold-change* $\leq$ -2 ou $\geq$ 2, foram destacadas em azul (*down-regulated*) ou vermelho (*up-regulated*), respectivamente. O *score* dessas proteínas (valor p multiplicado pelo *fold-change*) foi calculado, e o nome do gene relacionado às dez proteínas que apresentaram os valores de *score* mais elevados, foram apresentados no gráfico (**Figura 24C**).

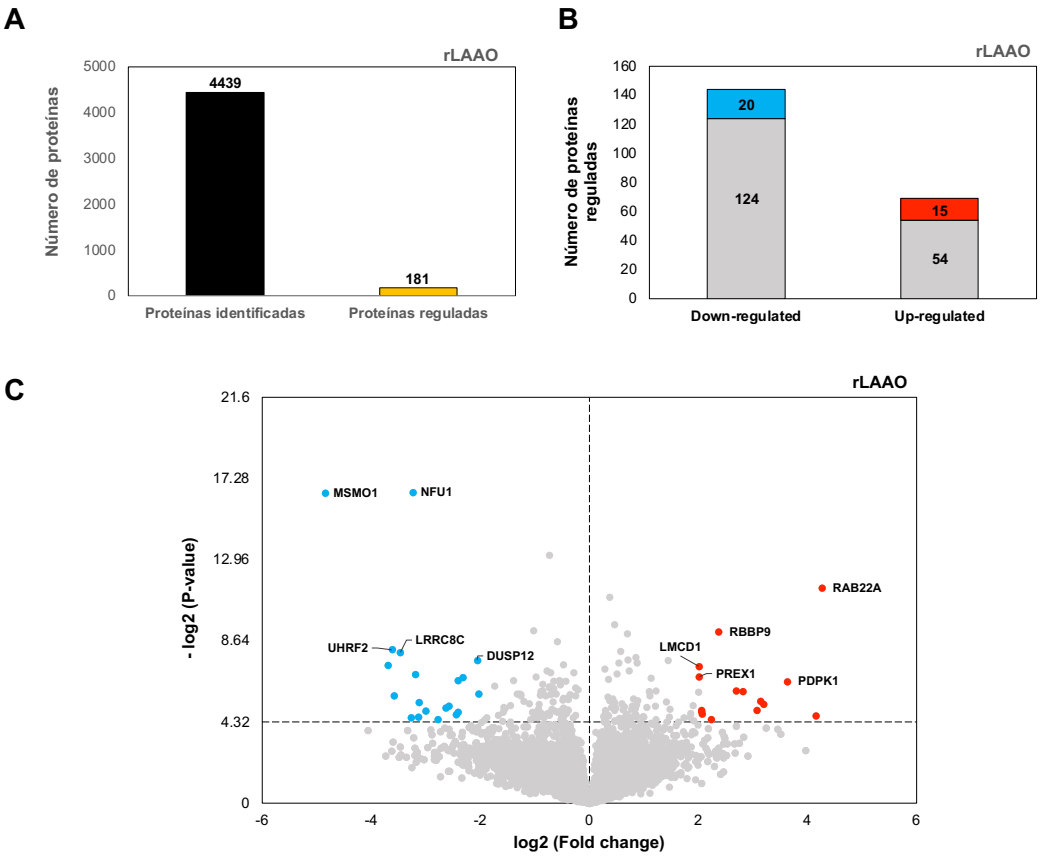


Figura 24: Proteoma das células endoteliais após tratamento com rLAAO. HDMECs foram tratadas com 2 EC_{50} da rLAAO por 3 horas e as proteínas celulares foram extraídas. As amostras foram processadas e submetidas a LC-MS/MS. **A) Número de proteínas identificadas.** Proteínas identificadas: todas as proteínas encontradas na análise; Proteínas reguladas: Proteínas que apresentam intensidade significativamente diferente do controle (valor p < 0,05). **B) Proteínas negativamente e positivamente reguladas.** *Down-regulated*: Proteínas com *fold-change* ≤ -2; *Up-regulated*: Proteínas com *fold-change* ≥ 2. **C) *Volcano-plot* das proteínas identificadas.** As proteínas com valor p < 0,05 (-log2 = 4,32) e *fold-change* ≤ -2 (em azul) ou ≥ 2 (em vermelho) estão destacadas. Os nomes dos genes de proteínas humanas reguladas com maior *score* também estão representados.

O nome do gene dessas proteínas que apresentaram *score* mais elevados foi utilizado para busca no banco de dados Uniprot (https://www.uniprot.org) e a **Tabela 11** apresenta os nomes dessas proteínas (sendo 5 delas *down-regulated* e 5 *up-regulated*).

Tabela 11: Identificação das principais proteínas reguladas nas células endoteliais após tratamento com rLAAO. O nome do gene das proteínas com *score* mais elevado foi utilizado para busca no banco de dados Uniprot.

Down regulated		
Número de acesso	**Gene**	**Nome da proteína**
Q9UMS0	NFU1	Iron-sulfur cluster scaffold homolog
Q15800	MSMO1	Methylsterol monooxygenase 1
Q96PU4	UHRF2	E3 ubiquitin-protein ligase
Q8TDW0	LRRC8C	Volume-regulated anion channel subunit
Q9UNI6	DUSP12	Dual specificity protein phosphatase 12
Up regulated		
Número de acesso	**Gene**	**Nome da proteína**
Q9UL26	RAB22A	Ras-related protein Rab-22A
O75884	RBBP9	Serine hydrolase
Q9NZU5	LMCD1	LIM and cysteine-rich domains protein 1
Q8TCU6	PREX1	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1 protein
O15530	PDPK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1

Em seguida, a lista de todas as proteínas identificadas foi organizada de forma ascendente em relação aos valores de *score* (ou seja, proteínas com maior *score* no topo da lista) e utilizada para análises de enriquecimento na plataforma GOrilla. Esse tipo de análise nos fornece indícios do que deve ser melhor investigado, uma vez que, baseado nas moléculas afetadas, estima-se quais vias podem ser importantes durante a ocorrência dos fenótipos de interesse.

Diferentes processos e funções parecem estar afetados nas células tratadas com rLAAO (**Tabela 12**). A análise de enriquecimento indicou que o processo de polimerização de filamentos de actina pode estar regulado, assim como a função de ligação à caderina. Isso corrobora os dados de imunofluorescência, uma vez que as HDMECs tratadas com rLAAO apresentaram alterações nas moléculas de actina e VE-caderina (**Figura 18**). Além disso, outro processo que possivelmente está regulado é o direcionamento e envio de proteínas para o retículo endoplasmático da célula. A regulação do reparo de fita dupla de DNA também aparece nessa busca.

É importante destacar que essas análises não apresentaram vias que fossem fortemente enriquecidas (com valor p muito baixo). Isso pode ser devido ao tempo de tratamento das células (de apenas 3 horas), que não foi suficiente para a ativação total de vias e processos celulares.

Tabela 12: Processos e funções celulares possivelmente afetados em células endoteliais tratadas com rLAAO. A lista de todas as proteínas (em ordem ascendente de *score*) identificadas em HDMECs tratadas com rLAAO foi utilizada para análises de enriquecimento na plataforma GOrilla e os resultados obtidos estão representados na tabela.

Processo Celular	P-value
Processo biossintético de macromolécula celular	1.16E-04
Polimerização de filamentos de Actina	1.58E-04
Regulação positiva de reparo de quebra de fita dupla	1.69E-04
Regulação negativa do processo apoptótico de células endoteliais	1.87E-04
Processo metabólico de peptídeos	2.30E-04
Desenvolvimento de células do tipo B	4.86E-04
Translação	4.91E-04
Estabelecimento da localização de proteínas no retículo endoplasmático	6.38E-04
Direcionamento de proteínas para o retículo endoplasmático	6.60E-04
Localização de proteínas no retículo endoplasmático	7.86E-04
Regulação do reparo de quebra de fita dupla	9.69E-04

Função celular	P-value
Ligação a RNA	1.12E-04
Ligação a ácido nucléico	1.28E-04
Ligação à Caderina	2.03E-04
Constituente estrutural do Ribossomo	2.53E-04
Ligação de fator de transcrição da RNA polimerase II	2.96E-04
Atividade de proteína quinase dependente de 3-fosfoinositídeo	4.86E-04
Ligação de fator de transcrição basal da RNA polimerase II	9.02E-04

Em seguida, foi analisado o proteoma das células endoteliais tratadas com a rLAAO^{R90A}. O número de proteínas identificadas foi o mesmo que nas células tratadas com rLAAO (4439). Porém, a quantidade de proteínas significativamente reguladas foi inferior. Apenas 104 proteínas foram identificadas nas HDMECs tratadas com rLAAO^{R90A} (**Figura 25A**), enquanto 181 foram encontradas para rLAAO. Isso sugere que a rLAAO apresenta um efeito mais expressivo nas células do que sua versão cataliticamente inativa.

Considerando os valores de *fold-change*, o número de proteínas *down-regulated* e *up-regulated* foi similar (25 e 24, respectivamente). Entretanto, apenas 3 das 25 proteínas negativamente reguladas apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Das 24 proteínas positivamente reguladas, 8 delas foram significativas (**Figura 25B**). Esses achados estão representados no *volcano plot*, onde

os nomes dos genes das proteínas humanas que apresentam maior *score* também foram representados (**Figura 25C**).

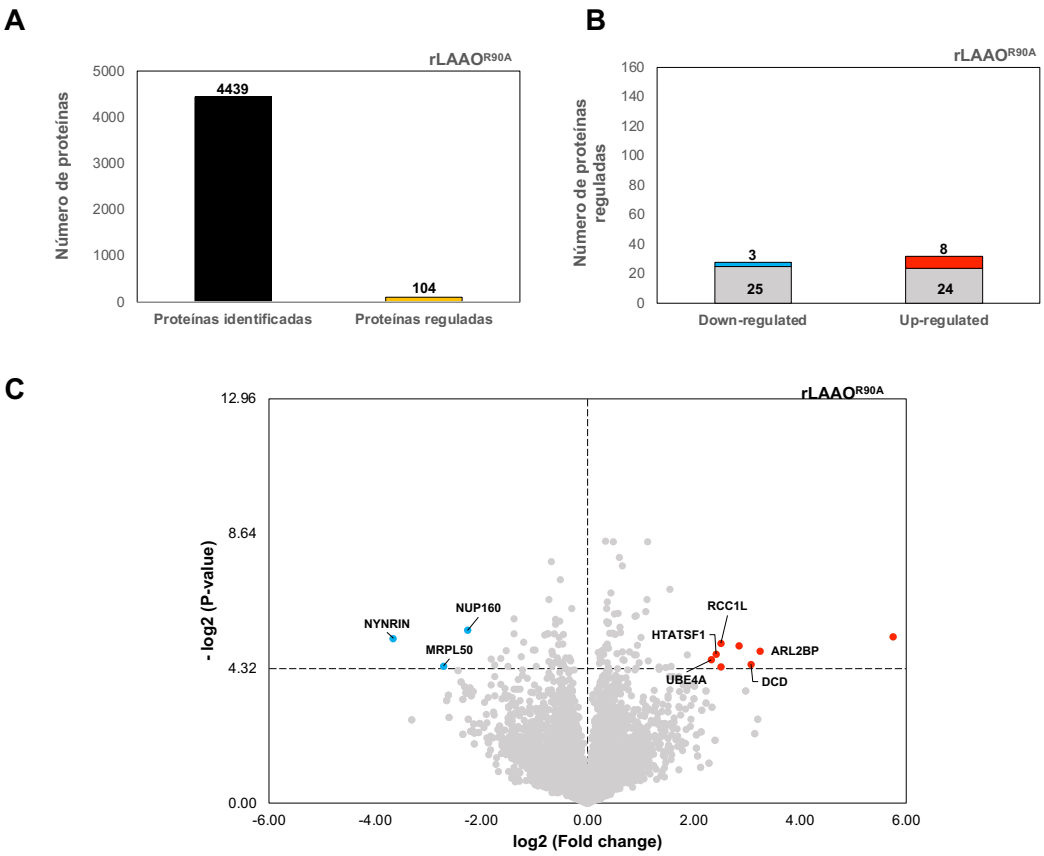


Figura 25: Proteoma das células endoteliais após tratamento com rLAAO^{R90A}. HDMECs foram tratadas com 2 EC_{50} da rLAAO^{R90A} por 3 horas e as proteínas celulares foram extraídas. As amostras foram processadas e submetidas a LC-MS/MS. **A) Número de proteínas identificadas.** Proteínas identificadas: todas as proteínas encontradas na análise; Proteínas reguladas: Proteínas que apresentam intensidade significativamente diferente do controle (valor p < 0,05); **B) Proteínas negativamente e positivamente reguladas:** *Down-regulated*: Proteínas com *fold-change* ≤ -2; *Up-regulated*: Proteínas com *fold-change* ≥ 2. **C) *Volcano-plot* das proteínas identificadas.** As proteínas com valor p < 0,05 (-log2 = 4,32) e *fold-change* ≤ -2 (em azul) ou ≥ 2 (em vermelho) estão destacadas. Os nomes dos genes de proteínas humanas reguladas com maior *score* também estão representados.

A **Tabela 13** apresenta os nomes das 8 principais proteínas reguladas após o tratamento das células endoteliais com rLAAO^{R90A} (3 delas *down-regulated* e 5 *up-regulated*).

Tabela 13: Identificação das principais proteínas reguladas nas células endoteliais após tratamento com rLAAO^{R90A}. O nome do gene das proteínas com *score* mais elevado foi utilizado para busca no banco de dados Uniprot.

Down regulated		
Número de acesso	**Gene**	**Nome da proteína**
Q12769	NUP160	Nuclear pore complex protein
Q9P2P1	NYNRIN	Protein NYNRIN
Q8N5N7	MRPL50	39S ribosomal protein L50
Up regulated		
Número de acesso	**Gene**	**Nome da proteína**
Q96I51	RCC1L	RCC1-like G exchanging factor-like protein
Q9Y2Y0	ARL2BP	ADP-ribosylation factor-like protein 2-binding protein
O43719	HTATSF1	HIV Tat-specific factor 1
Q14139	UBE4A	Ubiquitin conjugation factor
P81605	DCD	Dermcidin

As análises de enriquecimento para essas células demonstraram menos processos possivelmente regulados do que para as células tratadas com rLAAO. A regulação do dano ao DNA e a função de ligação ao DNA são vias possivelmente afetadas. Além disso, a atividade de geranil-geranilação, um tipo de modificação pós-traducional de lipídeos em proteínas, parece estar regulada quando as HDMECs são tratadas com rLAAO^{R90A} (**Tabela 14**). Entretanto, essa análise indicou processos que possivelmente não estão associados a esse tipo celular, como regulação de remodelamento ósseo. Conforme mencionado anteriormente, o enriquecimento das vias encontradas não demonstrou valor p muito baixo, o que pode levar à identificação equivocada de processos não-relacionados.

Tabela 14: Processos e funções celulares possivelmente afetados em células endoteliais tratadas com rLAAO^{R90A}. A lista de todas as proteínas (em ordem ascendente de *score*) identificadas em HDMECs tratadas com rLAAO^{R90A} foi utilizada para análises de enriquecimento na plataforma GOrilla e os resultados obtidos estão representados na tabela.

Processo Celular	P-value
Regulação do dano de DNA	7.88E-05
Regulação negativa do remodelamento tecidual	2.87E-04
Regulação negativa da reabsorção óssea	2.87E-04
Regulação negativa do remodelamento ósseo	2.87E-04
Geranil-geranilação de proteínas	5.05E-04
Fusão da membrana mitocondrial	7.29E-04

Função celular	P-value
Ligação ao DNA	1.13E-04
Ligação a ácido nucléico	1.63E-04
Atividade de Glicerol-3-fosfatase	2.78E-04
Atividade da proteína geranil-geranil transferase	5.05E-04
Atividade de Rab geranil-geranil transferase	5.05E-04
Atividade da proteína preniltransferase	5.05E-04
Ligação de compostos heterocíclicos	8.02E-04
Atividade catalítica (em proteínas)	9.11E-04

Queratinócitos

Em seguida, o proteoma de NHEKs tratados com a LAAO recombinante foi analisado, da mesma forma que foi realizado para as células endoteliais. Primeiramente, em relação às células tratadas com a rLAAO, foram identificadas 4811 proteínas, das quais 120 foram significativamente reguladas, quando comparadas às células que não receberam tratamento (**Figura 26A**). O *fold-change* de todas as proteínas identificadas foi calculado, e 120 delas estavam reguladas negativamente (*fold-change* $\leq$ -2). Entretanto, dessas 120, apenas 29 foram significativas (valor p < 0,05). Por outro lado, um número expressivo de proteínas (685) foi regulado positivamente (*fold-change* $\geq$ 2). Dentre elas, 64 foram consideradas significativas, quando comparadas ao controle (**Figura 26B**). Os dados foram plotados no *volcano plot*, onde estão também representados os nomes dos genes referentes às 10 proteínas que apresentaram maior *score* (valor p x *fold-change*) (**Figura 26C**).

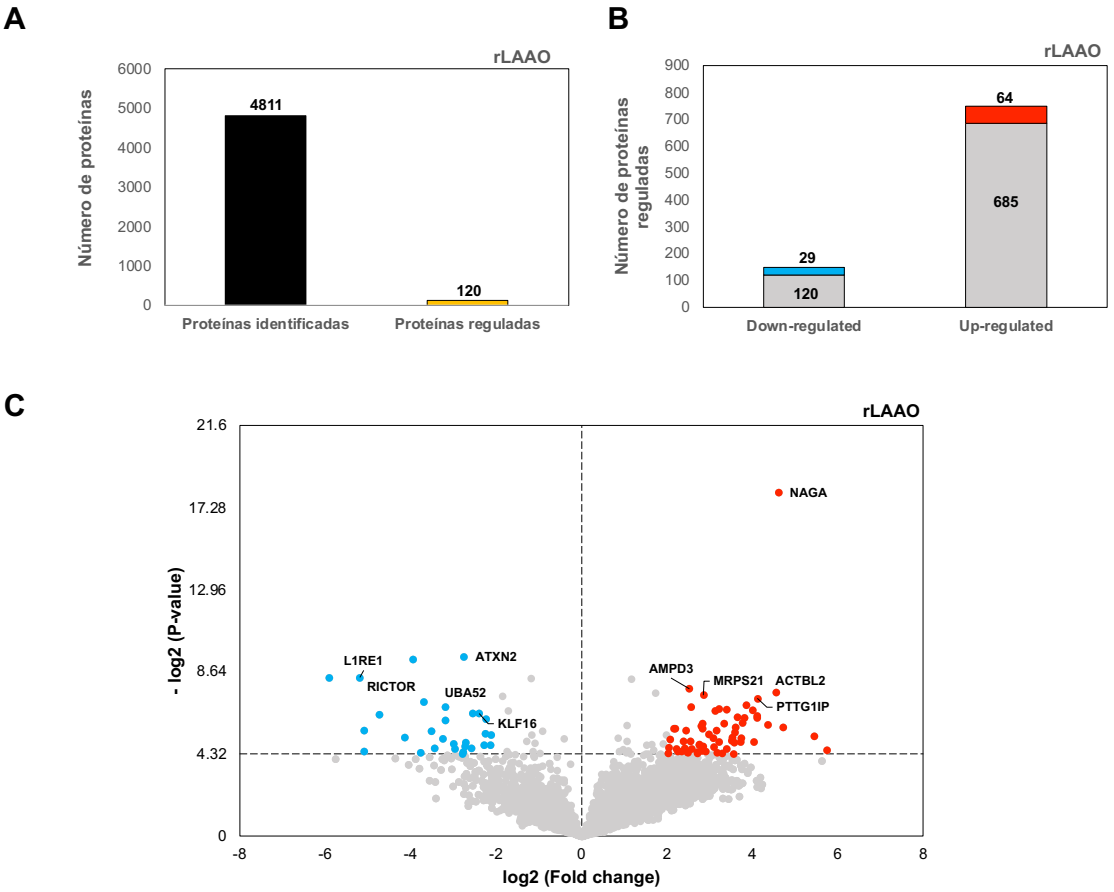


Figura 26: Proteoma dos queratinócitos após tratamento com rLAAO. NHEKs foram tratados com 2 EC_{50} da rLAAO por 3 horas e as proteínas celulares foram extraídas. As amostras foram processadas e submetidas a LC-MS/MS. **A) Número de proteínas identificadas.** Proteínas identificadas: todas as proteínas encontradas na análise; Proteínas reguladas: Proteínas que apresentam intensidade significativamente diferente do controle (valor $p < 0,05$). **B) Proteínas negativamente e positivamente reguladas:** *Down-regulated*: Proteínas com *fold-change* ≤ -2; *Up-regulated*: Proteínas com *fold-change* ≥ 2. **C) *Volcano-plot* das proteínas identificadas.** As proteínas com valor $p < 0,05$ ($-\log2 = 4,32$) e *fold-change* ≤ -2 (em azul) ou ≥ 2 (em vermelho) estão destacadas. Os nomes dos genes de proteínas humanas reguladas com maior *score* também estão representados.

A **Tabela 15** relaciona as 10 proteínas de maior *score*, apresentado seu nome, conforme identificado por busca no Uniprot.

Tabela 15: Identificação das principais proteínas reguladas nos queratinócitos após tratamento com rLAAO. O nome do gene das proteínas com *score* mais elevado foi utilizado para busca no banco de dados Uniprot.

Down-regulated		
Número de acesso	**Gene**	**Nome da proteína**
Q99700	ATXN2	Ataxin-2
Q9UN81	L1RE1	LINE-1 retrotransposable element ORF1 protein
Q6R327	RICTOR	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
P62987	UBA52	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40
Q9BXK1	KLF16	Krueppel-like factor 16
Up-regulated		
Número de acesso	**Gene**	**Nome da proteína**
P17050	NAGA	Alpha-N-acetylgalactosaminidase
Q01432	AMPD3	AMP deaminase 3
Q562R1	ACTBL2	Beta-actin-like protein 2
P82921	MRPS21	28S ribosomal protein S21
P53801	PTTG1IP	Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein

As análises de enriquecimento dos NHEKs tratados com rLAAO indicaram diferentes processos e funções possivelmente regulados e, pode-se destacar os processos catabólicos envolvendo lipídeos, tais como fosfolipídeos, glicerofosfolipídeos e monoacilgliceróis. Em relação às funções celulares que podem ser afetadas, ressalta-se principalmente atividades de enzimas do tipo deaminase e hidrolase, por exemplo (**Tabela 16**).

Tabela 16: Processos e funções celulares possivelmente afetados em queratinócitos tratados com rLAAO. A lista de todas as proteínas (em ordem ascendente de *score*) identificadas em NHEKs tratados com rLAAO foi utilizada para análises de enriquecimento na plataforma GOrilla e os resultados obtidos estão representados na tabela.

Processo Celular	P-value	Função celular	P-value
Resgate de IMP	1.92E-04	Atividade de adenosina-fosfato deaminase	3.43E-05
Processo catabólico de mRNA transcrito no núcleo	2.19E-04	Atividade de AMP deaminase	3.43E-05
Regulação negativa de permeabilidade vascular	4.20E-04	Atividade de alfa-N-acetilgalactosaminidase	2.30E-04
Depalmitoilação de macromoléculas	6.81E-04	Ligação a íons	3.21E-04
Processo catabólico de fosfolipídeos	7.73E-04	Atividade de transferase intramolecular	4.87E-04
Resposta ao fator de crescimento de fibroblastos	8.40E-04	Atividade palmitoin-(proteína) hidrolase	6.81E-04
Resposta celular ao estímulo do fator de crescimento de fibroblastos	8.40E-04	Atividade palmitoin hidrolase	6.81E-04
Processo catabólico de glicerofosfolipídeos	8.43E-04	Atividade alfa-galactosidase	9.01E-04
Processo metabólico de monoacilgliceróis	9.08E-04	Atividade de fosfatase quinase JUN	9.19E-04

Nos queratinócitos tratados com a rLAAO^{R90A}, 4811 proteínas também foram identificadas, porém, entre elas, apenas 95 são reguladas significativamente ($p < 0,05$) (**Figura 27A**). Entre as 90 proteínas *down-regulated* (*fold-change* ≤ -2), 15 delas são significativas e, entre as 643 positivamente reguladas, 54 apresentam valor p menor que 0,05 (**Figura 27B**). Novamente, assim como observado para as células endoteliais, o número de proteínas significativamente reguladas nos queratinócitos tratados com a rLAAO^{R90A} foi menor do que quando as células são tratadas com a rLAAO. No *volcano-plot,* todas as proteínas identificadas podem ser visualizadas, bem como o nome do gene codificante de proteínas que apresentaram maiores valores de *score* (**Figura 27C**).

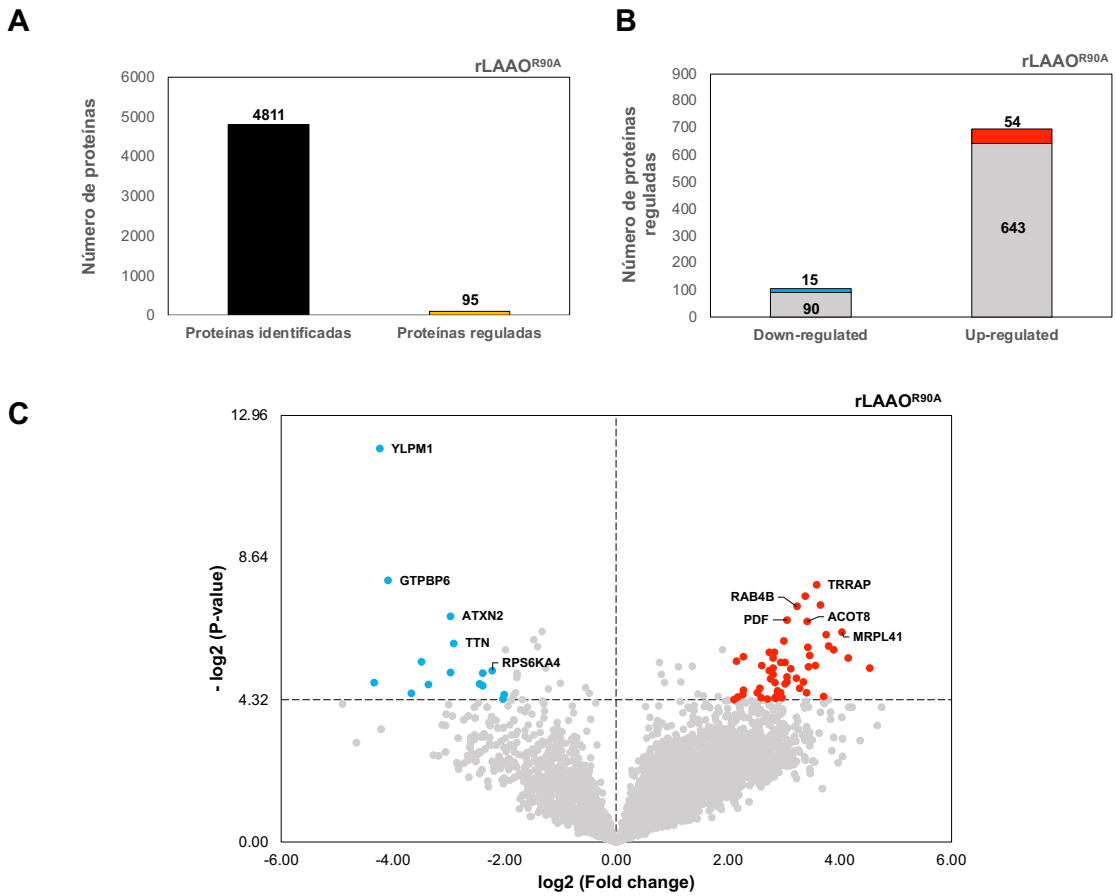


Figura 27: Proteoma de queratinócitos após tratamento com rLAAO^{R90A}. NHEKs foram tratados com 2 EC_{50} da rLAAO^{R90A} por 3 horas e as proteínas celulares foram extraídas. As amostras foram processadas e submetidas a LC-MS/MS. **A) Número de proteínas identificadas.** Proteínas identificadas: todas as proteínas encontradas na análise; Proteínas reguladas: Proteínas que apresentam intensidade significativamente diferente do controle (valor p < 0,05). **B) Proteínas negativamente e positivamente reguladas:** *Down-regulated*: Proteínas com *fold-change* ≤ -2; *Up-regulated*: Proteínas com *fold-change* ≥ 2. **C) *Volcano-plot* das proteínas identificadas.** As proteínas com valor p < 0,05 (-log2 = 4,32) e *fold-change* ≤ -2 (em azul) ou ≥ 2 (em vermelho) estão destacadas. Os nomes dos genes de proteínas humanas reguladas com maior *score* também estão representados.

Na **Tabela 17** as proteínas com *score* mais elevado estão identificadas, de acordo com busca no Uniprot.

Tabela 17: Identificação das principais proteínas reguladas nos queratinócitos após tratamento com rLAAO^{R90A}. O nome do gene das proteínas com *score* mais elevado foi utilizado para busca no banco de dados Uniprot.

Down-regulated		
Número de acesso	**Gene**	**Nome da proteína**
P49750	YLPM1	YLP motif-containing protein 1
O43824	GTPBP6	Putative GTP-binding protein 6
Q99700	ATXN2	Ataxin-2
Q8WZ42	TTN	Titin
O75676	RPS6KA4	Ribosomal protein S6 kinase alpha-4
Up-regulated		
Número de acesso	**Gene**	**Nome da proteína**
Q9Y4A5	TRRAP	Transformation/transcription domain-associated protein
P61018	RAB4B	Ras-related protein Rab-4B
Q9HBH1	PDF	Peptide deformylase
O14734	ACOT8	Acyl-coenzyme A thioesterase 8
Q8IXM3	MRPL41	39S ribosomal protein L41

O número de processos e funções encontrados nas análises de enriquecimento também foi menor do que àqueles relacionados ao tratamento com a rLAAO. Entretanto, aparentemente a rLAAO^{R90A} também pode estar envolvida na regulação da ligação a lipídeos. Interessantemente, a regulação da acetilação de histonas também parece ser um processo afetado nas células tratadas, assim como a ligação à membrana de peroxissomos (**Tabela 18**).

Tabela 18: Processos e funções celulares possivelmente afetados em queratinócitos tratados com rLAAO^{R90A}. A lista de todas as proteínas (em ordem ascendente de *score*) identificadas em NHEKs tratados com rLAAO foi utilizada para análises de enriquecimento na plataforma GOrilla e os resultados obtidos estão representados na tabela.

Processo Celular	P-value	Função celular	P-value
Regulação da ligação a lipídeos	2.30E-04	Ligação à membrana de peroxissomos	2.30E-04
Regulação negativa da ligação a lipídeos	2.30E-04	Ligação à vitamina D3	6.89E-04
Regulação negativa da acetilação da Histona H3-K27	4.59E-04	Ligação à calcidiol	6.89E-04
Regulação da acetilação da Histona H3-K27	4.59E-04	Ligação a vitamina D	6.89E-04

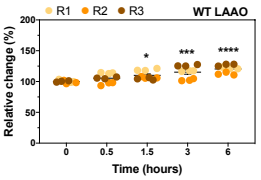
4.3.2. *Análise de aminoácidos e aminas biogênicas em células humanas tratadas com LAAO recombinante*

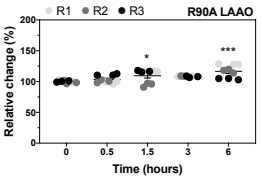
Como aminoácidos e compostos que contêm o grupamento amino são geralmente modulados sob diferentes condições patológicas (GRAY et al., 2017b), esse grupo de substâncias foi um dos escolhidos para ser investigado neste trabalho. Ambos os tipos celulares (células endoteliais e queratinócitos) foram tratados com a rLAAO ou rLAAO^{R90A} por diferentes períodos, e o sobrenadante ou o lisado celular foram submetidos a UPLC-MS/MS. Os dados foram coletados e analisados para determinação dos compostos potencialmente regulados. A **Figura 10** resume o fluxo de trabalho empregado nessa etapa do estudo e todos os compostos que poderiam ser identificados estão listados na **Tabela 5**, na seção 3.12 desse trabalho.

Células endoteliais

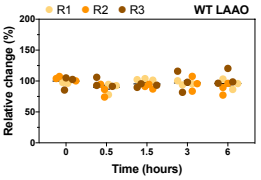
Inicialmente, foram analisadas as amostras do sobrenadante celular, a fim de identificar possíveis metabólitos que poderiam ter sido secretados para o meio de cultura. A porcentagem de cada composto foi calculada em relação às células não-tratadas e as mudanças mais significativas foram causadas pelo tratamento com a rLAAO. Considerando os aminoácidos analisados, somente três deles apresentaram alguma alteração (**Figura 28**). A concentração de alanina aumentou ao longo do tempo, a partir de 1,5 horas de tratamento, em relação ao controle, enquanto os níveis de fenilalanina e tirosina reduziram significativamente em todos os tempos testados. Já nas células tratadas com a rLAAO^{R90A}, as variações não foram tão expressivas, porém a concentração de alanina também aumentou após 1,5 horas de tratamento, enquanto a concentração de lisina diminuiu quando as células foram tratadas por 3 horas.

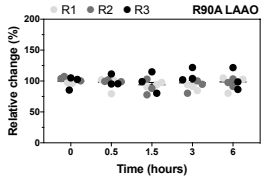
ALANINA



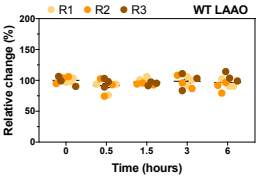


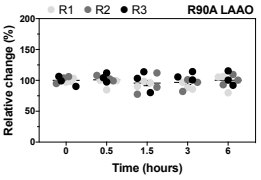
VALINA



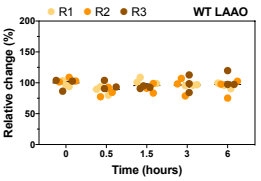


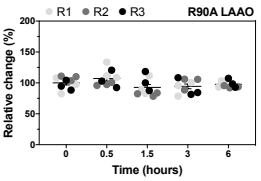
ISOLEUCINA



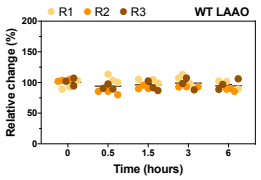


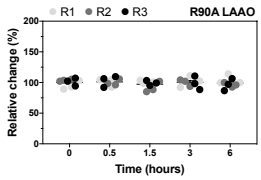
LEUCINA



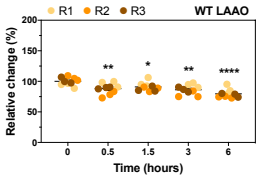


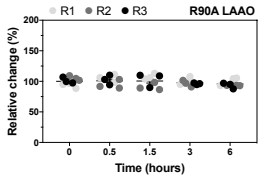
METIONINA



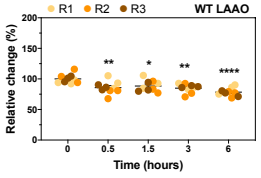


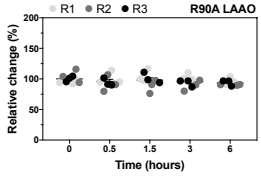
FENILALANINA



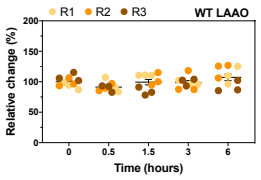


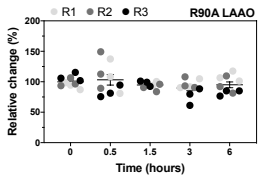
TIROSINA



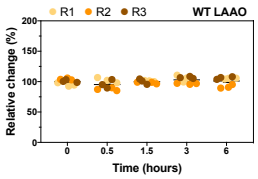


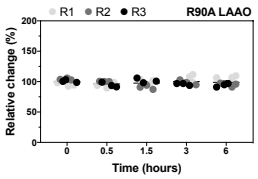
ARGININA



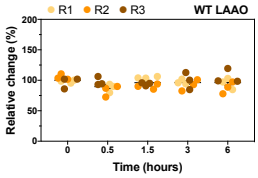


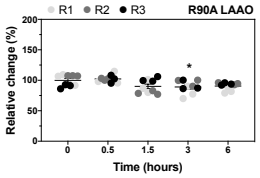
HISTIDINA



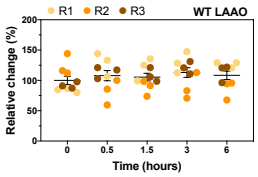


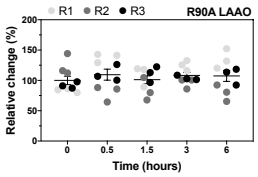
LISINA



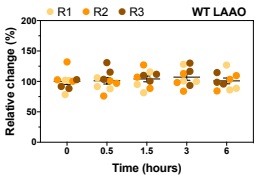


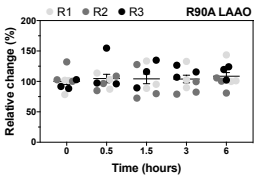
ÁCIDO ASPARTIDO



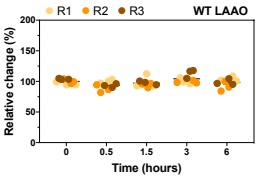


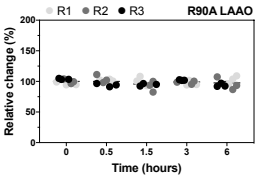
ÁCIDO GLUTÂMICO



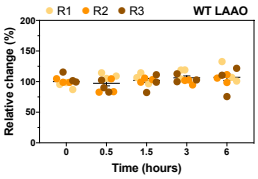


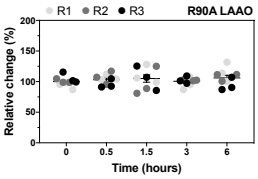
SERINA



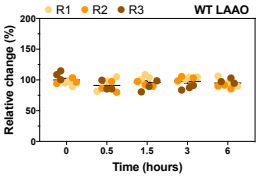


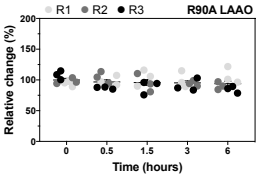
TREONINA



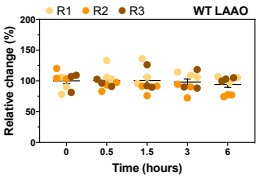


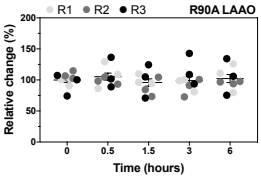
ASPARAGINA





GLUTAMINA





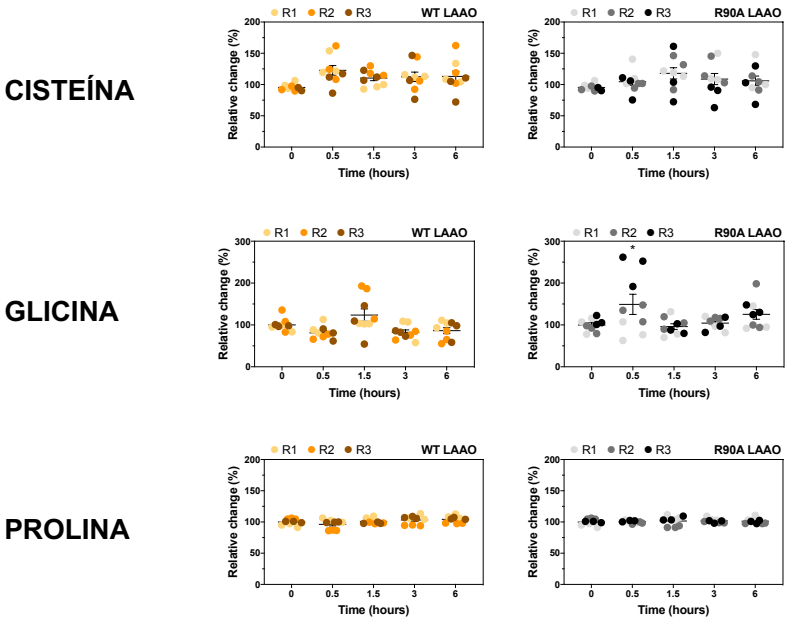


Figura 28: Quantificação dos aminoácidos identificados por UPLC-MS/MS no sobrenadante de células endoteliais. HDMECs foram tratadas com 2 EC_{50} de rLAAO ou $rLAAO^{R90A}$ por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. O sobrenadante foi coletado, as amostras derivatizadas utilizando o reagente AccQTag Ultra (Waters) e submetidas a análises por UPLC-MS/MS, utilizando uma abordagem do tipo *targeted*. Os dados foram coletados, normalizados e analisados estatisticamente por one-way ANOVA (valor p < 0,05). **R1, R2 e R3:** replicatas 1, 2 e 3, respectivamente. **WT LAAO:** rLAAO. **R90A LAAO:** $rLAAO^{R90A}$.

Em seguida, focando na rLAAO, os dados foram analisados na plataforma MetaboAnalyst, utilizando a ferramenta *Enrichment Analysis*. Esse tipo de avaliação analisa se o aumento ou diminuição de determinados metabólitos está relacionado com alguma via conhecida do metabolismo e, portanto, fornece indícios de que determinado processo é regulado sob as condições testadas. Sendo assim, uma tabela contendo as porcentagens relativas de cada aminoácido dos grupos experimentais de interesse (não-tratado e rLAAO) no tempo de tratamento de 3 horas, foi submetida para análise. No gráfico gerado, as vias são organizadas em relação ao valor p e a taxa de enriquecimento, sendo que quanto maior é a diferença estatística (menor valor p), maior é a intensidade de cor daquele ponto. Além disso, quanto mais aquela via está enriquecida (maior quantidade de termos metabólitos relacionados), maior é o tamanho do ponto.

Diferentes vias foram identificadas e a maior parte das que apresentaram diferença significativa (valor p < 0,05), está relacionada ao metabolismo de aminoácidos, tais como selenoaminoácidos, fenilalanina, tirosina, alanina e glutamato, por exemplo. Essa análise também sugere a regulação da síntese de catecolaminas e hormônio tireoidiano. Além disso, a via de metabolismo da glutationa, importante molécula antioxidante, também parece ser regulada quando as células são tratadas com a rLAAO (**Figura 29**).

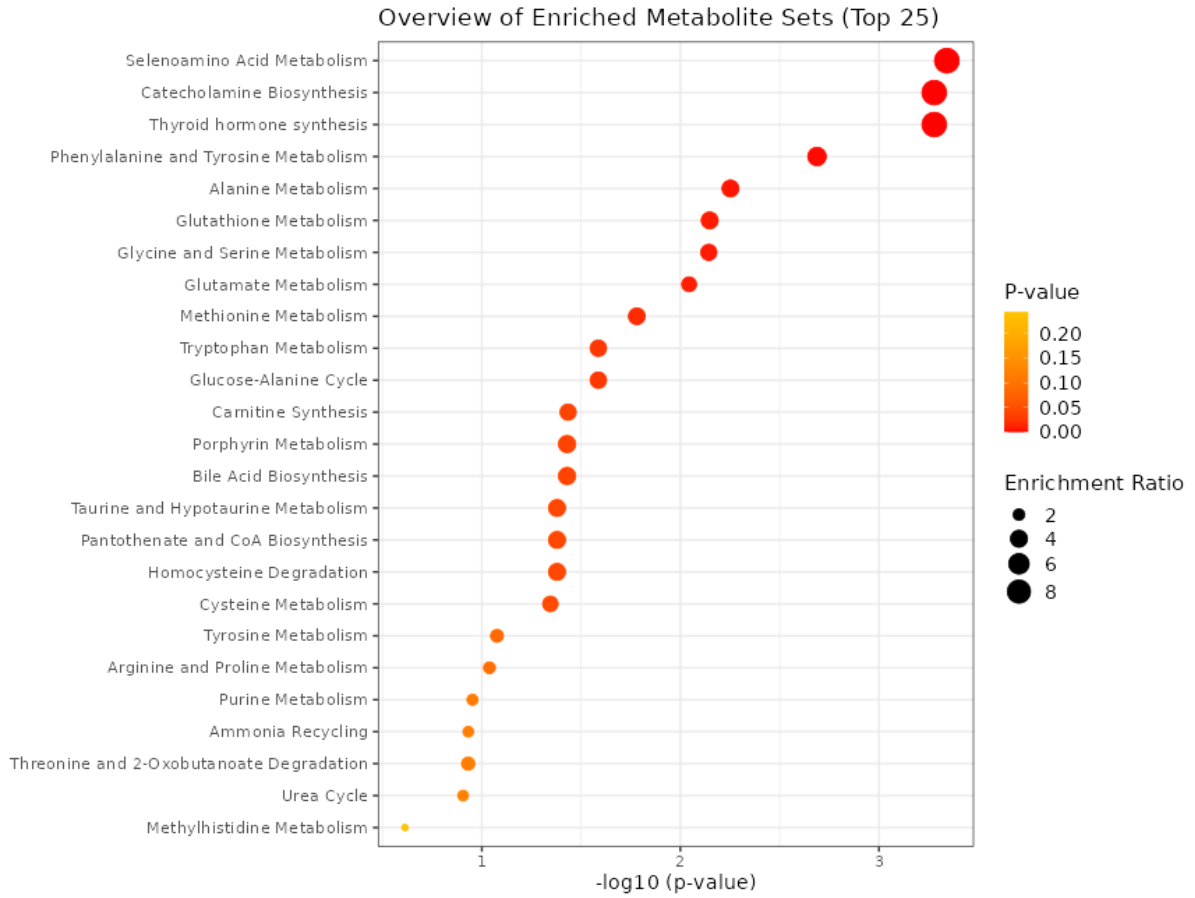


Figura 29: Análise de enriquecimento de vias metabólicas no sobrenadante de células endoteliais após tratamento com rLAAO. Os valores de porcentagem de cada aminoácido identificado nas análises de UPLC-MS/MS em HDMECs tratadas com rLAAO por 3 horas foram submetidos a análise de enriquecimento na plataforma MetaboAnalyst, integrada ao banco de dados SMPDB. As porcentagens foram comparadas às das células não-tratadas (valor p < 0,05 foi considerado como significativo).

De acordo com dados da literatura, a LAAO apresenta como substratos preferenciais aminoácidos hidrofóbicos e/ou que contêm anel aromático (COSTA et al., 2018b). Dessa forma, para melhor visualizar as diferenças nos níveis desses aminoácidos entre as células não-tradadas e as células tratadas com rLAAO, um *heatmap* foi construído no MetaboAnalyst. Os aminoácidos metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina e histidina, descritos previamente por Costa *et. al* (2018) como aminoácidos preferenciais da LAAO, foram selecionados para fins comparativos. Após 3 horas de tratamento, é possível observar uma tendência à diminuição dos níveis desses aminoácidos quando comparado ao grupo controle. Quando aminoácidos classificados como não-preferenciais são selecionados, essa diferença é menor, visto que os níveis são mais similares entre os dois grupos (**Figura 30**).

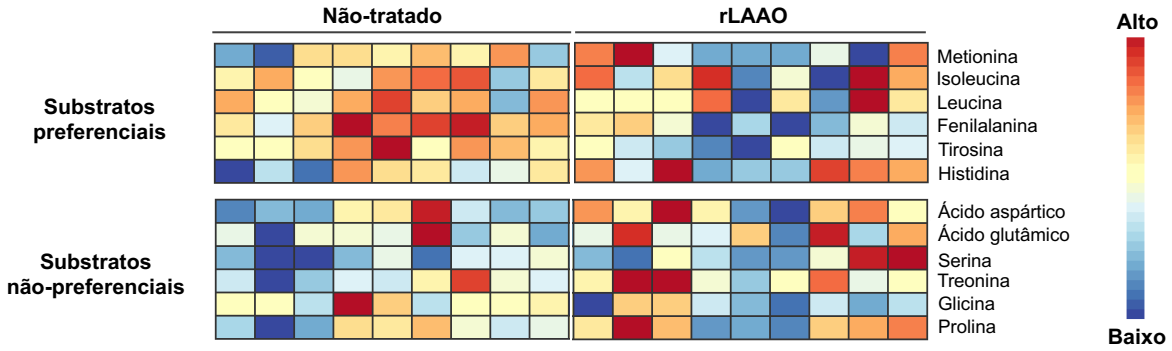
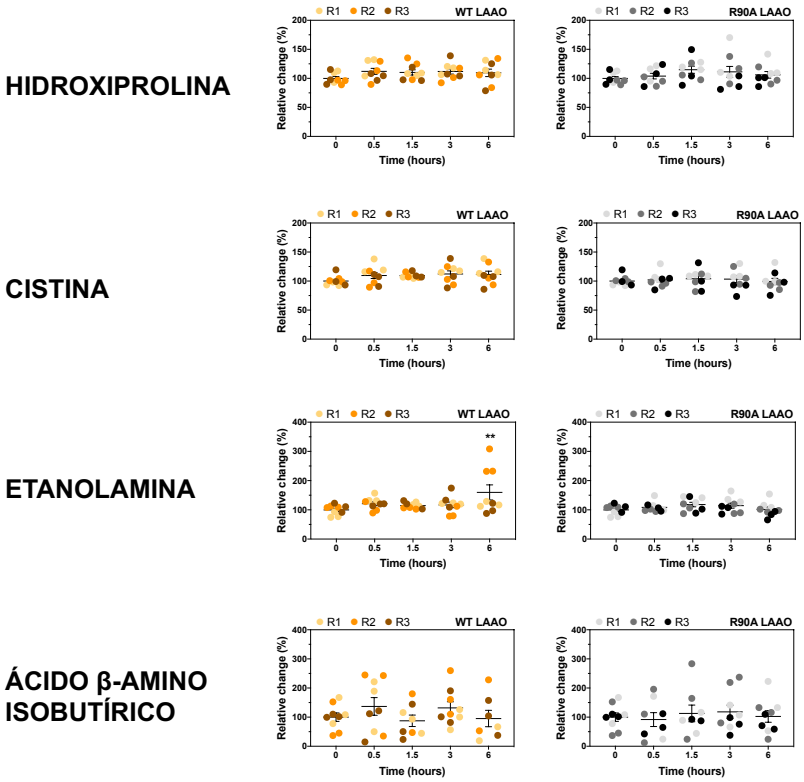


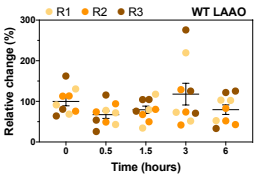
Figura 30: Comparação dos níveis de aminoácidos descritos como substratos preferenciais ou não da LAAO. *Heatmap* construído na plataforma MetaboAnalyst, selecionando os aminoácidos de interesse. **Não tratado:** sobrenadante de HDMECs que não receberam nenhum tratamento. **rLAAO:** sobrenadante de HDMECs tratadas com 2 EC_{50} da rLAAO por 3 horas. Baixos níveis dos metabólitos estão representados por cores próximas ao azul, enquanto níveis mais altos são representados por cores próximas ao vermelho. Cada coluna indica uma replicata experimental de cada uma das replicatas biológicas (n=3).

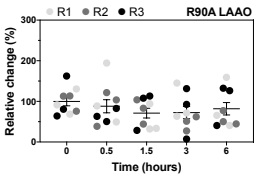
Além dos aminoácidos, vários outros compostos que contêm aminas biogênicas foram identificados através dessa técnica. Embora os efeitos dos

tratamentos não tenham sido muito expressivos, os sobrenadantes das células tratadas com rLAAO apresentaram mais compostos regulados do que àqueles tratados com rLAAO^{R90A}. De forma geral, a rLAAO levou ao aumento da concentração de etanolamina, ornitina, fosfoserina, sarcosina e taurina. A rLAAO^{R90A}, por sua vez, aumentou os níveis de homoserina, ornitina, sarcosina e triptamina (**Figura 31**).

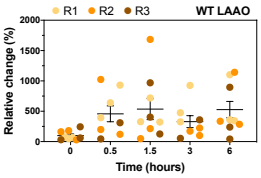


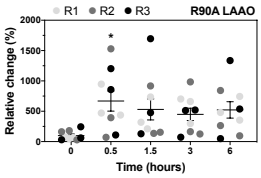
CITRULINA



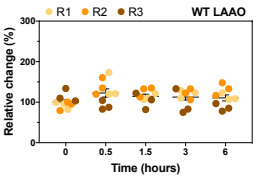


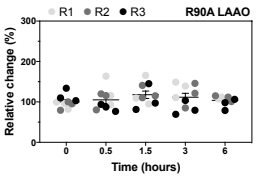
HOMOSERINA



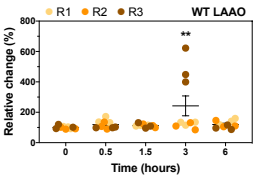


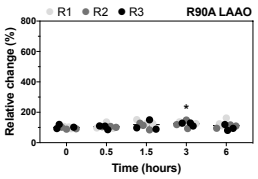
HIDROXILISINA



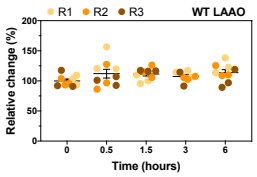


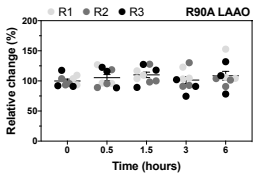
ORNITINA



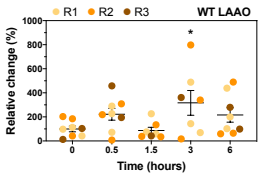


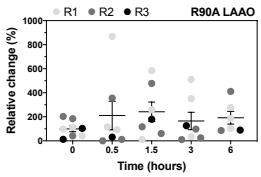
ÁCIDO α-AMINOBUTÍRICO



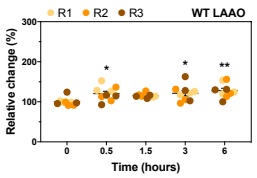


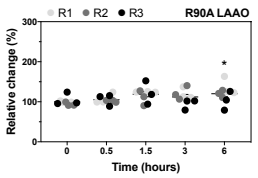
FOSFOSERINA



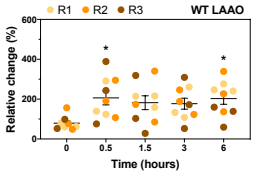


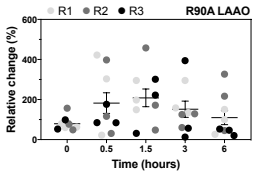
SARCOSINA



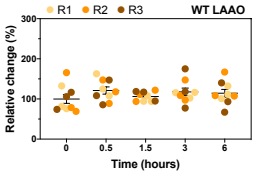


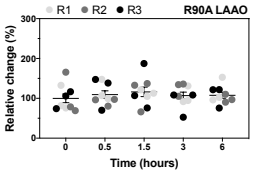
TAURINA



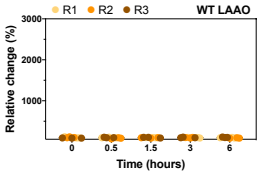


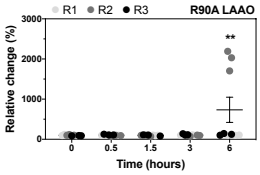
ÁCIDO γ-AMINOBUTÍRICO



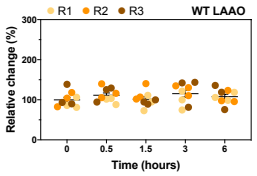


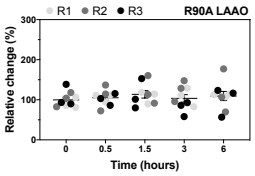
TRIPTAMINA



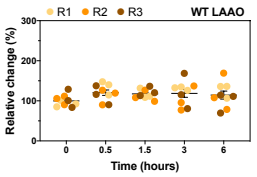


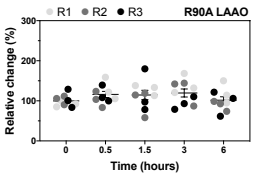
ALANTOÍNA



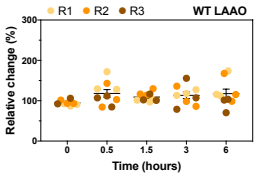


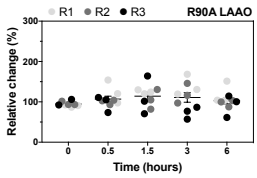
LNMMA



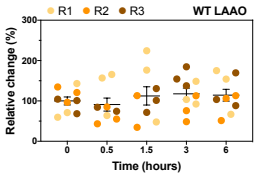


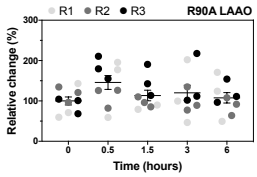
OCTOPAMINA



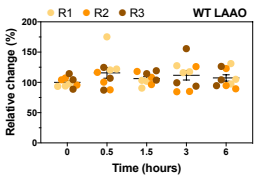


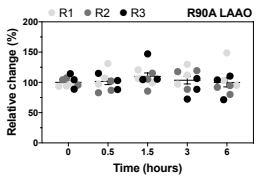
TIRAMINA



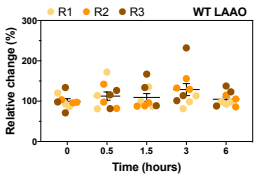


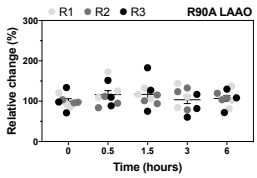
GLICILGLICINA





METILAMINA





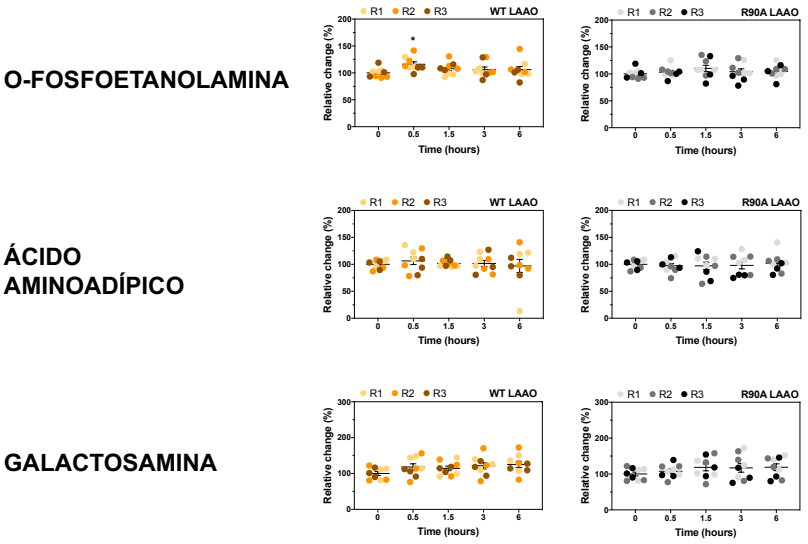


Figura 31: Quantificação de compostos com aminas biogênicas identificados por UPLC-MS/MS no sobrenadante de células endoteliais. HDMECs foram tratadas com 2 EC_{50} de rLAAO ou $rLAAO^{R90A}$ por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. O sobrenadante foi coletado, as amostras derivatizadas utilizando o reagente AccQTag Ultra (Waters) e submetidas a análises por UPLC-MS/MS, utilizando uma abordagem do tipo *targeted*. Os dados foram coletados, normalizados e analisados estatisticamente por one-way ANOVA (valor $p < 0,05$). **R1, R2 e R3:** replicatas 1, 2 e 3, respectivamente. **WT LAAO:** rLAAO. **R90A LAAO:** $rLAAO^{R90A}$.

As análises de enriquecimento das amostras de sobrenadante das células tratadas com rLAAO indicam uma regulação do metabolismo de aminoácidos, como observado anteriormente, e no metabolismo de taurina, outro composto descrito como antioxidante. Além disso, essa análise também aponta para uma regulação na biossíntese de lipídeos, como fosfolipídeos, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (**Figura 32**).

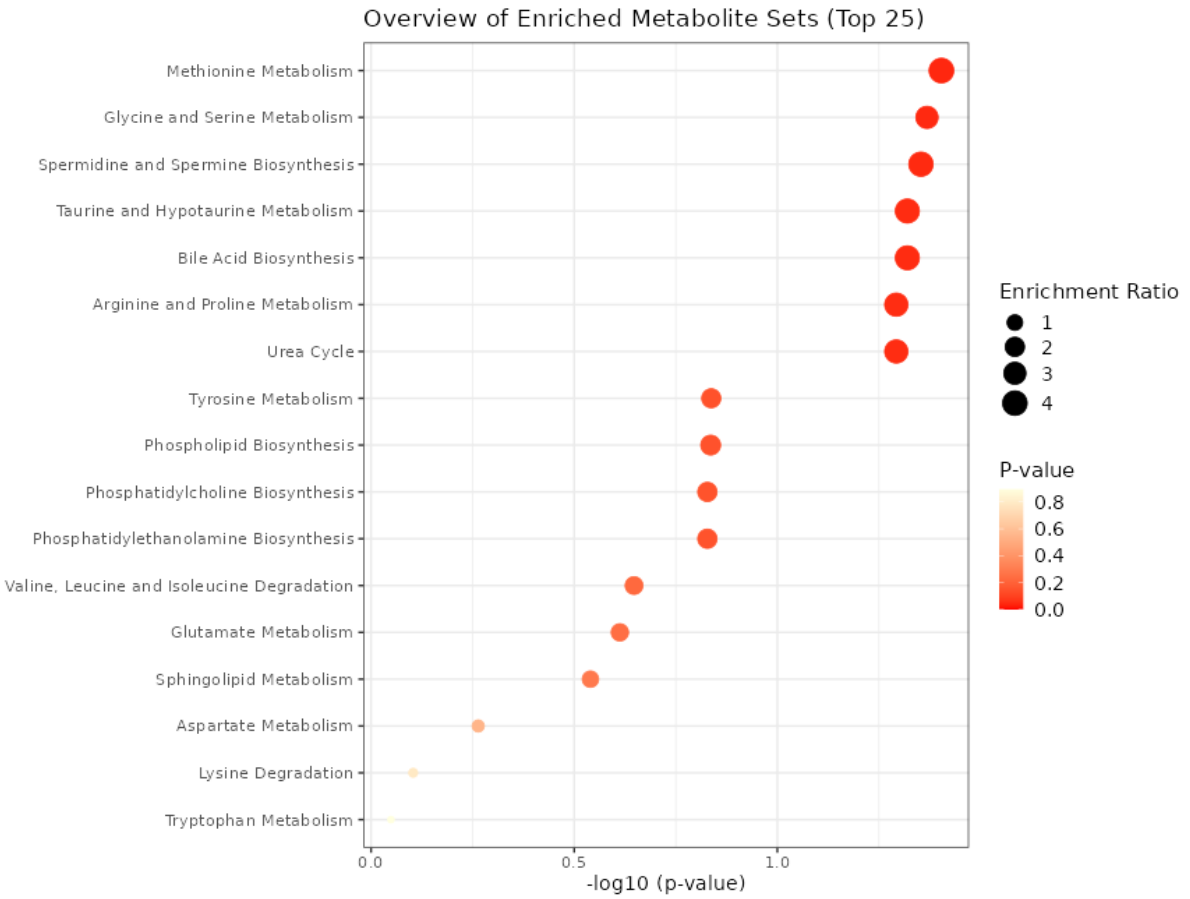


Figura 32: Análise de enriquecimento de vias metabólicas no sobrenadante de células endoteliais após tratamento com rLAAO. Os valores de porcentagem de cada componente identificado nas análises de UPLC-MS/MS em HDMECs tratadas com rLAAO por 3 horas foram submetidos a análise de enriquecimento na plataforma MetaboAnalyst, integrada ao banco de dados SMPDB. As porcentagens foram comparadas às das células não-tratadas (valor p < 0,05 foi considerado como significativo).

Em seguida, cinco componentes classificados pelo MetaboAnalyst como mais significativos (com menor valor p), sarcosina, homoserina, ornitina, taurina e hidroxiprolina, foram selecionados para construção de um *heatmap*. Observou-se que seus níveis no sobrenadante de células tratadas com rLAAO estavam relativamente aumentados, quando comparados aos níveis de células não-tratadas (**Figura 33**). Uma triplicada de um dos ensaios está mais elevada do que as demais, porém a variação dos níveis dos compostos no grupo rLAAO ainda é um pouco maior do que no grupo não-tratado.

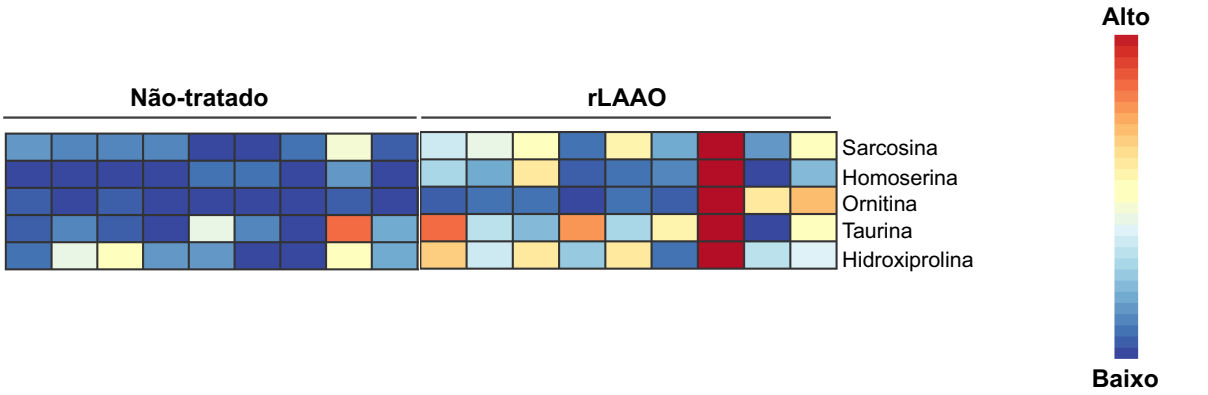
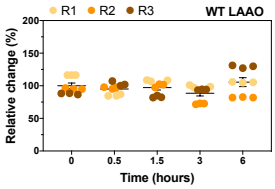
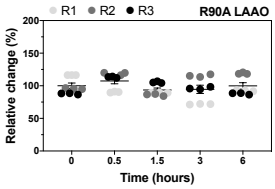


Figura 33: Comparação dos níveis de compostos com aminas biogênicas no sobrenadante de células endoteliais. *Heatmap* construído na plataforma MetaboAnalyst, selecionando os compostos de interesse. **Não tratado:** Sobrenadante de HDMECs que não receberam nenhum tratamento. **rLAAO:** Sobrenadante de HDMECs tratadas com 2 EC_{50} da rLAAO por 3 horas. Baixos níveis dos metabólitos estão representados por cores próximas ao azul, enquanto níveis mais altos são representados por cores próximas ao vermelho. Cada coluna indica uma replicata experimental de cada uma das replicatas biológicas (n=3).

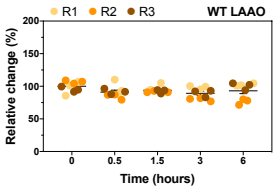
Partindo para as análises de amostras do lisado celular das HDMECs, observa-se efeitos similares ao que foi encontrado para as amostras do sobrenadante: os níveis de fenilalanina e tirosina nessas células estão significativamente reduzidos, assim como as concentrações de metionina e lisina. Entretanto, nessas amostras não foi observado o aumento dos níveis de alanina, como reportado anteriormente (**Figura 28**). Quanto às células tratadas com $rLAAO^{R90A}$, os níveis dos aminoácidos se mantiveram relativamente os mesmos em todos os tempos testados, com exceção de uma diminuição de lisina e aumento de glicina (**Figura 34**).

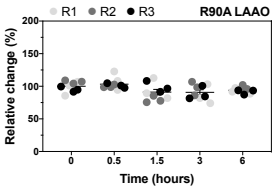
ALANINA



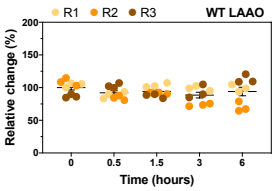


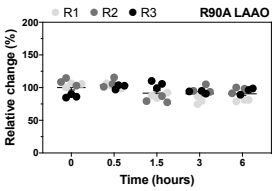
VALINA



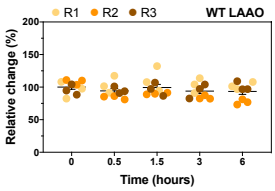


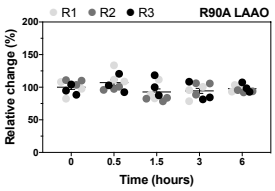
ISOLEUCINA



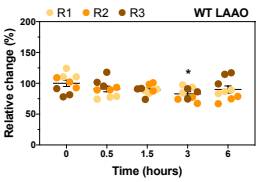


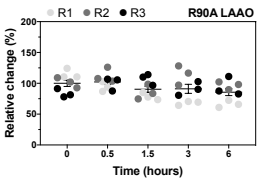
LEUCINA



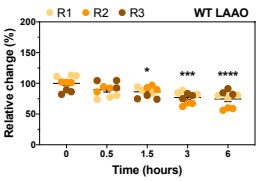


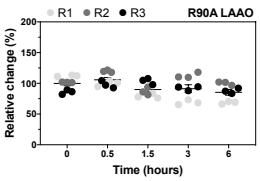
METIONINA



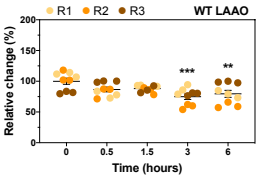


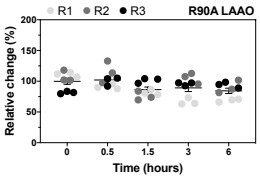
FENILALANINA



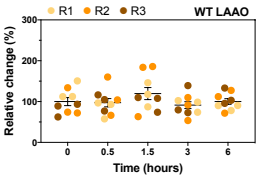


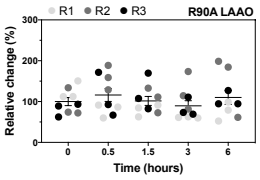
TIROSINA



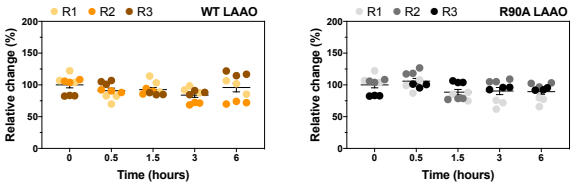


ARGININA

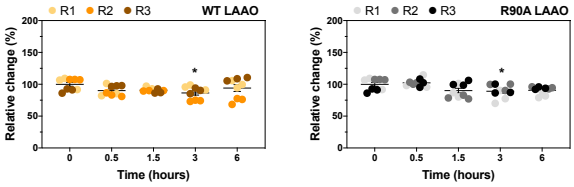




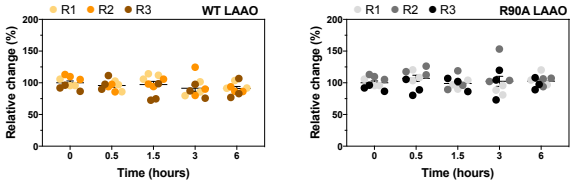
HISTIDINA



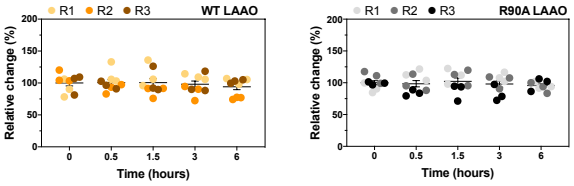
LISINA



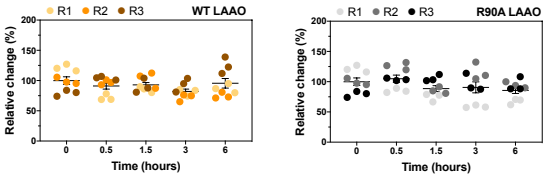
ÁCIDO ASPARTIDO



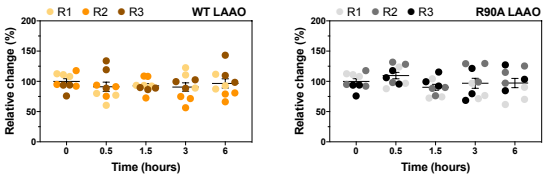
ÁCIDO GLUTÂMICO



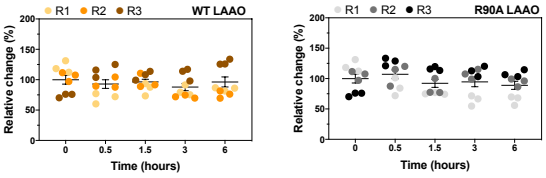
SERINA



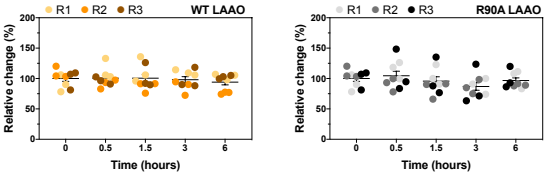
TREONINA



ASPARAGINA



GLUTAMINA



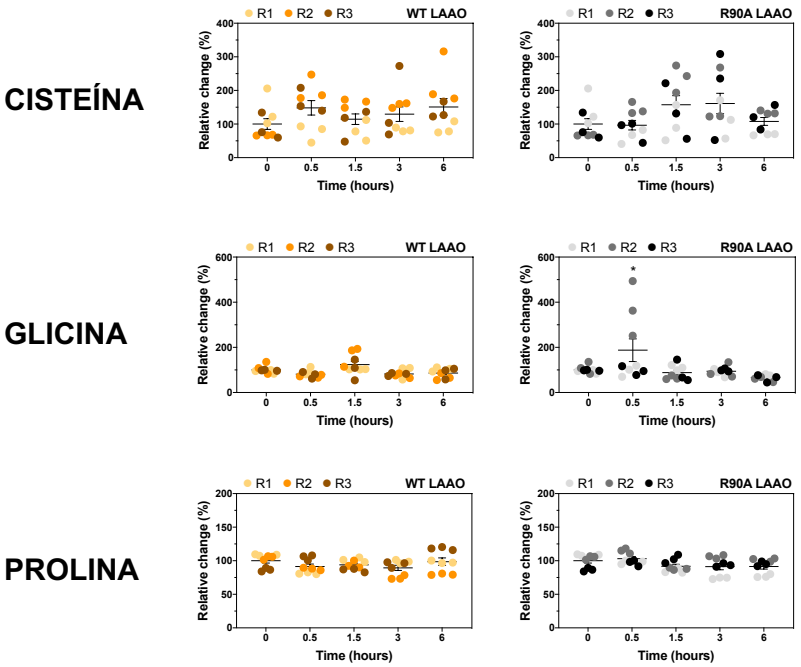


Figura 34: Quantificação dos aminoácidos identificados por UPLC-MS/MS em células endoteliais. HDMECs foram tratadas com 2 EC_{50} de rLAAO ou $rLAAO^{R90A}$ por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. O lisado celular foi obtido adicionando-se metanol, as amostras foram derivatizadas utilizando o reagente AccQTag Ultra (Waters) e submetidas a análises por UPLC-MS/MS, utilizando uma abordagem do tipo *targeted*. Os dados foram coletados, normalizados e analisados estatisticamente por one-way ANOVA (valor p < 0,05). **R1, R2 e R3:** replicatas 1, 2 e 3, respectivamente. **WT LAAO:** rLAAO. **R90A LAAO:** $rLAAO^{R90A}$.

As análises de enriquecimento indicam novamente a regulação do metabolismo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, metionina e histidina. Além disso, entre as vias mais significativamente reguladas, estão as do metabolismo de biotina e betaína. Em relação a vias de síntese, o tratamento com a rLAAO parece regular processos de biossíntese de catecolaminas, hormônio tireoidiano, espermidina e carnitina (**Figura 35**).

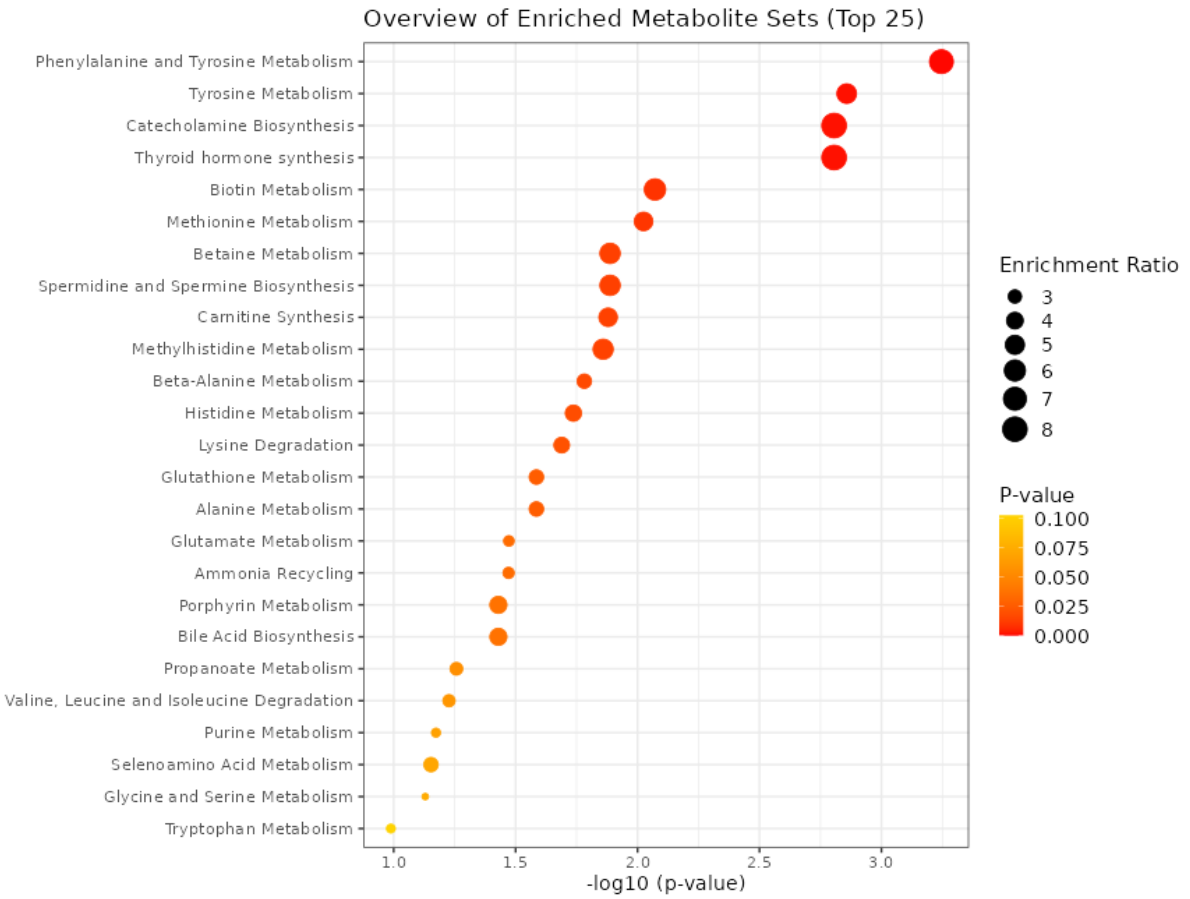


Figura 35: Análise de enriquecimento de vias metabólicas em células endoteliais após tratamento com rLAAO. Os valores de porcentagem de cada aminoácido identificado nas análises de UPLC-MS/MS em HDMECs tratadas com rLAAO por 3 horas foram submetidos a análise de enriquecimento na plataforma MetaboAnalyst, integrada ao banco de dados SMPDB. As porcentagens foram comparadas às das células não-tratadas (valor $p < 0,05$ foi considerado como significativo).

Quando os níveis de aminoácidos classificados como preferenciais da LAAO são comparados entre os grupos, observa-se que nas células tratadas com rLAAO há uma diminuição na quantidade desses aminoácidos, quando comparado às células não-tratadas. Entretanto, nessa comparação, aparentemente as concentrações dos aminoácidos não-preferenciais estão também relativamente mais baixas do que nas células não-tratadas, similar ao que ocorre para os aminoácidos preferenciais (**Figura 36**).

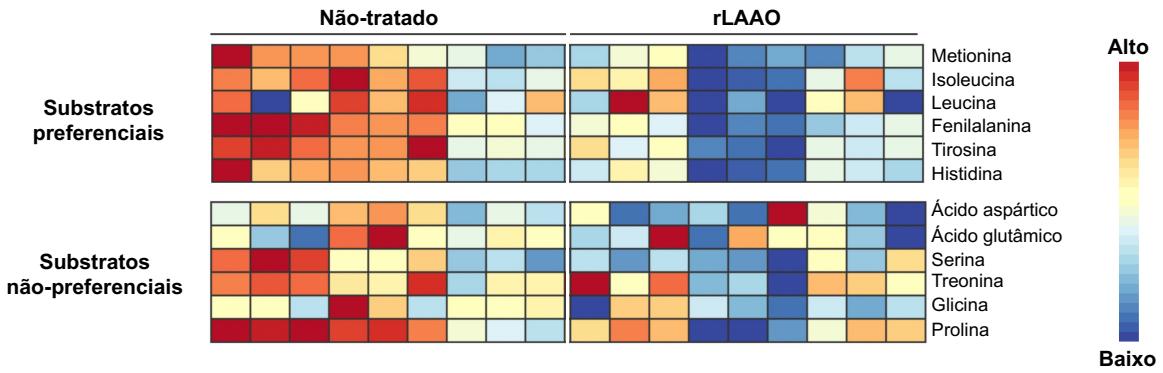
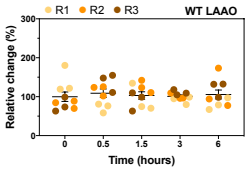
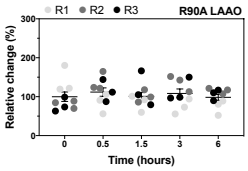


Figura 36: Comparação dos níveis de aminoácidos descritos como substratos preferenciais ou não da LAAO. *Heatmap* construído na plataforma MetaboAnalyst, selecionando os aminoácidos de interesse. **Não tratado:** HDMECs que não receberam nenhum tratamento. **rLAAO:** HDMECs tratadas com 2 EC_{50} da rLAAO por 3 horas. Baixos níveis dos metabólitos estão representados por cores próximas ao azul, enquanto níveis mais altos são representados por cores próximas ao vermelho. Cada coluna indica uma replicata experimental de cada uma das replicatas biológicas (n=3).

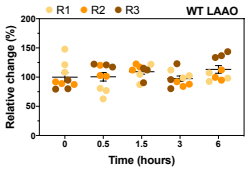
Por fim, os níveis dos outros componentes contendo aminas biogênicas foram avaliados nas amostras de lisado celular de HDMECs. Inesperadamente, não houve variação significativa em nenhum dos componentes avaliados, exceto para metilamina, que apresentou um aumento na sua concentração, após 6 horas de tratamento. Nas amostras de células tratadas com a $rLAAO^{R90A}$, exceto para a etanolamina, também não houve variação relevante nos níveis dos compostos, visto que nenhum deles apresentou diferença significativa nos seus níveis em relação ao controle (**Figura 37**).

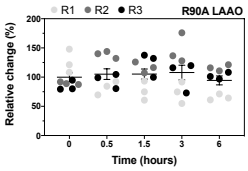
HIDROXIPROLINA



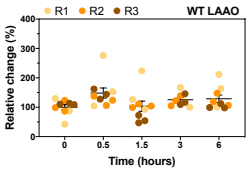


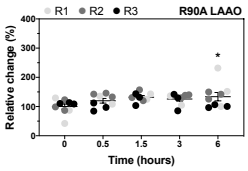
CISTINA



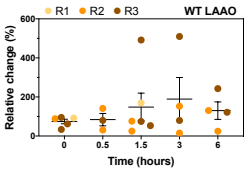


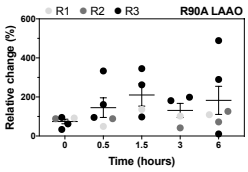
ETANOLAMINA



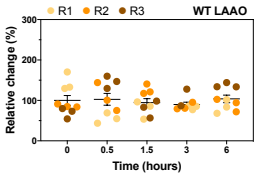


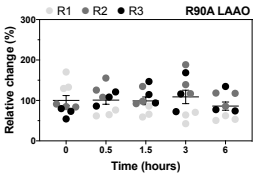
ÁCIDO β-AMINO ISOBUTÍRICO



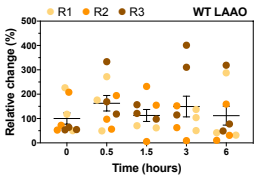


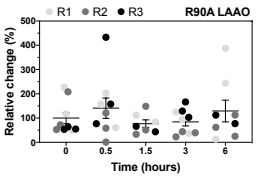
ÁCIDO α-AMINOBUTÍRICO



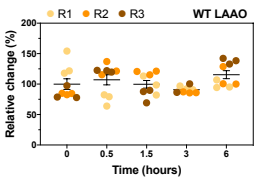


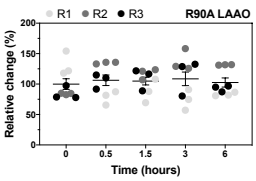
FOSFOSERINA



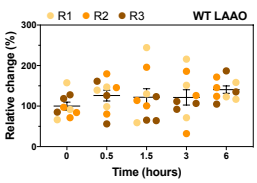


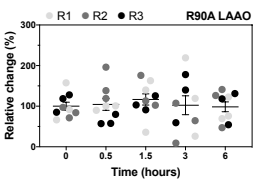
SARCOSINA



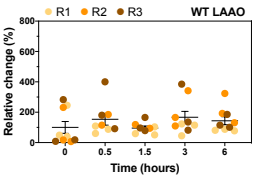


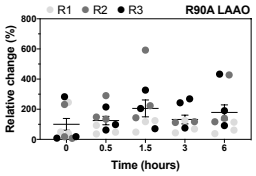
TAURINA



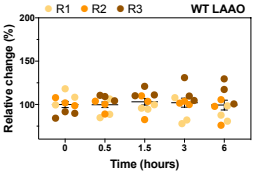


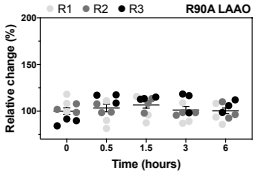
ÁCIDO ɣ-AMINOBUTÍRICO



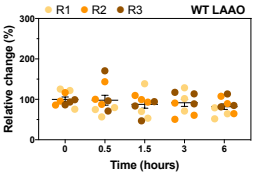


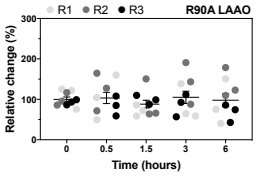
TRIPTAMINA



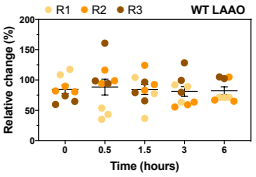


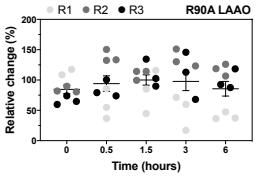
ALANTOÍNA



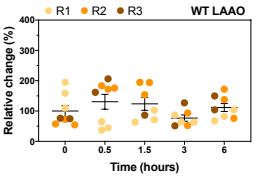


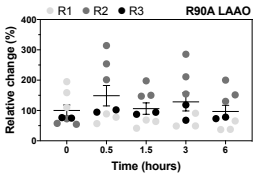
LNMMA



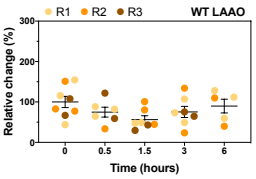


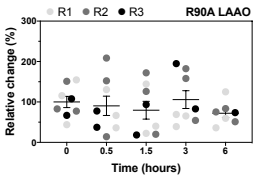
OCTOPAMINA



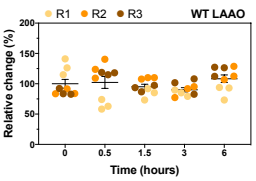


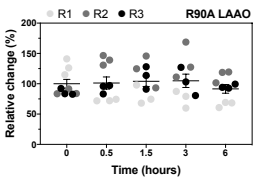
TIRAMINA



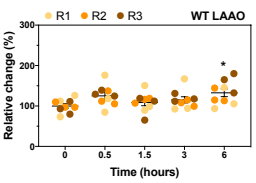


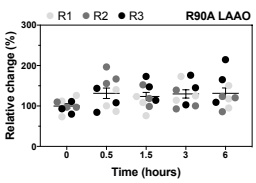
GLICILGLICINA





METILAMINA





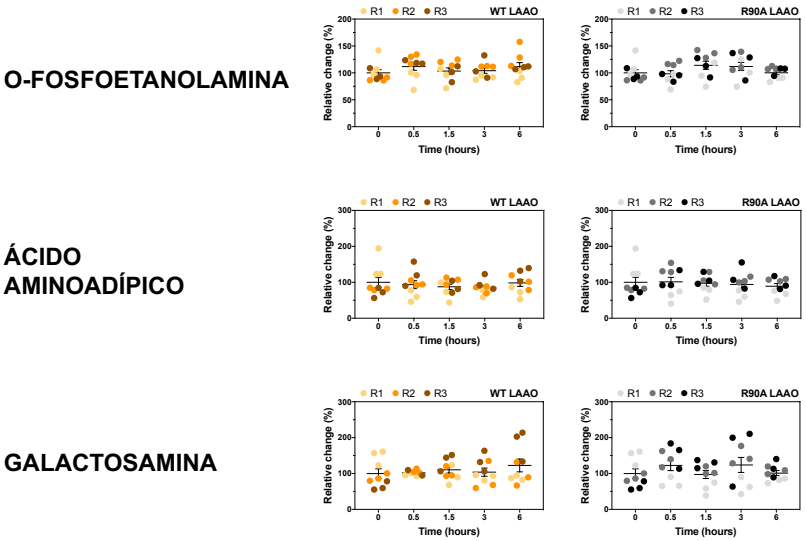


Figura 37: Quantificação de compostos com aminas biogênicas identificadas por UPLC-MS/MS em células endoteliais. HDMECs foram tratadas com 2 EC_{50} de rLAAO ou $rLAAO^{R90A}$ por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. O lisado celular foi obtido adicionando-se metanol, as amostras foram derivatizadas utilizando o reagente AccQTag Ultra (Waters) e submetidas a análises por UPLC-MS/MS, utilizando uma abordagem do tipo *targeted*. Os dados foram coletados, normalizados e analisados estatisticamente por one-way ANOVA (valor p < 0,05). **R1, R2 e R3:** replicatas 1, 2 e 3, respectivamente. **WT LAAO:** rLAAO. **R90A LAAO:** $rLAAO^{R90A}$.

Embora as diferenças nos níveis dos componentes não tenham sido tão significativas, as análises de enriquecimento apresentaram vias similares às encontradas para as amostras de sobrenadante celular. Os resultados indicaram uma possível regulação do metabolismo de aminoácidos como metionina, tirosina e aspartato. Assim como observado nas amostras de sobrenadante, vias de biossíntese de lipídeos também parecem estar consideravelmente alteradas (**Figura 38**).

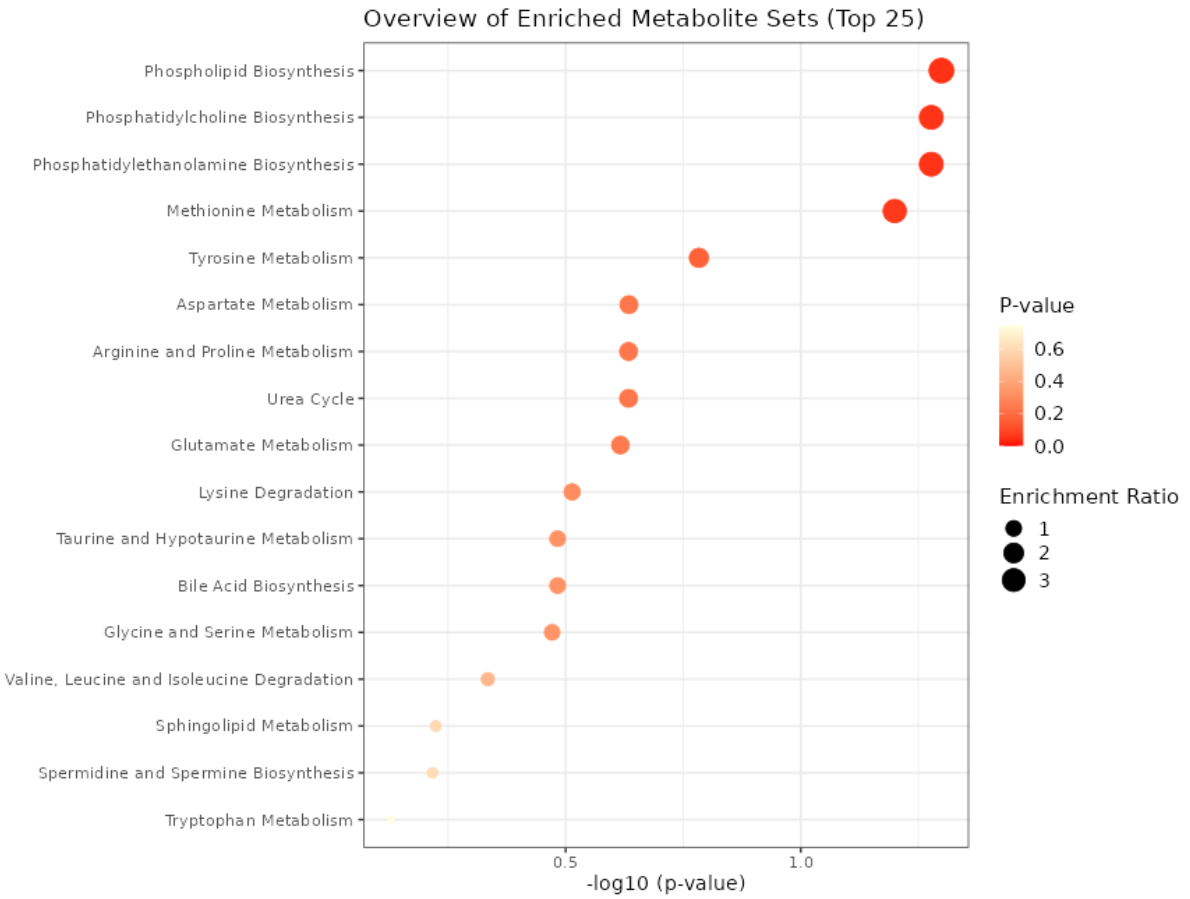


Figura 38: Análise de enriquecimento de vias metabólicas em células endoteliais após tratamento com rLAAO. Os valores de porcentagem de cada componente identificado nas análises de UPLC-MS/MS em HDMECs tratadas com rLAAO por 3 horas foram submetidos a análise de enriquecimento na plataforma MetaboAnalyst, integrada ao banco de dados SMPDB. As porcentagens foram comparadas às das células não-tratadas (valor $p < 0,05$ foi considerado como significativo).

Os compostos classificados pelo MetaboAnalyst com menor valor p (maior diferença significativa em relação ao controle), foram utilizados para construção do *heatmap*. Entretanto, como esperado, nessas análises não houveram diferenças relevantes dos níveis desses compostos entre os dois grupos, nesse tempo de tratamento (**Figura 39**).

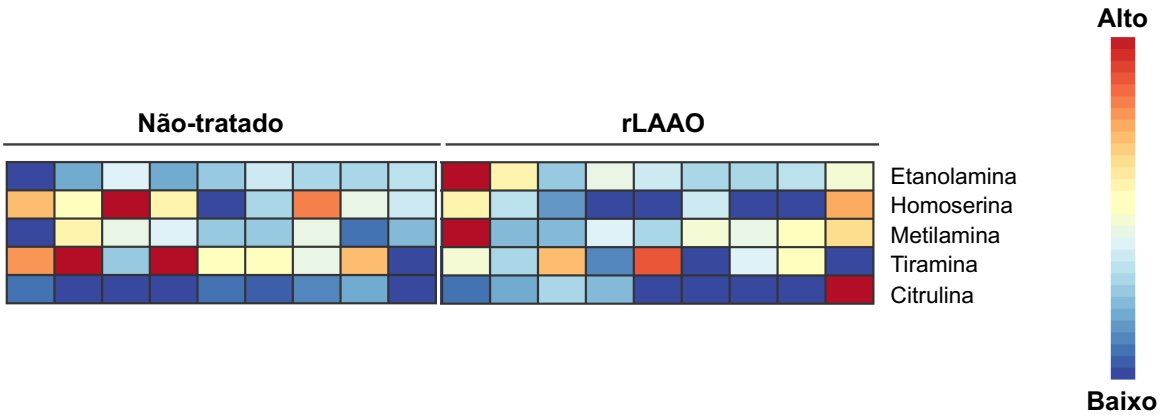
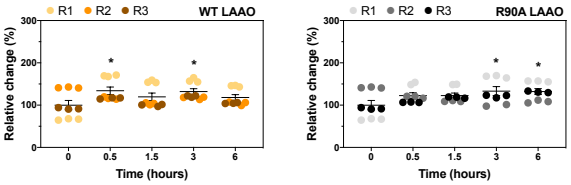


Figura 39: Comparação dos níveis de compostos com aminas biogênicas em células endoteliais. *Heatmap* construído na plataforma MetaboAnalyst, selecionando os compostos de interesse. **Não tratado:** HDMECs que não receberam nenhum tratamento. **rLAAO:** HDMECs tratadas com 2 EC_{50} da rLAAO por 3 horas. Baixos níveis dos metabólitos estão representados por cores próximas ao azul, enquanto níveis mais altos são representados por cores próximas ao vermelho. Cada coluna indica uma replicata experimental de cada uma das replicatas biológicas (n=3).

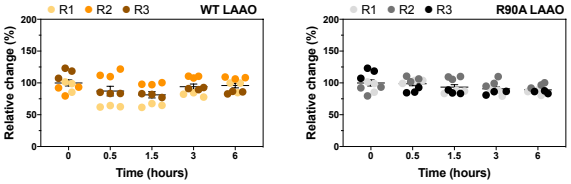
Queratinócitos

As mesmas quantificações foram realizadas nos queratinócitos, outro importante tipo celular afetado pelo envenenamento. De forma geral, mais compostos apresentaram diferenças significativas do que observado para as células endoteliais. Nas análises do sobrenadante dos NHEKs, metionina, fenilanina, tirosina e triptofano apresentaram seus níveis consideravelmente reduzidos após o tratamento com rLAAO. Além disso, houve um ligeiro aumento na concentração de alanina, ácido aspártico, cisteína, glicina e prolina. O tratamento com a $rLAAO^{R90A}$, por sua vez, causou a redução, de forma menos intensa, dos níveis de tirosina e um aumento na concentração de alanina (**Figura 40**).

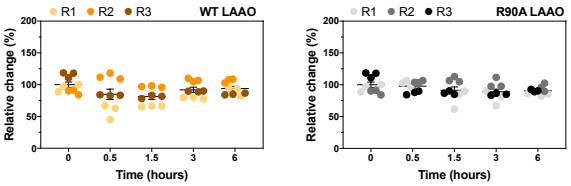
ALANINA



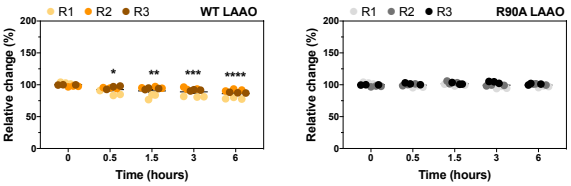
VALINA



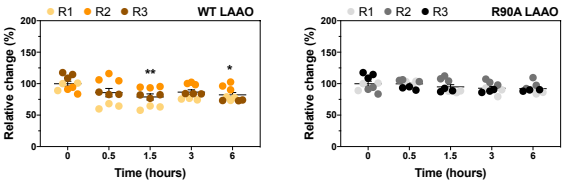
LEUCINA



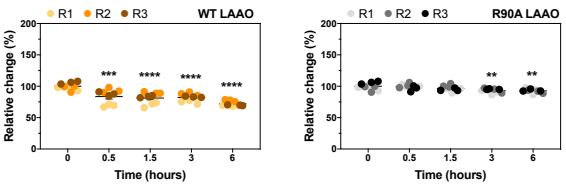
METIONINA



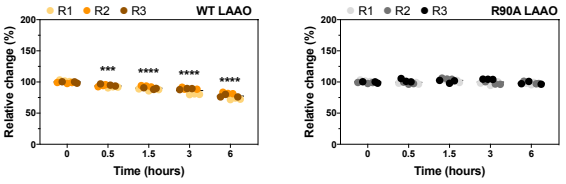
FENILALANINA



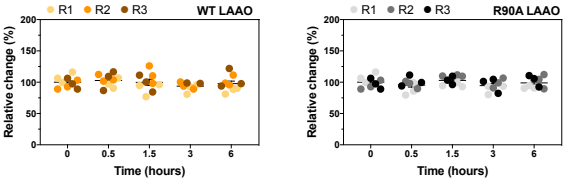
TIROSINA



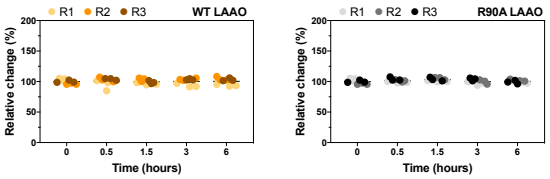
TRIPTOFANO



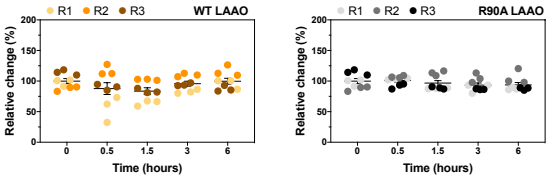
ARGININA



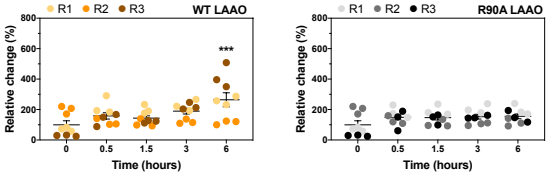
HISTIDINA



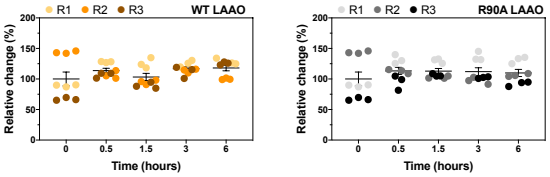
LISINA



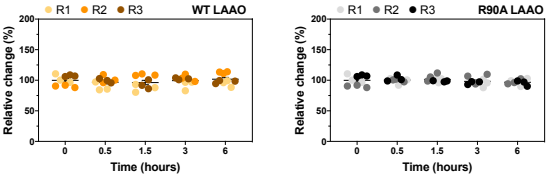
ÁCIDO ASPARTIDO



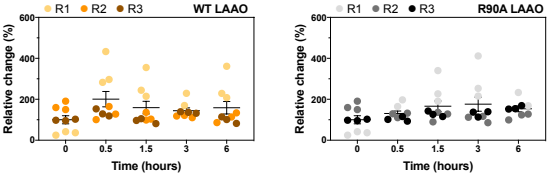
ÁCIDO GLUTÂMICO



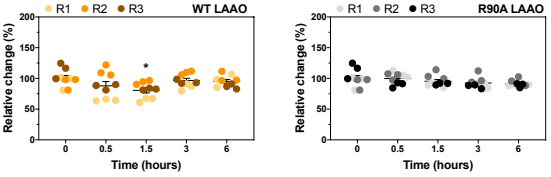
SERINA



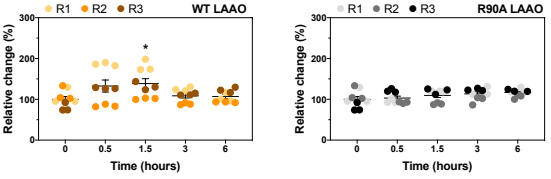
ASPARAGINA



GLUTAMINA



CISTEÍNA



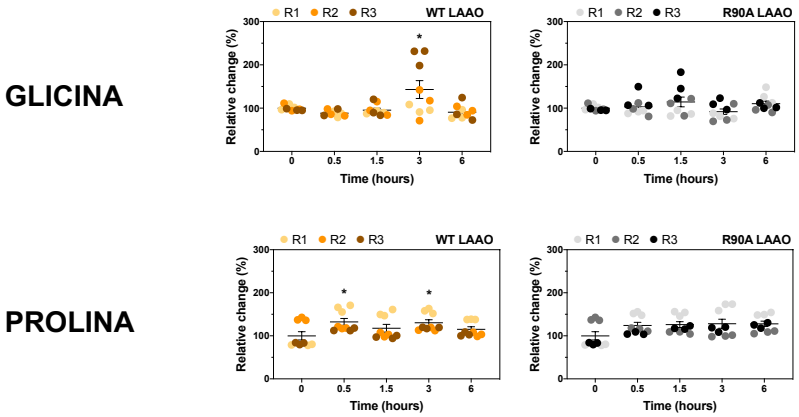


Figura 40: Quantificação dos aminoácidos identificados por UPLC-MS/MS no sobrenadante de queratinócitos. NHEKs foram tratadas com 2 EC_{50} de rLAAO ou $rLAAO^{R90A}$ por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. O sobrenadante foi coletado, as amostras derivatizadas utilizando o reagente AccQTag Ultra (Waters) e submetidas a análises por UPLC-MS/MS, utilizando uma abordagem do tipo *targeted*. Os dados foram coletados, normalizados e analisados estatisticamente por one-way ANOVA (valor $p < 0,05$). **R1, R2 e R3:** replicatas 1, 2 e 3, respectivamente. **WT LAAO:** rLAAO. **R90A LAAO:** $rLAAO^{R90A}$.

As análises de enriquecimento demonstraram perfil similar ao observado para as células endoteliais. Considerando as vias mais significativas, a regulação do metabolismo de aminoácidos, tais como arginina, prolina, glutamato e tirosina, além da biossíntese de catecolaminas, hormônio tireoidiano e espermidina também parecem ser influenciadas pelo tratamento com a rLAAO. A diferença principal se deu pelo aparecimento da via do metabolismo de purinas (**Figura 41**).

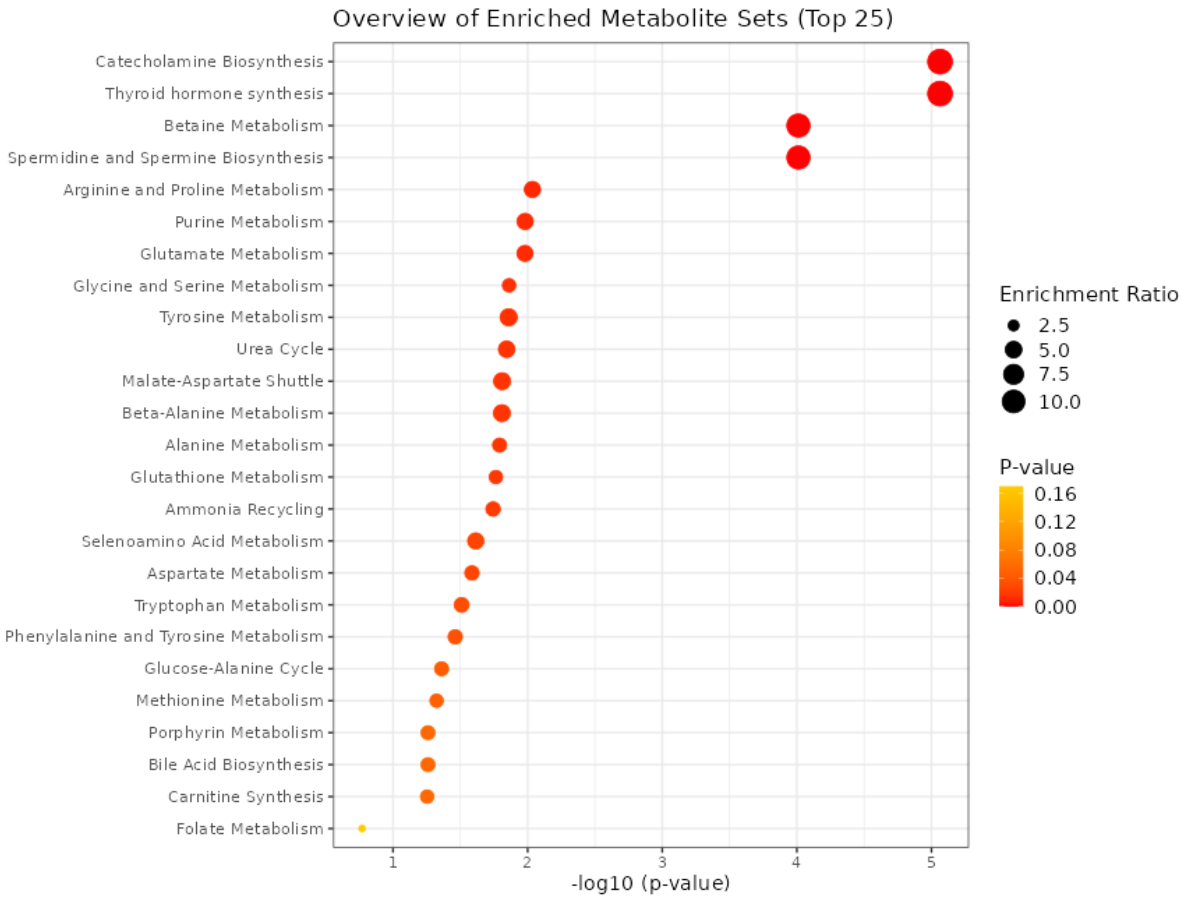


Figura 41: Análise de enriquecimento de vias metabólicas no sobrenadante de queratinócitos após tratamento com rLAAO. Os valores de porcentagem de cada aminoácido identificado nas análises de UPLC-MS/MS em NHEKs tratados com rLAAO por 3 horas foram submetidos a análise de enriquecimento na plataforma MetaboAnalyst, integrada ao banco de dados SMPDB. As porcentagens foram comparadas às das células não-tratadas (valor $p < 0,05$ foi considerado como significativo).

Quando os aminoácidos preferenciais são selecionados para comparação, seus níveis no grupo tratado com a rLAAO parecem estar reduzidos, em comparação ao grupo não-tratado. As replicatas do grupo rLAAO apresentam uma variação entre si, porém, mesmo com essa diferença, as concentrações dos aminoácidos nesse grupo são relativamente menores. Quando os substratos classificados como não-preferenciais são selecionados, seus níveis variam e são similares nos dois grupos (**Figura 42**).

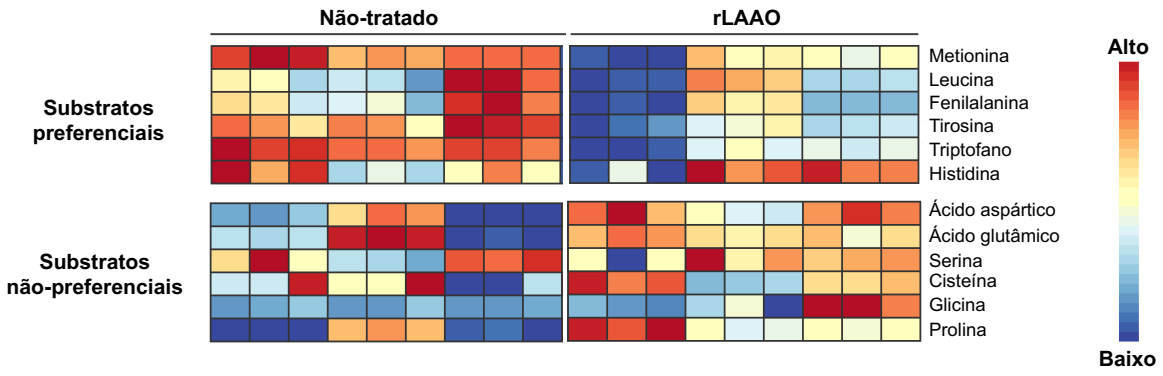
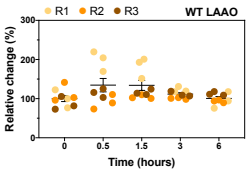
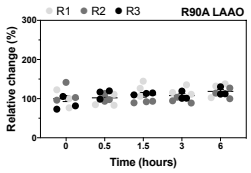


Figura 42: Comparação dos níveis de aminoácidos descritos como substratos preferenciais ou não da LAAO. *Heatmap* construído na plataforma MetaboAnalyst, selecionando os aminoácidos de interesse. **Não tratado:** Sobrenadante de NHEKs que não receberam nenhum tratamento. **rLAAO:** Sobrenadante de NHEKs tratadas com 2 EC_{50} da rLAAO por 3 horas. Baixos níveis dos metabólitos estão representados por cores próximas ao azul, enquanto níveis mais altos são representados por cores próximas ao vermelho. Cada coluna indica uma replicata experimental de cada uma das replicatas biológicas (n=3).

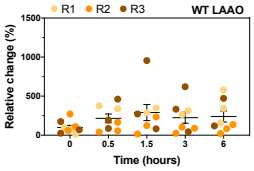
Em relação aos outros compostos contendo aminas biogênicas, a diferença mais significativa foi observada nos níveis de glutationa, os quais estavam relativamente aumentados em todos os tempos testados em amostras do sobrenadante de queratinócitos tratados com rLAAO. As outras diferenças não são muito expressivas, mas sugerem um aumento nas concentrações de cistina, etanolamina, ácido α-aminobutírico, sarcosina, glicilglicina e o-fosfoetanolamina, principalmente nos tempos iniciais de tratamento, como 0,5 h e 1,5 h. Não há redução aparente do nível de nenhum dos compostos após tratamento com a rLAAO. Já em relação a $rLAAO^{R90A}$, as diferenças estatísticas indicam o aumento de alguns compostos, tais como carnosina, etanolamina, citrulina, sarcosina e glicilglicina. Porém, essas variações são observadas em tempos mais tardios, principalmente após 3 e 6 horas de tratamento (**Figura 43**).

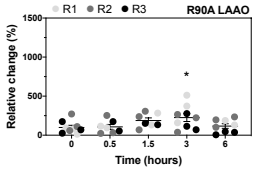
HIDROXIPROLINA



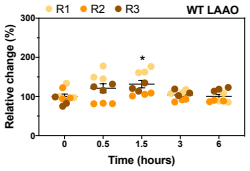


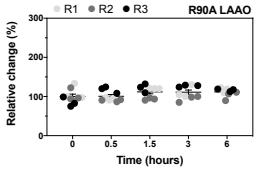
CARNOSINA



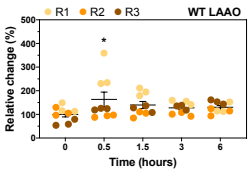


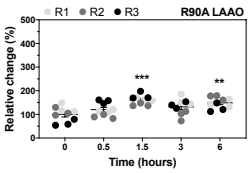
CISTINA



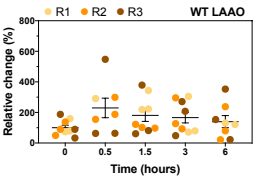


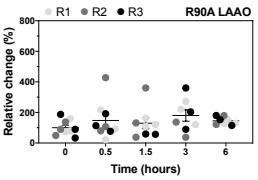
ETANOLAMINA



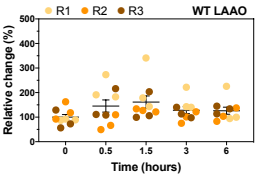


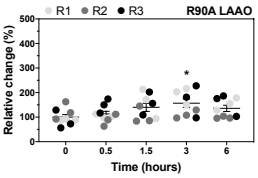
ÁCIDO β-AMINO ISOBUTÍRICO



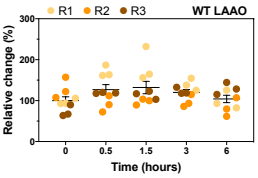


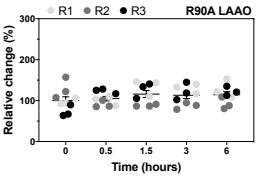
CITRULINA



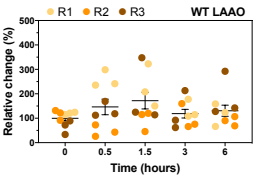


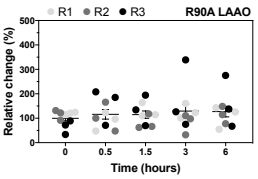
CISTATIONINA



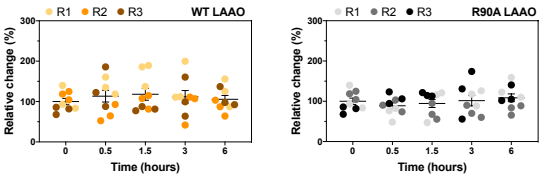


HOMOSERINA

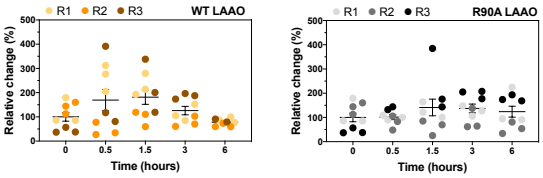




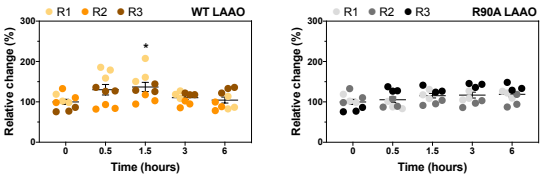
HIDROXILISINA



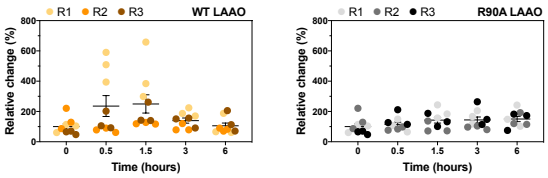
ORNITINA



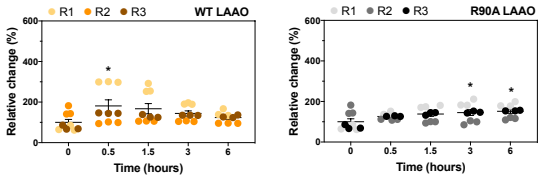
ÁCIDO α-AMINOBUTÍRICO



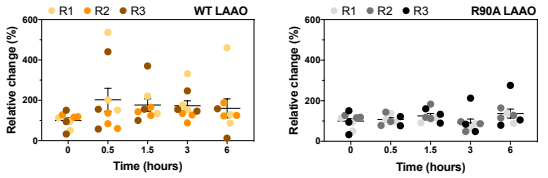
ÁCIDO AMINOADÍPICO



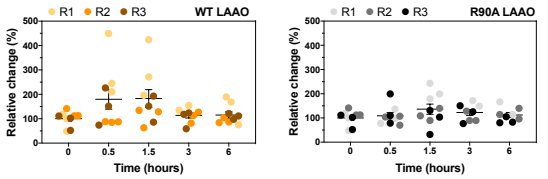
SARCOSINA



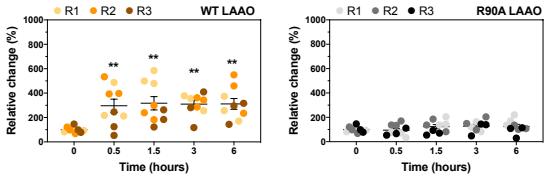
TAURINA



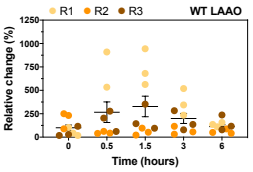
ÁCIDO γ-AMINOBUTÍRICO

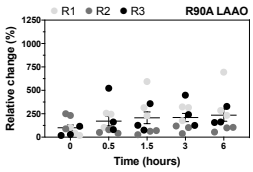


GLUTATIONA

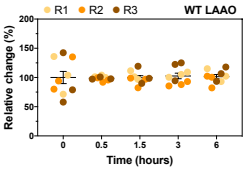


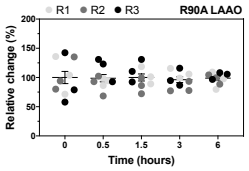
ÁCIDO OFTÁLMICO



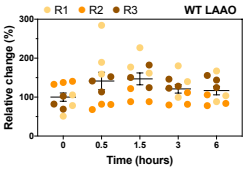


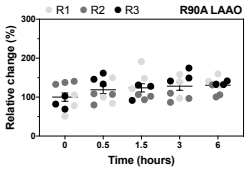
TRIPTAMINA



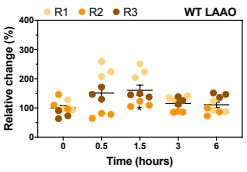


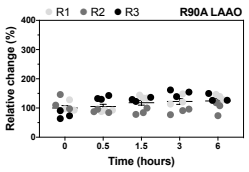
ALANTOÍNA



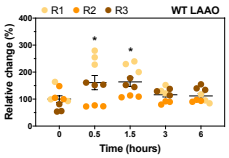


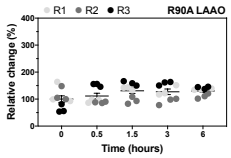
PUTRESCINA



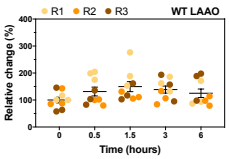


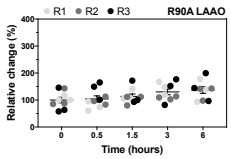
LNMMA



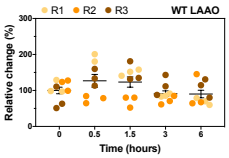


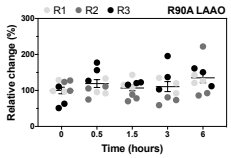
GALACTOSAMINA



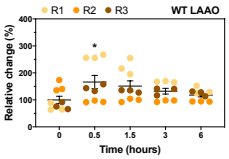


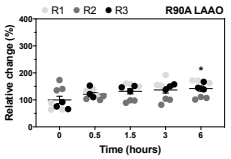
TIRAMINA





GLICILGLICINA





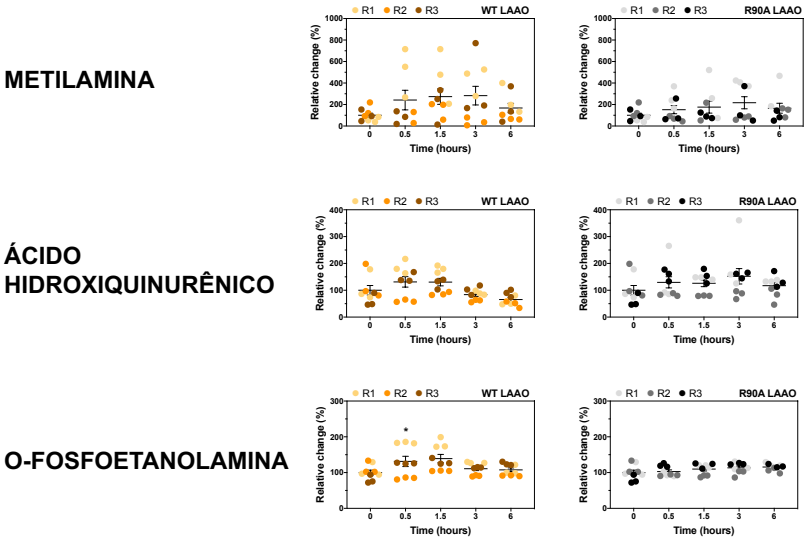


Figura 43: Quantificação de compostos com aminas biogênicas identificados por UPLC-MS/MS no sobrenadante de queratinócitos. NHEKs foram tratados com 2 EC_{50} de rLAAO ou $rLAAO^{R90A}$ por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. O sobrenadante foi coletado, as amostras derivatizadas utilizando o reagente AccQTag Ultra (Waters) e submetidas a análises por UPLC-MS/MS, utilizando uma abordagem do tipo *targeted*. Os dados foram coletados, normalizados e analisados estatisticamente por one-way ANOVA (valor p < 0,05). **R1, R2 e R3:** replicatas 1, 2 e 3, respectivamente. **WT LAAO:** rLAAO. **R90A LAAO:** $rLAAO^{R90A}$.

As análises de enriquecimento com as amostras de sobrenadante dos queratinócitos indicaram algumas vias que também estão aumentadas nas células endoteliais, como vias do metabolismo e biossíntese de lipídeos, tais como ácido araquidônico, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfolipídios. Além disso, outras vias mencionadas anteriormente, como do metabolismo de glutationa e aminoácidos, também parecem ser reguladas quando as células são tratadas com rLAAO. Ainda, nessas análises houve o aparecimento de vias do metabolismo de piruvato e degradação de piruvaldeído, que não haviam sido encontradas anteriormente em células tratadas com rLAAO (**Figura 44**).

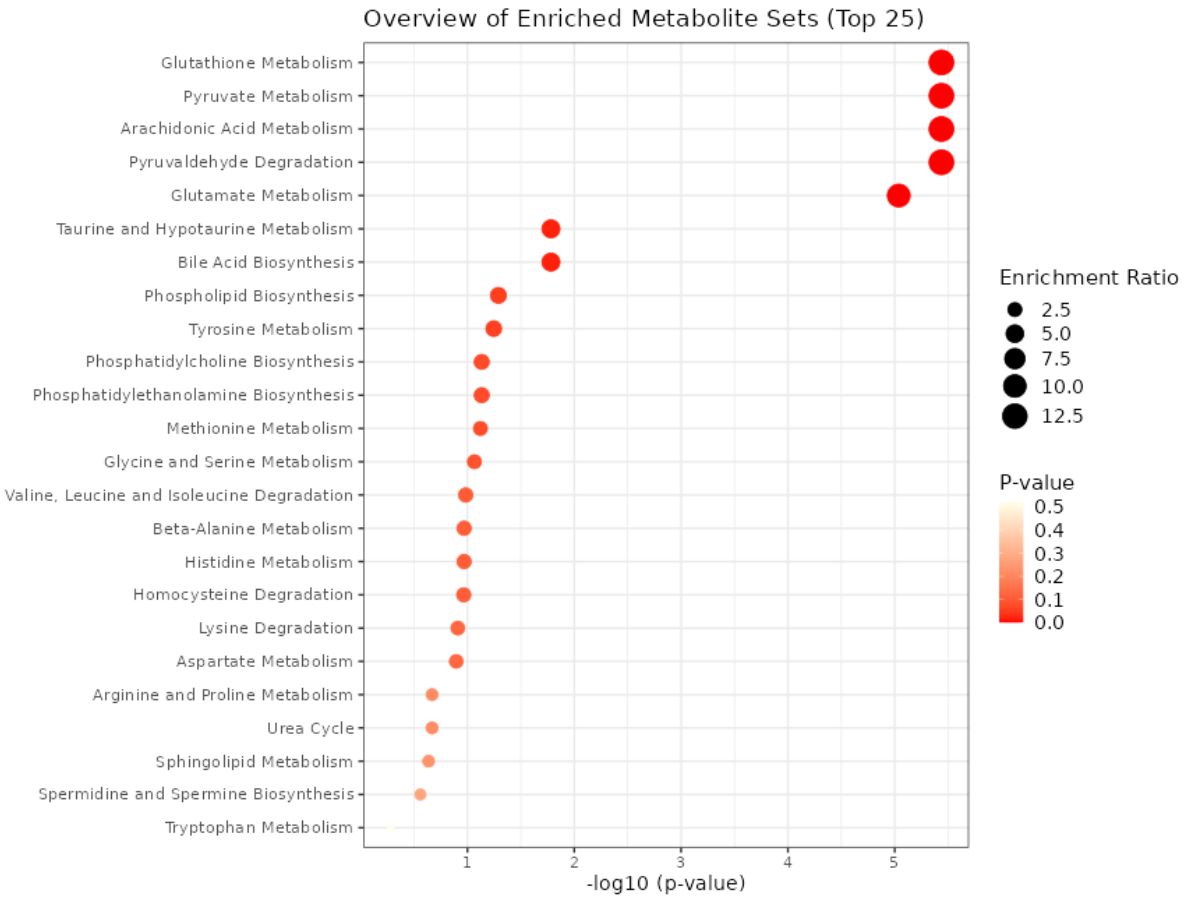


Figura 44: Análise de enriquecimento de vias metabólicas no sobrenadante de queratinócitos após tratamento com rLAAO. Os valores de porcentagem de cada componente identificado nas análises de UPLC-MS/MS em NHEKs tratados com rLAAO por 3 horas foram submetidos a análise de enriquecimento na plataforma MetaboAnalyst, integrada ao banco de dados SMPDB. As porcentagens foram comparadas às das células não-tratadas (valor $p < 0,05$ foi considerado como significativo).

A análise dos compostos classificados pelo MetaboAnalyst como mais significativos demonstrou, mais uma vez, um aumento relativo nos níveis desses metabólitos, quando as células são tratadas com rLAAO. De forma geral, as concentrações de glutationa, taurina, galactosamina, sarcosina e etanolamina são mais elevadas do que as do grupo controle (**Figura 45**).

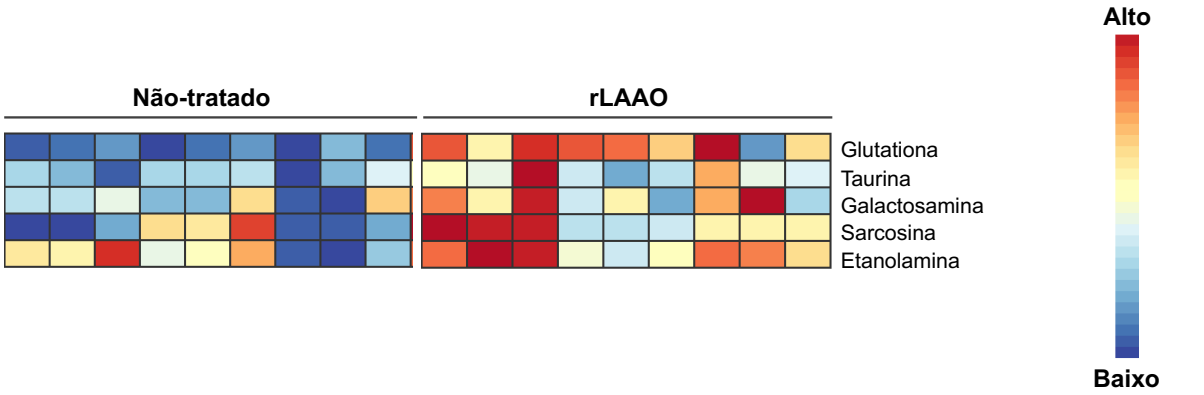
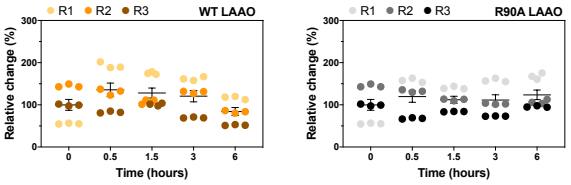


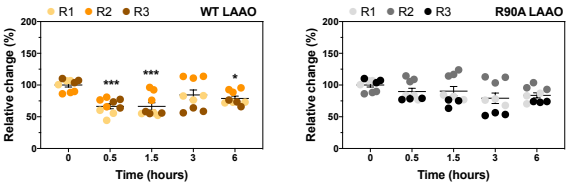
Figura 45: Comparação dos níveis de compostos com aminas biogênicas no sobrenadante de queratinócitos. *Heatmap* construído na plataforma MetaboAnalyst, selecionando os compostos de interesse. **Não tratado:** Sobrenadante de NHEKs que não receberam nenhum tratamento. **rLAAO:** Sobrenadante de NHEKs tratados com 2 EC_{50} da rLAAO por 3 horas. Baixos níveis dos metabólitos estão representados por cores próximas ao azul, enquanto níveis mais altos são representados por cores próximas ao vermelho. Cada coluna indica uma replicata experimental de cada uma das replicatas biológicas (n=3).

Considerando as amostras de lisado celular dos queratinócitos, diferentes aminoácidos foram afetados, principalmente levando à redução dos seus níveis. Valina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina, lisina, serina e glutamina, todos eles apresentaram diminuição significativa após tratamento das células com rLAAO. Os únicos aminoácidos em que as concentrações se elevaram foram ácido aspártico e cisteína. Em relação às amostras que receberam tratamento com $rLAAO^{R90A}$, houve a redução apenas nos níveis de leucina e tirosina, enquanto cisteína apresentou um aumento em sua concentração relativa (**Figura 46**).

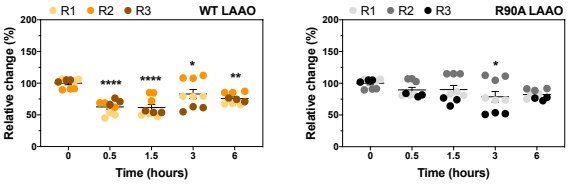
ALANINA



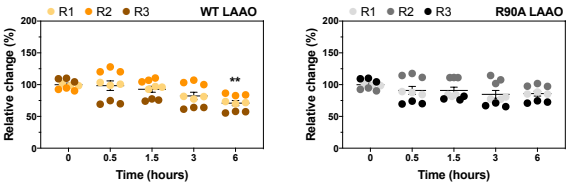
VALINA



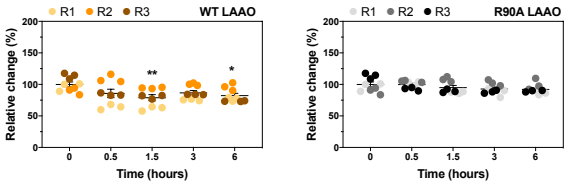
LEUCINA



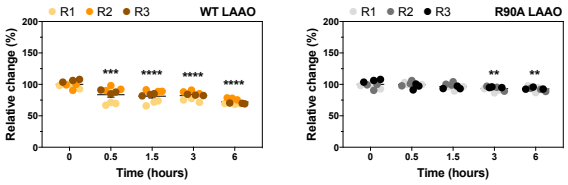
METIONINA



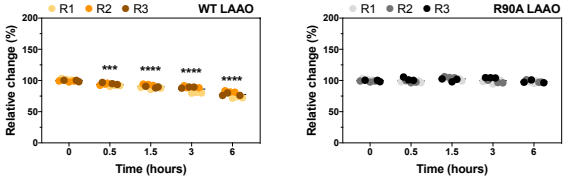
FENILALANINA



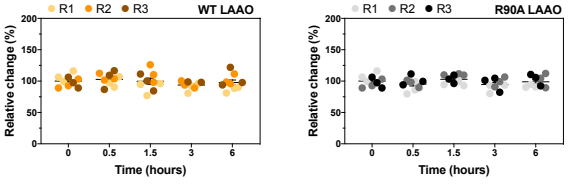
TIROSINA



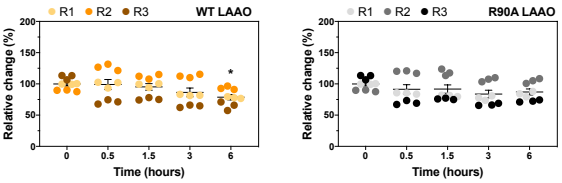
TRIPTOFANO



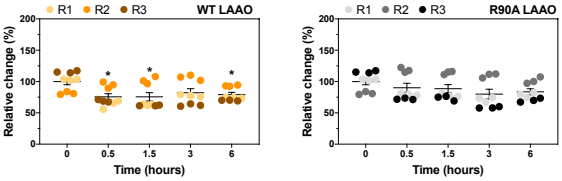
ARGININA



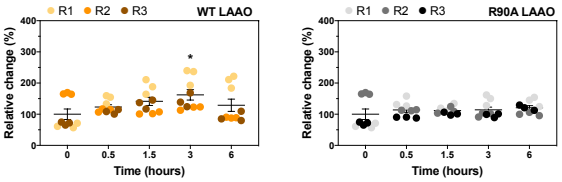
HISTIDINA



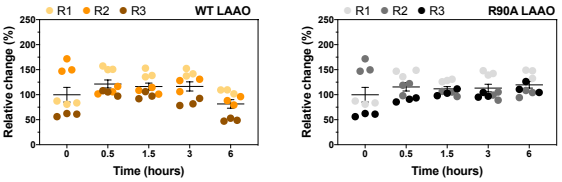
LISINA



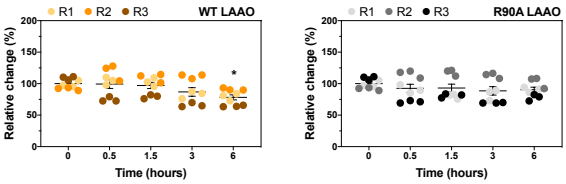
ÁCIDO ASPARTIDO



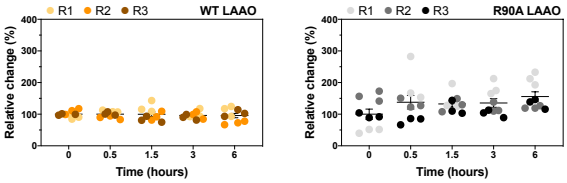
ÁCIDO GLUTÂMICO



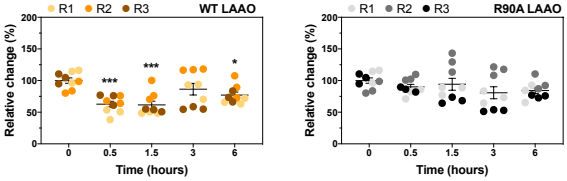
SERINA



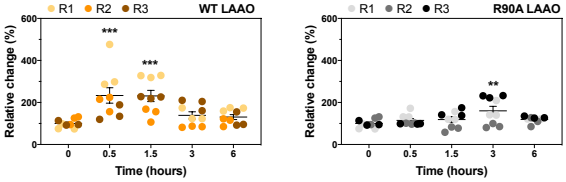
ASPARAGINA



GLUTAMINA



CISTEÍNA



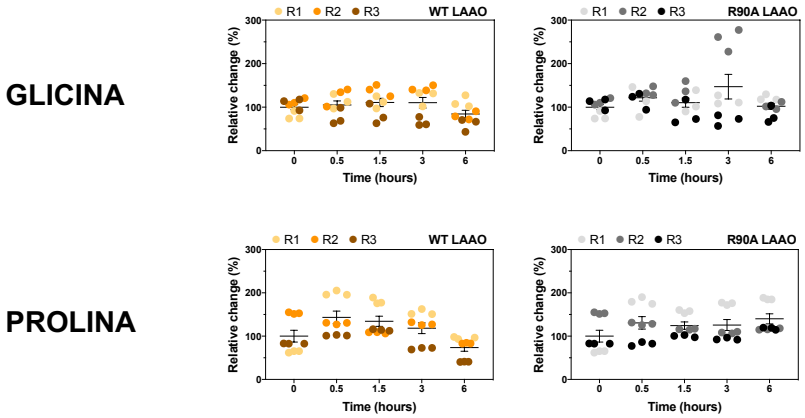


Figura 46: Quantificação dos aminoácidos identificados por UPLC-MS/MS em queratinócitos. NHEKs foram tratados com 2 EC_{50} de rLAAO ou $rLAAO^{R90A}$ por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. O lisado celular foi obtido adicionando-se metanol, as amostras foram derivatizadas utilizando o reagente AccQTag Ultra (Waters) e submetidas a análises por UPLC-MS/MS, utilizando uma abordagem do tipo *targeted*. Os dados foram coletados, normalizados e analisados estatisticamente por one-way ANOVA (valor p < 0,05). **R1, R2 e R3:** replicatas 1, 2 e 3, respectivamente. **WT LAAO:** rLAAO. **R90A LAAO:** $rLAAO^{R90A}$.

As análises de enriquecimento corroboram os achados anteriores, indicando a regulação do metabolismo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina e aspartato, além de compostos como betaína, beta-alanina, pirimidinas e biotina. A biossíntese de catecolaminas e de hormônio tireoidiano aparecem como as principais vias reguladas pela rLAAO (**Figura 47**).

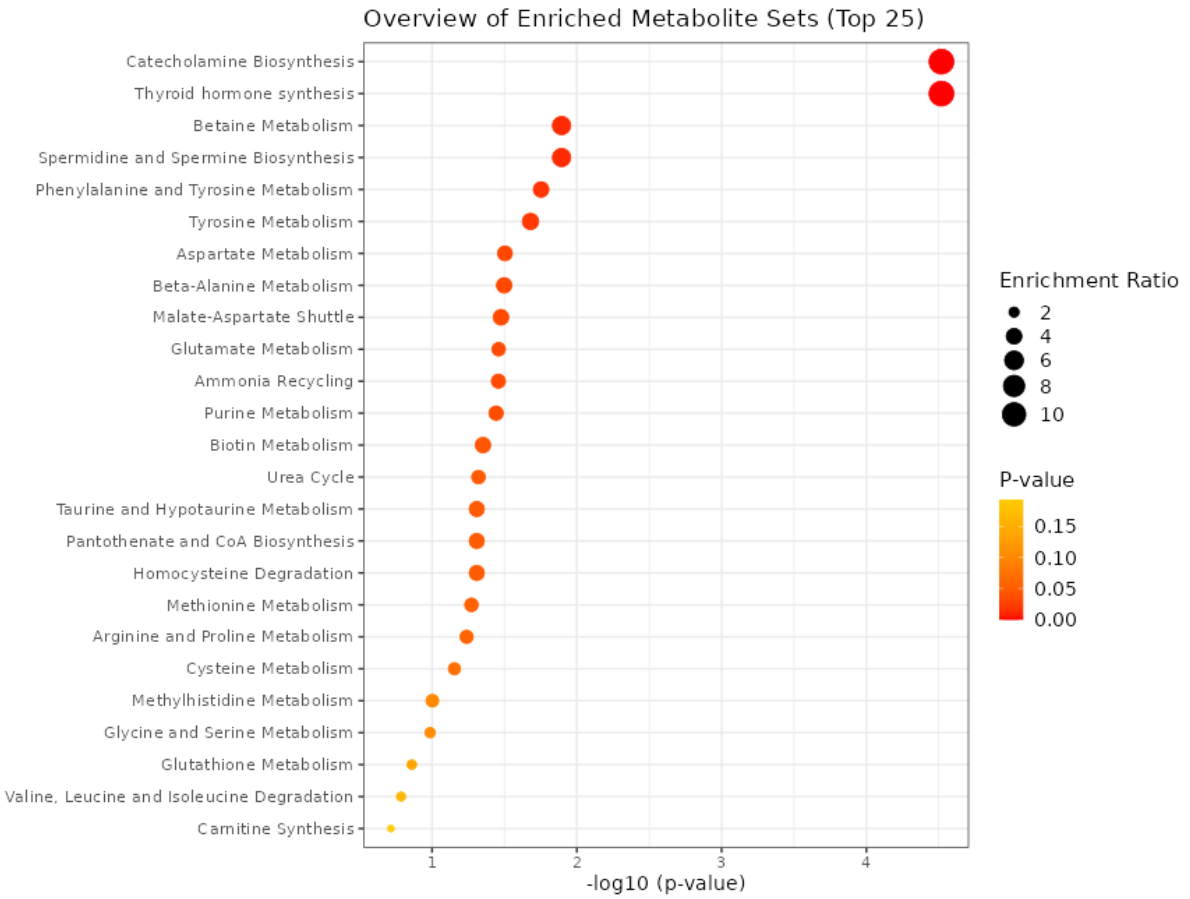


Figura 47: Análise de enriquecimento de vias metabólicas em queratinócitos após tratamento com rLAAO. Os valores de porcentagem de cada componente identificado nas análises de UPLC-MS/MS em NHEKs tratados com rLAAO por 3 horas foram submetidos a análise de enriquecimento na plataforma MetaboAnalyst, integrada ao banco de dados SMPDB. As porcentagens foram comparadas às das células não-tratadas (valor p < 0,05 foi considerado como significativo).

Os níveis de aminoácidos descritos como substratos preferenciais da rLAAO estão relativamente reduzidos em relação ao controle. Nesse grupo, as replicatas dos experimentos apresentaram uma variação entre si, porém as concentrações médias desses aminoácidos estão reduzidas. Ao contrário, essa diferença não é tão clara quando avaliamos os substratos não-preferenciais (**Figura 48**).

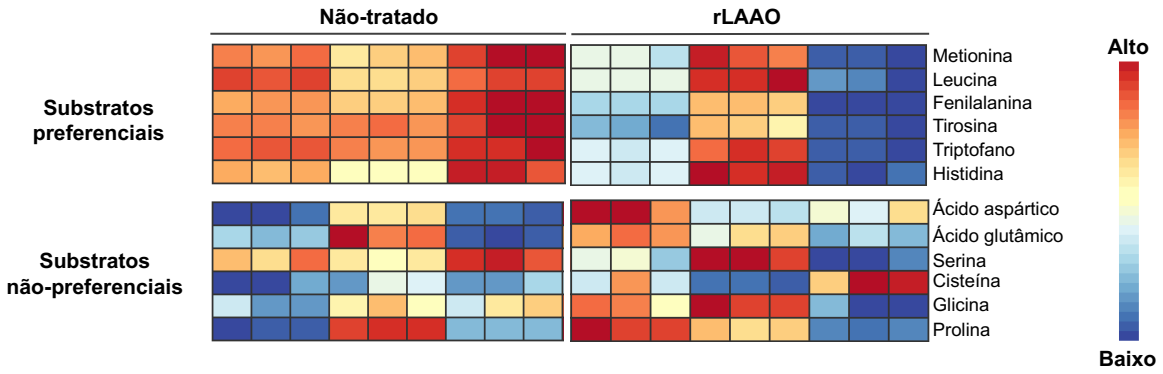
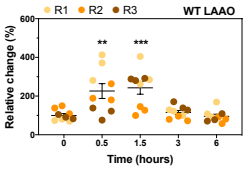


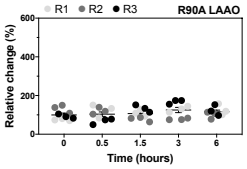
Figura 48: Comparação dos níveis de aminoácidos descritos como substratos preferenciais ou não da LAAO. *Heatmap* construído na plataforma MetaboAnalyst, selecionando os aminoácidos de interesse. **Não tratado:** NHEKs que não receberam nenhum tratamento. **rLAAO:** NHEKs tratados com 2 EC_{50} da rLAAO por 3 horas. Baixos níveis dos metabólitos estão representados por cores próximas ao azul, enquanto níveis mais altos são representados por cores próximas ao vermelho. Cada coluna indica uma replicata experimental de cada uma das replicatas biológicas (n=3).

Por último, a análise dos outros compostos contendo aminas biogênicas em queratinócitos demonstrou um aumento nos níveis da maioria dos metabólitos, nos tempos iniciais de tratamento (0,5 h e 1,5 h). Os compostos significativamente elevados foram: hidroxiprolina, etanolamina, ácido β-amino isobutírico, cistationina, homoserina, hidroxilisina, ornitina, ácido α-aminobutírico, fosfoserina, sarcosina, taurina, ácido ɣ-aminobutírico, glutationa, ácido oftálmico, triptamina, alantoína, prutescina, LNMMA, glicilglicina e o-fosfoetanolamina (**Figura 49**). As diferenças em relação ao controle foram variadas, com alguns compostos mais aumentados que outros. Porém, essa variedade de metabólitos afetados sugere que os queratinócitos foram mais susceptíveis à ação da rLAAO do que as células endoteliais.

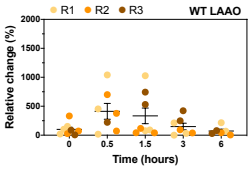
A $rLAAO^{R90A}$, por sua vez, não apresentou efeito tão expressivo quanto a rLAAO, porém causou o aumento dos níveis de hidroxilisina, fosfoserina, glutationa, ácido oftálmico, glicilglicina e o-fosfoetanolamina, todos eles após 3 horas de tratamento (**Figura 49**).

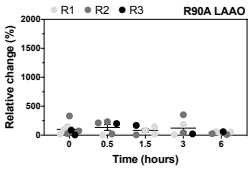
HIDROXIPROLINA



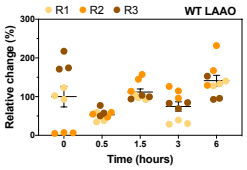


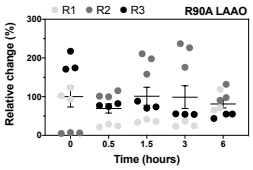
CARNOSINA



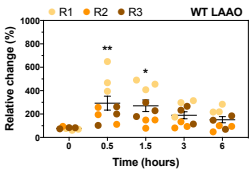


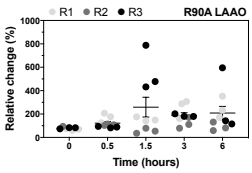
CISTINA



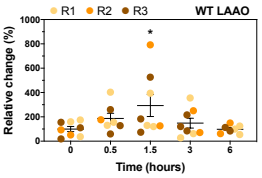


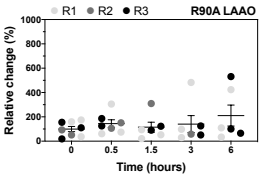
ETANOLAMINA



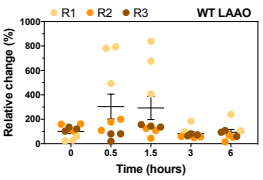


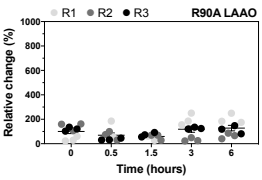
ÁCIDO β-AMINO ISOBUTÍRICO



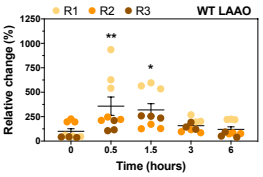


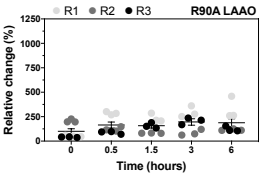
CITRULINA



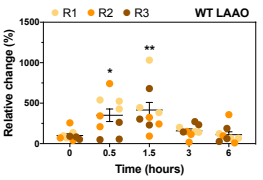


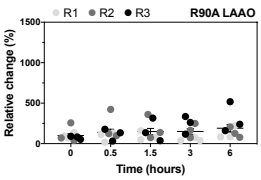
CISTATIONINA



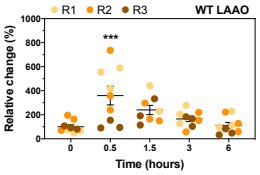


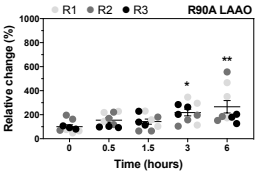
HOMOSERINA



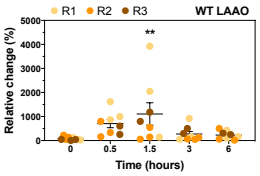


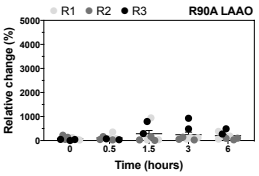
HIDROXILISINA



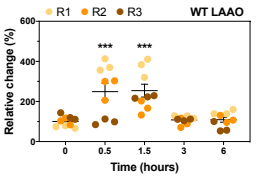


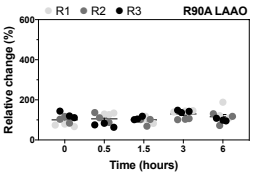
ORNITINA



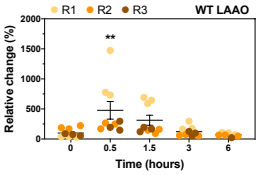


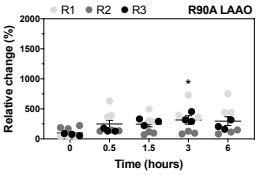
ÁCIDO α-AMINOBUTÍRICO



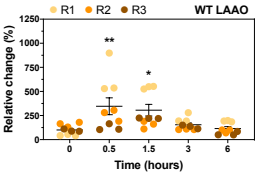


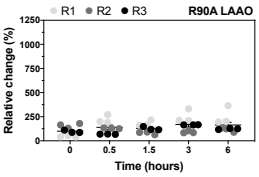
FOSFOSERINA



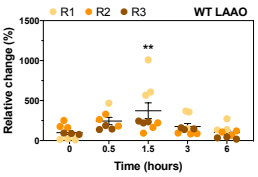


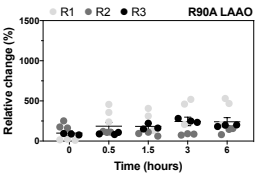
SARCOSINA



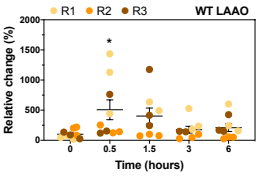


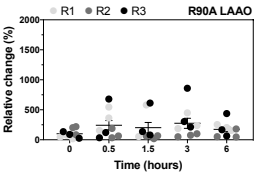
TAURINA



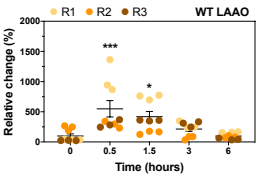


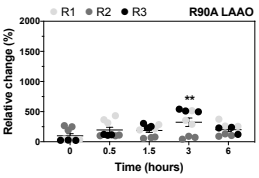
ÁCIDO γ-AMINOBUTÍRICO



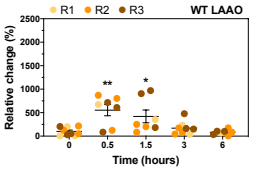


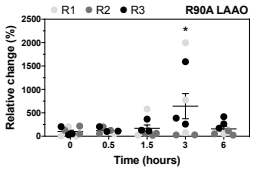
GLUTATIONA



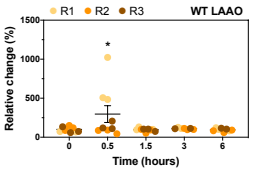


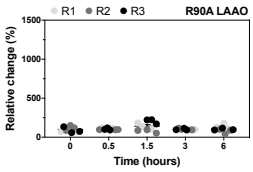
ÁCIDO OFTÁLMICO



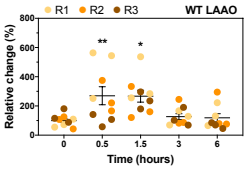


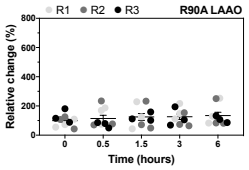
TRIPTAMINA



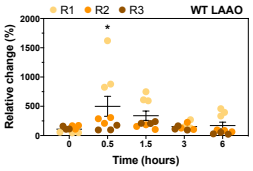


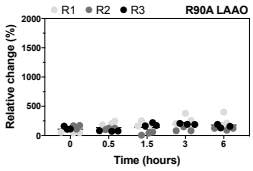
ALANTOÍNA



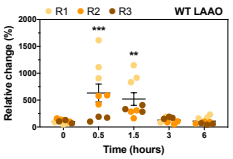


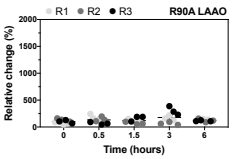
PUTRESCINA



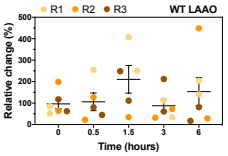


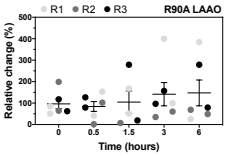
LNMMA



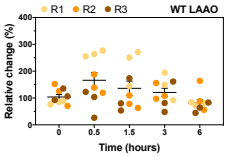


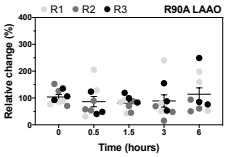
OCTOPAMINA



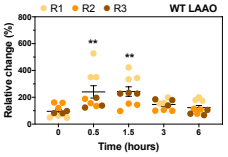


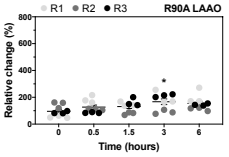
TIRAMINA





GLICILGLICINA





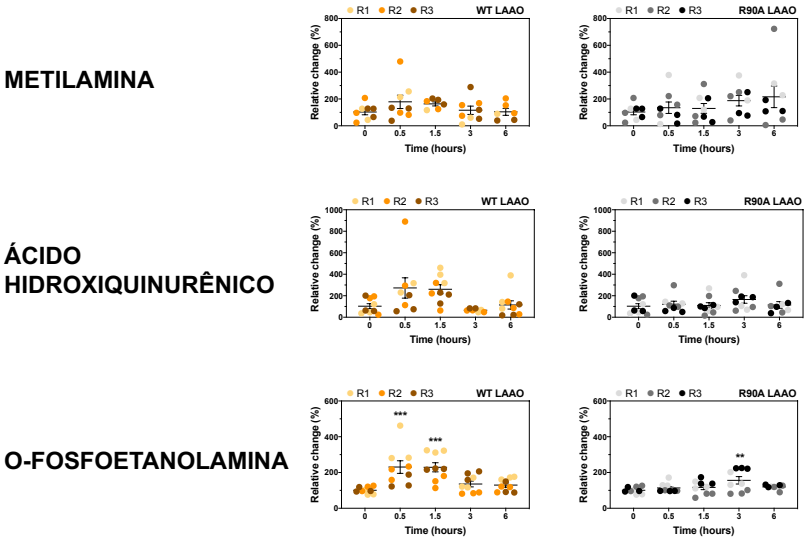


Figura 49: Quantificação de compostos com aminas biogênicas identificados por UPLC-MS/MS em queratinócitos. NHEKs foram tratados com 2 EC_{50} de rLAAO ou $rLAAO^{R90A}$ por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas. O lisado celular foi obtido adicionando-se metanol, as amostras foram derivatizadas utilizando o reagente AccQTag Ultra (Waters) e submetidas a análises por UPLC-MS/MS, utilizando uma abordagem do tipo *targeted*. Os dados foram coletados, normalizados e analisados estatisticamente por one-way ANOVA (valor $p < 0.05$). **R1, R2 e R3:** replicatas 1, 2 e 3, respectivamente. **WT LAAO:** rLAAO. **R90A LAAO:** $rLAAO^{R90A}$.

As análises de enriquecimento baseadas nos compostos contendo aminas biogênicas indicaram, novamente, a regulação de vias de biossíntese e metabolismo de lipídeos, metabolismo de aminoácidos e de compostos como glutationa e piruvato (**Figura 50**).

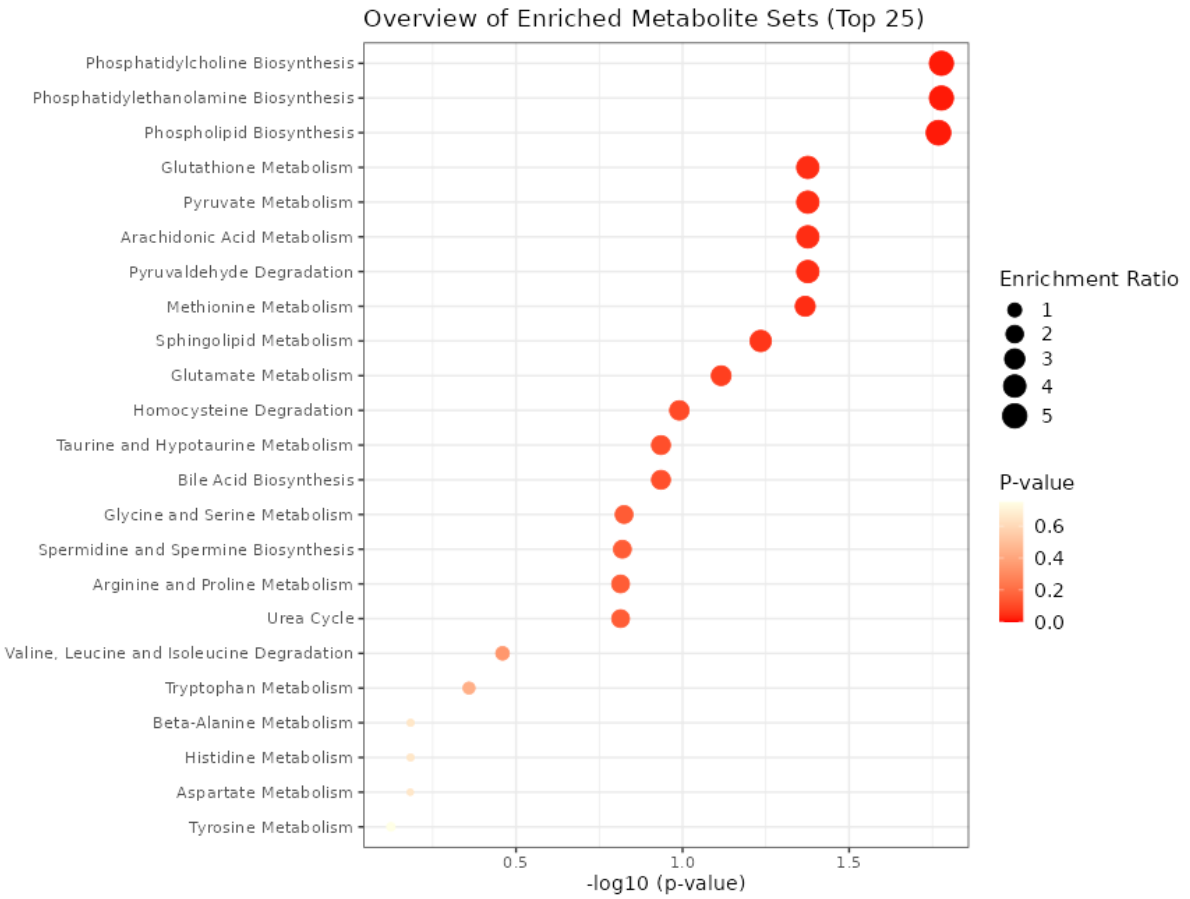


Figura 50: Análise de enriquecimento de vias metabólicas em queratinócitos após tratamento com rLAAO. Os valores de porcentagem de cada componente identificado nas análises de UPLC-MS/MS em NHEKs tratados com rLAAO por 3 horas foram submetidos a análise de enriquecimento na plataforma MetaboAnalyst, integrada ao banco de dados SMPDB. As porcentagens foram comparadas às das células não-tratadas (valor p < 0,05 foi considerado como significativo).

A análise dos compostos com maior diferença significativa demonstrou que os níveis desses metabólitos estavam relativamente aumentados nos queratinócitos tratados com rLAAO. Eles foram: etanolamina, glicilglicina, hidroxilisina, glutationa e sarcosina (**Figura 51**).

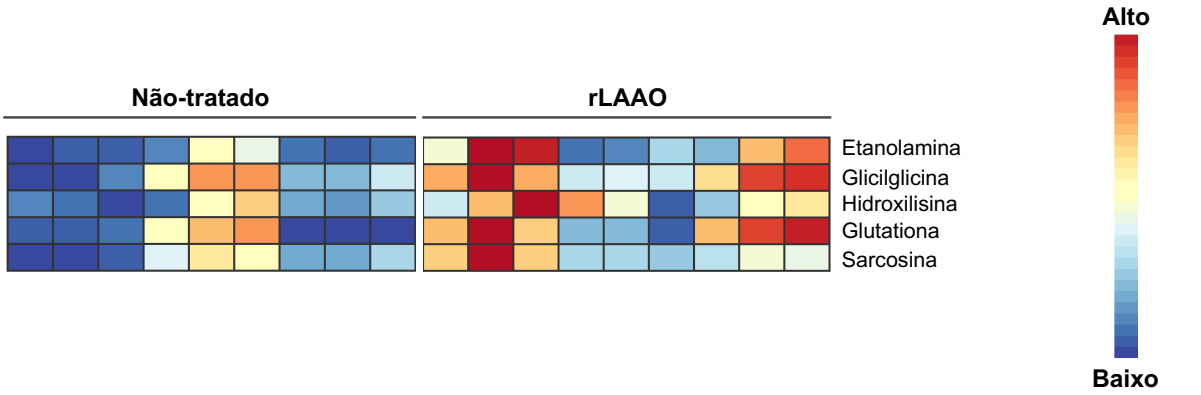


Figura 51: Comparação dos níveis de compostos com aminas biogênicas em queratinócitos. *Heatmap* construído na plataforma MetaboAnalyst, selecionando os compostos de interesse. **Não tratado:** NHEKs que não receberam nenhum tratamento. **rLAAO:** NHEKs tratados com 2 EC_{50} da rLAAO por 3 horas. Baixos níveis dos metabólitos estão representados por cores próximas ao azul, enquanto níveis mais altos são representados por cores próximas ao vermelho. Cada coluna indica uma replicata experimental de cada uma das replicatas biológicas (n=3).

As **Tabelas 19 e 20** resumem os principais processos identificados nas análises de enriquecimento como possivelmente afetados pela rLAAO, em células endoteliais e em queratinócitos, respectivamente.

Tabela 19: Possíveis vias do metabolismo afetadas em HDMECs pelo tratamento com rLAAO. Análise de enriquecimento realizada *online* na plataforma MetaboAnalyst, utilizando as porcentagens de aminoácidos e aminas biogênicas obtidas após análises por UPLC-MS/MS.

Processos detectados no meio de cultura		Processos detectados na célula	
METABOLISMO	**BIOSSÍNTESE**	**METABOLISMO**	**BIOSSÍNTESE**
Fenilalanina	Catecolaminas	Fenilalanina	Catecolaminas
Tirosina	Hormônio Tireoidiano	Tirosina	Hormônio Tireoidiano
Alanina	Ácidos biliares	Arginina	Ácido biliar
Metionina	Espermidina e Espermina	Prolina	Espermidina e Espermina
Selenoaminoácidos	Fosfolipídeos	Biotina	
Taurina e Hipotaurina		Taurina e Hipotaurina	

Tabela 20: Possíveis vias do metabolismo afetadas em NHEKs pelo tratamento com rLAAO. Análise de enriquecimento realizada *online* na plataforma MetaboAnalyst, utilizando as porcentagens de aminoácidos e aminas biogênicas obtidas após análises por UPLC-MS/MS.

Processos detectados no meio de cultura			Processos detectados na célula	
METABOLISMO	BIOSSÍNTESE	DEGRADAÇÃO	METABOLISMO	BIOSSÍNTESE
Arginina	Catecolaminas	Piruvaldeído	Fenilalanina	Catecolaminas
Prolina	Hormônio Tireoidiano		Tirosina	Hormônio Tireoidiano
Glutamato	Espermidina e Espermina		Serina	Espermidina e Espermina
Betaína			Glicina	Fosfatidilcolina
Glutationa			Betaína	Fosfatidiletanolamina
Piruvato			Esfingolipídeos	Fosfolipídeos
Ácido aracdônico				

4.3.3. *Análise do lipidoma de células tratadas com LAAO recombinante*

Os lipídeos são outra classe de metabólitos que também podem fornecer uma leitura do estado metabólico das células. Por esse motivo e pelas observações dos dados do proteoma e de aminas biogênicas, que indicaram a regulação de vias relacionadas a lipídeos, eles também foram alvo de estudo neste trabalho. O lipidoma de queratinócitos foi avaliado e a metodologia utilizada está resumida na **Figura 10** da seção 3.13**.** A abordagem utilizada nesse caso foi do tipo *untargeted*. Os dados foram analisados na plataforma MetaboAnalyst e a provável identidade dos lipídeos foi acessada no banco de dados do portal LIPID MAPS. Como as análises ainda estão em andamento, somente os resultados referentes às células NHEKs tratadas com rLAAO serão apresentados.

Primeiramente, a fim de avaliar a dispersão dos dados e variação entre as replicatas, uma Análise de Componentes Principais foi realizada. Esse tipo de análise multivariada é utilizado para avaliação de grandes conjuntos de dados e visualização da separação entre os grupos. Considerando as células tratadas com rLAAO por diferentes tempos, observou-se que cada grupo de tratamento se agrupa no mesmo

cluster, com pouca variação entre as replicatas (**Figura 52**). O grupo de NHEKs tratados por 0,5 horas (em azul escuro) é o que está mais distante do grupo não-tratado (em vermelho), enquanto o grupo de células tratadas por 6 horas (em amarelo) é o que está mais próximo do grupo controle. Essa análise também é utilizada para identificação de *outliers* no conjunto de dados e, dentre esses valores, nenhum *outlier* foi observado.

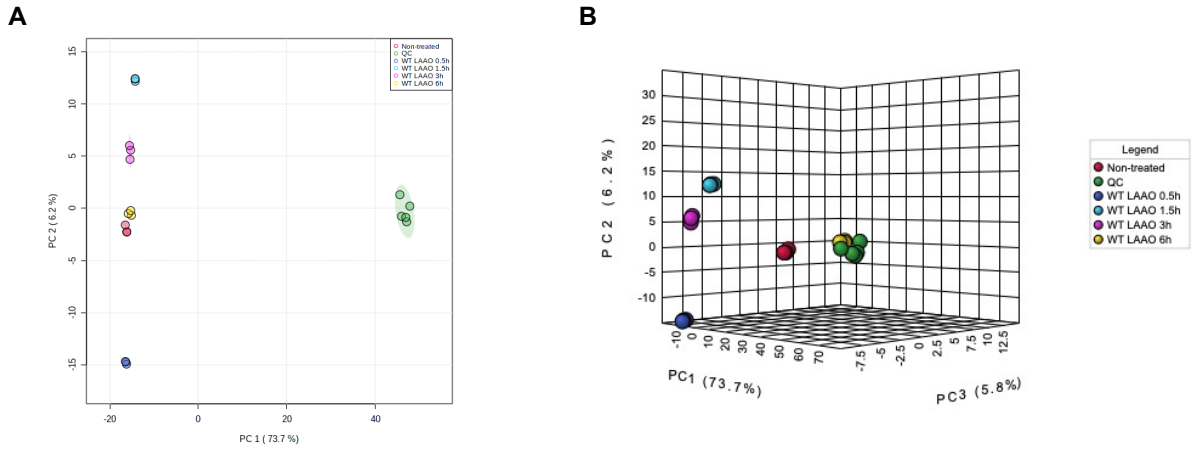


Figura 52: Análise de Componentes Principais dos diferentes grupos de tratamento dos queratinócitos. PCA em representação 2D (A) e 3D (B). NHEKs foram tratados com 2 EC_{50} de rLAAO por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas e o lisado celular foi preparado através da adição de metanol. As amostras foram submetidas a UPLC-MS/MS e os dados obtidos foram analisados na plataforma MetaboAnalyst.

Em seguida, cada tempo de tratamento foi comparado às células controle para avaliação de diferenças na regulação entre os *features* de cada grupo, e esses dados foram representados na forma de *volcano-plots* (**Figura 53**). De forma pré-definida, a plataforma MetaboAnalyst destaca todos os pontos que apresentam valor $p < 0,05$ ($-\log10(p) = 1,3$) e *fold-change* ≤ -1 ou ≥ 1. Entretanto, os parâmetros utilizados nas análises anteriores (valor $p < 0,05$ e *fold-change* ≤ -2 ou ≥ 2) foram mantidos, e, portanto, somente *features* que apresentam esses valores foram considerados significativos (destacados em cada gráfico dentro de um quadrado).

Nas células tratadas com rLAAO, poucos *features* apresentaram regulação significativa (**Figura 53**). O tratamento por 1,5 h foi o que apresentou maior número de compostos *down-regulated* (8 features) (**Figura 53B**), enquanto os tempos de 0,5 h (**Figura 53A**) e 3 horas (**Figura 53C**) demonstraram um maior número de possíveis lipídeos *up-regulated* (8 *features*).

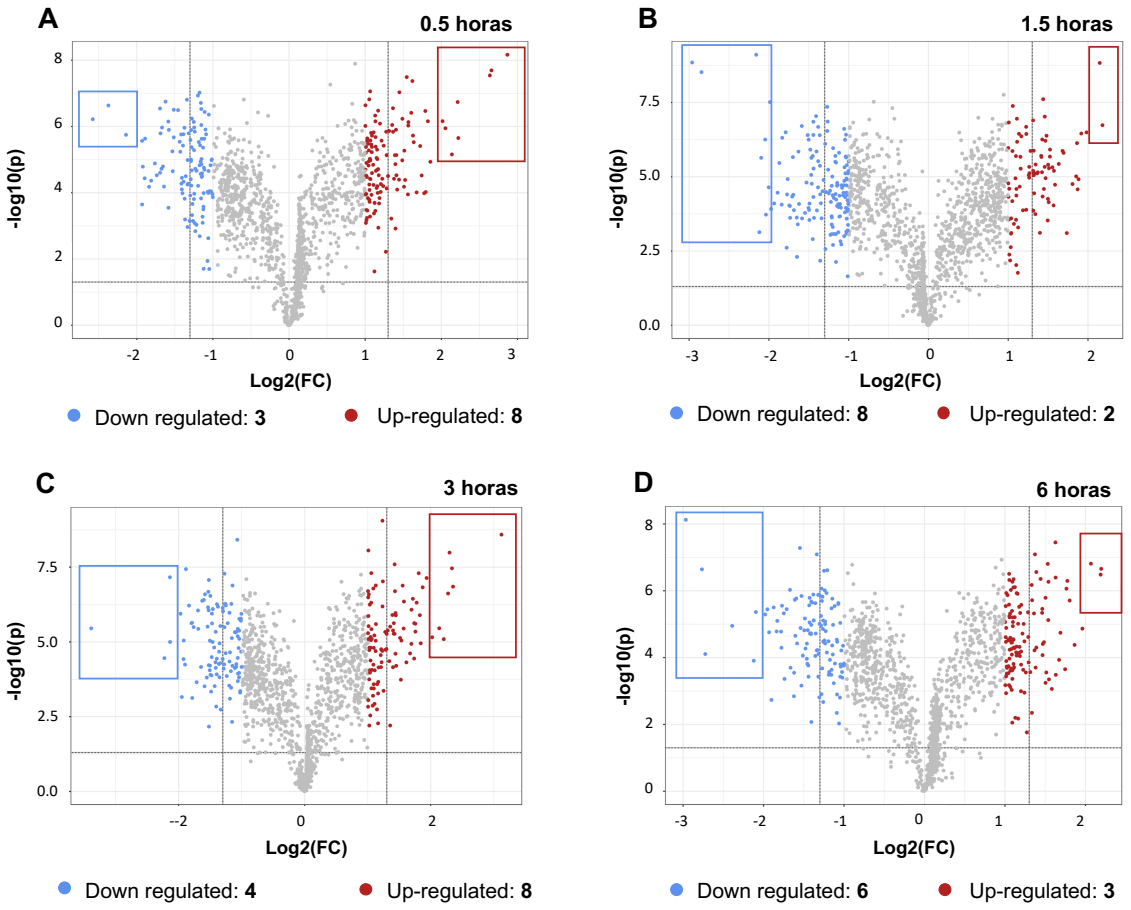


Figura 53: Gráficos de *volcano-plot* de queratinócitos tratados com rLAAO em diferentes tempos. NHEKs foram tratados com 2 EC_{50} de rLAAO por 0,5, 1,5, 3 ou 6 horas e o lisado celular foi preparado através da adição de metanol. As amostras foram submetidas a UPLC-MS/MS e os dados obtidos foram analisados na plataforma MetaboAnalyst (valor $p < 0,05$ e *fold-change* ≤ -2 ou ≥ 2 foram considerados significativos).

Em seguida, a fim de compreender melhor quais lipídeos estão alterados nessas células, os *features* que apresentaram diferença estatística em relação às células não-tratadas foram selecionados para sua identificação putativa através do

banco de dados LIPID MAPS, utilizando o valor de massa desses *features*. É importante destacar que essa análise é considerada putativa, pois somente a massa não é suficiente para confirmar a identidade do lipídeo. Para isso, seria necessária uma avaliação por espectrometria de massa em tandem, para análise do espectro de fragmentação de cada um dos lipídeos. Contudo, essa inferência utilizando o banco de dados é relevante, no sentido de auxiliar na determinação de quais *features* devem ser melhor investigados, diante do grande conjunto de dados obtido no lipidoma.

As **Tabelas 21 e 22** resumem as principais informações relacionadas aos lipídeos putativos mais significativos: massa, nome, fórmula química, identidade (ID), categoria e classe as quais pertencem, de acordo com o banco de dados do LIPID MAPS.

Foi possível observar que a principal categoria de lipídeos regulados negativamente nos queratinócitos tratados com a rLAAO foram os glicerofosfolipídeos, os quais incluíram 6 diferentes classes (glicerofosfoserinas, glicerofosfatos, glicerofosfoetanolaminas, glicerofosfolipídeos oxidados, glicerofosfogliceróis e glicerofosfoinositóis). Além disso, lipídeos das categorias de glicerolipídeos, esfingolipídeos e ácidos graxos também parecem estar *down-regulated* nessas células (**Tabela 21**).

Tabela 21: Lista dos lipídeos putativos regulados negativamente em queratinócitos tratados com rLAAO. Os valores de massa dos *features* que apresentaram diferenças significativas nas análises estatísticas foram utilizados para busca no banco de dados LIPID MAPS. **ID:** Identidade. A principal categoria de lipídeos regulados está destacada em azul na tabela.

DOWN-REGULATED					
Massa	**Nome**	**Fórmula**	**ID**	**Categoria**	**Classe**
401.26799	MG 22:6	C25H38O4	LMGL01010027	Glicerolipídeos	Monoacilgliceróis
797.66737	TG 48:4	C51H90O6	LMGL03013235	Glicerolipídeos	Triacilgliceróis
826.50237	PS 40:10	C46H70NO10P	LMGP03010455	**Glicerofosfolipídeos**	Glicerofosfoserinas
739.41132	PA 40:10	C43H65O8P	LMGP10010453	**Glicerofosfolipídeos**	Glicerofosfatos
697.47537	PA 36:3	C39H71O8P	LMGP10010134	**Glicerofosfolipídeos**	Glicerofosfatos
670.41499	PE 31:3	C36H66NO8P	LMGP02010392	**Glicerofosfolipídeos**	Glicerofosfoetanolaminas
691.34624	PG 28:3;O2	C34H61O12P	LMGP20060002	**Glicerofosfolipídeos**	Glicerofosfolipídeos oxidados
607.35828	PG 23:2;O	C29H53O11P	LMGP20060022	**Glicerofosfolipídeos**	Glicerofosfolipídeos oxidados
481.25195	LPG 16:1	C22H43O9P	LMGP04050013	**Glicerofosfolipídeos**	Glicerofosfogliceróis
699.43938	PG 31:4	C37H65O10P	LMGP04010081	**Glicerofosfolipídeos**	Glicerofosfogliceróis
647.33493	LPI 22:4	C31H53O12P	LMGP06050013	**Glicerofosfolipídeos**	Glicerofosfoinositóis
548.48083	Cer 34:3;O3	C34H63NO4	LMSP02010077	Esfingolipídeos	Ceramidas
427.31052	WE 24:2;O4	C24H44O6	LMFA07010900	Ácidos graxos	Ácidos graxos
363.17943	FA 20:6;O4	C20H28O6	LMFA03020047	Ácidos graxos	Eicosanóides

Em relação aos lipídeos regulados positivamente, houve o aparecimento da categoria de esteróides, a qual não foi encontrada na lista de moléculas reguladas negativamente. Além disso, glicerofosfolipídeos também parecem estar *up-regulated*, porém somente os das classes de glicerofosfoetanolaminas e glicerofosfogliceróis. Glicerolipídeos, esfingolipídeos e ácidos graxos também foram identificados, assim como no grupo dos lipídeos *down-regulated*, porém com representantes de classes diferentes (**Tabela 22**).

Tabela 22: Lista dos lipídeos putativos regulados positivamente em queratinócitos tratados com rLAAO. Os valores de massa dos *features* que apresentaram diferenças significativas nas análises estatísticas foram utilizados para busca no banco de dados LIPID MAPS. **ID:** Identidade. A principal categoria de lipídeos regulados está destacada em vermelho na tabela.

UP-REGULATED					
Massa	**Nome**	**Fórmula**	**ID**	**Categoria**	**Classe**
1007.77183	TG 64:11	C67H108O6	LMGL03012482	Glicerolipídeos	Triacilgliceróis
601.48113	DG 35:4	C38H66O5	LMGL02010375	Glicerolipídeos	Diacilgliceróis
648.53607	PE O-30:0	C35H72NO7P	LMGP02020105	Glicerofosfolipídeos	Glicerofosfoetanolaminas
776.51637	PE 39:6	C44H76NO8P	LMGP02011210	Glicerofosfolipídeos	Glicerofosfoetanolaminas
777.50551	PG O-38:7	C44H75O9P	LMGP04030092	Glicerofosfolipídeos	Glicerofosfogliceróis
840.52777	IPC 36:0;O4	C42H84NO13P	LMSP03030037	Esfingolipídeos	Fosfoesfingolipídeos
300.16086	CAR 8:1;O	C15H27NO5	LMFA07070038	Ácidos graxos	Ésteres graxos
167.10028	FA 10:2	C10H16O2	LMFA01030200	Ácidos graxos	Ácidos graxos e conjugados
473.38934	ST 30:2;O4	C30H50O4	LMST01031245	**Esteróides**	Esteróis
419.34952	ST 27:0;O3	C27H48O3	LMST01010510	**Esteróides**	Esteróis
365.13152	ST 18:4;O3;S	C18H22O6S	LMST05020040	**Esteróides**	Esteróis
299.23234	ST 21:2;O	C21H32O	LMST02030125	**Esteróides**	Esteróides

Para facilitar a visualização, todas as categorias e classes de lipídeos identificadas foram representadas na **Figura 54**. Apenas as diferenças de regulação que foram exclusivas para aquela classe foram representadas através de setas (seta azul: *down-regulated*; seta vermelha: *up-regulated*). Por exemplo, as ceramidas estão reguladas apenas negativamente, enquanto os esfingolipídeos estão regulados somente de modo positivo. Já na categoria de glicerofosfoetanolaminas e glicerofosfoglicerol, foram encontrados lipídeos regulados de ambas as formas (negativa e positiva), portanto as setas não foram utilizadas nesse caso. Porém, todos os outros lipídeos da categoria de glicerofosfolipídeos foram regulados apenas negativamente. Outra diferença notável foi em relação aos esteróides, os quais foram encontrados sendo regulados apenas de forma positiva (**Figura 54**).

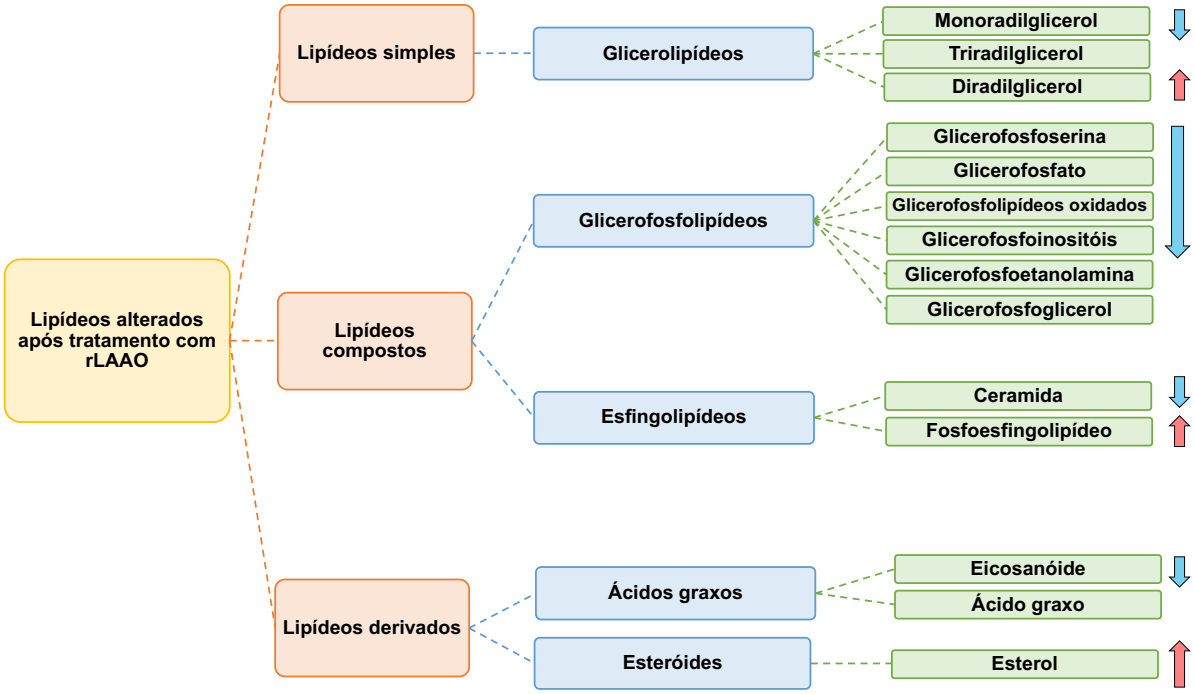


Figura 54: Lipídeos putativos alterados após tratamento de queratinócitos com a rLAAO. Os lipídeos foram representados de acordo com as classificações do banco de dados LIPID MAPS. Três grupos de lipídeos foram identificados como significativamente regulados: Simples, Compostos e Derivados. As categorias de cada grupo estão representadas em azul e as classes pertencentes a cada categoria estão representadas em verde. **Setas azuis:** *Down-regulated*. **Setas vermelhas:** *Up-regulated*.

Discussão

5. DISCUSSÃO

O envenenamento local causado pelos venenos botrópicos ocorre através de mecanismos diversos, pelos quais as toxinas levam à geração de dano tecidual, com consequente ativação de diferentes células e mediadores inflamatórios (MAMEDE et al., 2020b). A reação inflamatória aguda associada à ineficácia do antiveneno em neutralizar os efeitos locais agravam ainda mais a severidade desses acidentes (GUTIÉRREZ et al., 2017). Os sinais e sintomas locais têm sido amplamente investigados através de variadas metodologias, a fim de caracterizar esses efeitos (DE ALMEIDA et al., 2020; FREITAS-DE-SOUSA et al., 2017; GUTIÉRREZ, 2018). Entretanto, a maior parte desses trabalhos utiliza modelos animais e, portanto, não foca na análise molecular e metabólica desses processos.

Experimentos utilizando células em cultura têm sido empregados no estudo dos venenos e toxinas e têm demonstrado correlação entre os dados obtidos e os efeitos observados *in vivo* (DE SOUZA et al., 2015; GUTIÉRREZ et al., 2021). Sendo assim, com base na abordagem dos 3R's (*Reduce, Refine, Replace*) (RUSSELL; BURCH, 1959), ensaios utilizando modelos celulares podem auxiliar em análises de caracterização.

O presente estudo teve como objetivo inicial avaliar a citotoxicidade do veneno de *B. atrox* em células da pele humana para, posteriormente, identificar quais proteínas do veneno podem estar relacionadas com o envenenamento local. Foi observado que o veneno de *B. atrox* reduz a viabilidade de queratinócitos e afeta a morfologia das células, causando dissociação e retração celular. Nosso grupo demonstrou anteriormente que o veneno de *B. atrox* reduz a viabilidade de diferentes linhagens celulares (GUERRA-DUARTE et al., 2015). Esse efeito é consistente com os resultados observados para outros venenos botrópicos, como *B. alternatus* e *B.*

moojeni, que afetaram microfilamentos de actina e a localização de E-caderina e ZO-1, importantes proteínas de junção celular (COLLARES-BUZATO; CRUZ-HÖFLING, 2014; NASCIMENTO et al., 2007b).

Para determinar quais toxinas presentes no veneno são as principais responsáveis pelos efeitos observados, análises de espectrometria de massa de frações citotóxicas do veneno de *B. atrox* foram realizadas. Através dos dados obtidos, concluiu-se que as principais proteínas envolvidas na citotoxicidade do veneno em queratinócitos pertencem às famílias de Metaloproteases (SVMPs) e L-aminoácido oxidases (LAAOs).

As SVMPs de venenos botrópicos são envolvidas principalmente nos sintomas hemorrágicos desencadeados após o envenenamento, caracterizados pelo enfraquecimento e rompimento de endotélio, seguido de extravasamento de sangue (ESCALANTE et al., 2011). Essas toxinas são capazes de comprometer a viabilidade e induzir apoptose em células endoteliais, o principal tipo celular encontrado nos vasos sanguíneos (DÍAZ et al., 2005; SCHATTNER et al., 2005). Sabe-se que as SVMPs podem afetar a função de proteínas importantes para adesão das células à matriz extracelular (MEC), tais como a integrina $\alpha 2\beta 1$ (SELISTRE-DE-ARAUJO et al., 2005), além de clivar colágeno e fibronectina. Essa atividade catalítica pode culminar no enfraquecimento da adesão e soltura das células. Os mecanismos exatos pelos quais as Metaloproteases causam morte celular não são completamente elucidados, mas sugere-se que a citotoxicidade deve ocorrer por *anoikis*, um tipo de apoptose que acontece em consequência da falta de adesão das células ao substrato (ESCALANTE et al., 2011; TANJONI et al., 2005).

As LAAOs, por sua vez, apresentam diversas atividades biológicas e, *in vivo*, parecem estar relacionadas ao desenvolvimento de dermonecrose (COSTAL-

OLIVEIRA et al., 2019). É importante ressaltar que muitos dos estudos envolvendo a LAAO tem como objetivo investigar seu potencial terapêutico, na maior parte das vezes como molécula antitumoral. Sendo assim, vários trabalhos têm analisado a citotoxicidade da LAAO frente a linhagens de células cancerígenas e, o provável mecanismo de ação dessa toxina tem sido descrito utilizando dados obtidos principalmente nessas células (HIU; YAP, 2020).

A hipótese principal é de que o H_2O_2 liberado leva ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio, que danificam as membranas celulares, e esse efeito pode ser ainda maior devido a suposta interação da LAAO com as membranas plasmáticas (ABDELKAFI-KOUBAA et al., 2016; RIBEIRO et al., 2016). Esse estresse oxidativo leva à dissipação do potencial de membrana mitocondrial, que induz a translocação de citocromo C para o citoplasma. O citocromo C então ativa caspase-9, um iniciador presente na via mitocondrial (ou intrínseca) de apoptose (SINGH; SHARMA; SINGH, 2007), que parece ser o mecanismo de morte predominante nestas células. Outras proteínas apoptóticas, como p53, Bax e caspases também parecem estar reguladas durante os efeitos da LAAO (ALVES et al., 2008b; ZHANG; WEI, 2007). Além disso, a via extrínseca, que requer a interação com receptores de morte celular, também é ativada pela LAAO, culminando na clivagem de diferentes tipos de caspases. Entretanto, os mecanismos pelos quais isso ocorre ainda são incertos (HIU; YAP, 2020). Esses efeitos apoptóticos também foram desencadeados por LAAOs isoladas de outros venenos, cuja incubação com diferentes células levou à fragmentação de DNA e alterações em genes relacionados a vias apoptóticas, autofágicas, de ciclo celular e de reparo de DNA (COSTA et al., 2017, 2018a; FUNG; LEE; TAN, 2015; SAMEL et al., 2006). Também parece haver uma transição de apoptose para necrose, dose-dependente, que possivelmente está relacionada aos níveis de H_2O_2, visto que

o número de células necróticas é reduzido após tratamento com catalase (ANDE et al., 2006).

Esses dados foram corroborados por Costal-Oliveira e colaboradores (2019) em queratinócitos normais humanos, que demonstraram que a LAAO nativa de *B. atrox* causa morte celular através de mecanismos sequenciais após desencadear autofagia, apoptose e necrose nas células (COSTAL-OLIVEIRA et al., 2019). Para prosseguir com a caracterização dos efeitos dessa proteína, decidiu-se, neste trabalho de tese, produzi-la em sua forma recombinante, devido às dificuldades encontradas para sua obtenção a partir do veneno.

Algumas tentativas para a produção de LAAOs em sua forma recombinante vêm sendo realizadas, porém as metodologias ainda precisam ser melhoradas para a obtenção da proteína ativa e em maiores quantidades. A sequência codificante da LAAO de *Calloselasma rhodostoma* foi clonada em um vetor de expressão para *Pichia pastoris* e a proteína obtida apresentou atividades similares à nativa, porém o rendimento final foi baixo, de ≅ 0,25 mg/L (KOMMOJU; MACHEROUX; GHISLA, 2007b). Contudo, Hess e colaboradores demonstraram que é possível a obtenção de LAAO ativa em altas quantidades, após obterem a LAAO do fungo *Hebeloma cylindrosporum* em concentrações industriais, também utilizando *P. pastoris,* mas por fermentação em biorreatores (HESS et al., 2020). Na presente tese, estima-se que aproximadamente 0,6 mg/L da LAAO de *B. atrox* foram recuperados após a etapa de purificação, o que é mais que o dobro do que Kommoju *et. al* (2007) obtiveram. Entretanto, esse rendimento é ainda considerado baixo e estratégias para aumentá-lo estão sendo investigadas por nosso grupo.

Torii e colaboradores produziram variantes recombinantes da LAAO de *Crotalus atrox*, a fim de investigar a importância da região amino-terminal, do domínio

de ligação de ADP ao FAD e da região carboxi-terminal na atividade catalítica dessa enzima. As deleções dessas regiões afetaram a secreção de todas as proteínas mutantes para o sobrenadante de células HEK-293T e comprometeu sua atividade enzimática em todas as amostras, demonstrando a importância dessas porções para a atividade de LAAO (TORII et al., 2000b). Em relação ao sítio ativo da enzima, His223 foi descrito como potencialmente importante para a atividade catalítica, uma vez que mudanças conformacionais são evidentes nesse resíduo durante a catálise (MOUSTAFA et al., 2006). Para estudar a importância de His223, Chen e colaboradores produziram variantes de LAAO de *Daboia russelii* em *P. pastoris* e os resultados demonstraram que este resíduo não é indispensável para a catálise. Os autores sugerem que ele possivelmente está mais envolvido na regulação da especificidade a substratos, uma vez que os mutantes apresentaram diferentes níveis de atividade frente aos aminoácidos testados (CHEN et al., 2012b).

Outro resíduo descrito como potencialmente importante para a atividade enzimática da LAAO é Arg90, presente no sítio ativo da enzima e está envolvido na ligação ao substrato (ULLAH, 2020b). Esse resíduo interage com os aminoácidos e mantém a orientação específica necessária para a catálise (GEORGIEVA et al., 2011). Ao contrário de His223, os resultados dessa tese apontam que o resíduo Arg90 é fundamental para a atividade de L-aminoácido oxidase, uma vez que a variante produzida rLAAO^{R90A} não apresenta atividade catalítica frente ao aminoácido L-Leucina, não é capaz de reduzir a viabilidade das células testadas e seu efeito na estrutura celular é muito menor, quando comparado à LAAO que apresenta a sequência nativa da proteína (rLAAO). Além disso, os efeitos da rLAAO^{R90A} no proteoma, assim como nos aminoácidos e aminas biogênicas quantificados, são significativamente menores, quando comparados aos de células tratadas com rLAAO.

Outro ponto importante na produção de proteínas recombinantes é avaliar se elas induzem efeitos equivalentes aos das proteínas nativas purificadas a partir do veneno. Sendo assim, a rLAAO produzida neste trabalho foi comparada com a LAAO de *B. atrox* caracterizada anteriormente por Costal-Oliveira (2017). A LAAO purificada do veneno reduziu a viabilidade de queratinócitos de forma concentração-dependente e a EC_{50} foi de 5,1 μg/mL (COSTAL-OLIVEIRA, 2017). A rLAAO, por sua vez, apresentou EC_{50} menor, de 1,47 μg/mL. A citotoxicidade reduzida na amostra de LAAO isolada do veneno (ou seja, maior quantidade de proteína é necessária para reduzir a viabilidade a 50%), pode ser explicada pela perda de atividade da enzima após as etapas cromatográficas e sua estocagem. Os processos para obtenção da LAAO recombinante são menos bruscos e, portanto, devem afetar menos a atividade da enzima.

Em relação às alterações causadas na estrutura celular de queratinócitos, os efeitos observados foram similares nos dois estudos. A LAAO isolada do veneno causou desorganização da E-caderina após 3 horas de tratamento e consequente diminuição dos níveis dessa proteína após 6 horas. Essa redução também foi observada para a LAAO recombinante, porém as alterações causadas pela rLAAO ocorreram mais rapidamente (após 1,5 horas de tratamento). Aglomerados de E-caderina também foram observados em ambos os tratamentos. Por outro lado, os efeitos causados na actina das células são diferentes após 3 horas de tratamento, visto que nas células que receberam a LAAO do veneno há a completa desorganização dos feixes de actina. Nas células tratadas com rLAAO, observa-se a presença de alguns prolongamentos de actina, mas esse efeito não é tão acentuado. Apenas a intensidade da proteína está substancialmente reduzida. Todavia, apesar

das diferenças encontradas, sugere-se que os efeitos da LAAO recombinante são análogos aos da LAAO nativa obtida a partir do veneno.

Em relação às células endoteliais, poucos estudos analisam o efeito de LAAOs nesse tipo celular e, até o momento, não foi encontrado nenhum trabalho que avalie as moléculas de adesão dessas células após tratamento com enzimas dessa família. Contudo, os dados encontrados na literatura corroboram a citotoxicidade observada no presente trabalho. O tratamento de células endoteliais (HUVECs) com LAAO de *B. jararacussu* também levou a uma redução da viabilidade celular, tanto em um modelo de monocultura, quanto quando cultivadas em co-cultura com uma linhagem celular de hepatocarcinoma (HepG2). Além disso, os autores também descrevem a indução de estresse oxidativo e genotoxicidade nas células endoteliais tratadas com esta LAAO (MACHADO et al., 2019b). Bhat e colaboradores (2021) demonstraram que LAAOs isoladas de *B. moojeni* e *B. atrox* induzem morte celular por apoptose e necrose em células endoteliais, além de apresentarem atividade anti-angiogênica *in vitro* e *in vivo* (BHAT et al., 2021).

A rLAAO^{R90A}, por sua vez, não foi capaz de causar mudanças relevantes na estrutura das células endoteliais. Entretanto, diferente do que se esperava, essa proteína alterou a morfologia de queratinócitos após tratamento, sugerindo que esse tipo celular pode ser mais sensível do que as HDMECs. Esses efeitos foram reduzidos se comparados aos desencadeados pelo tratamento com rLAAO, o que indica que Arg90 de fato é muito importante para a atividade da enzima, mas outros resíduos conservados no sítio catalítico também parecem estar envolvidos nas ações causadas pela LAAO. Além de Arg90, Gly464 e Tyr327 também interagem com o substrato através de ligações de hidrogênio para orientá-lo ao sítio catalítico da enzima e estabilizar o complexo enzima-substrato (GEORGIEVA et al., 2011; MITRA;

SHARMA; BHATTACHARYYA, 2015). Quando o resíduo de arginina é substituído por alanina, há uma redução considerável no tamanho da cadeia lateral, além da remoção da carga positiva, o que pode afetar a interação desse resíduo com o substrato. Todavia, a participação dos outros resíduos pode permitir uma atividade residual da enzima, que não é detectável no ensaio enzimático utilizado neste trabalho, mas suficiente para desencadear alterações quando em contato com seus alvos celulares por períodos mais longos. Outra explicação plausível seria uma citotoxicidade independente de catálise. Porém, nenhum estudo com essa abordagem foi realizado até o momento e, portanto, mais análises devem ser feitas a fim de determinar como a rLAAO^{R90A} afeta os queratinócitos.

A outra parte dessa tese focou na caracterização das alterações metabólicas que ocorrem em células tratadas com as amostras de LAAO recombinante. Esse tipo de análise ainda não é amplamente utilizada na área de toxinologia, porém pode auxiliar no entendimento dos mecanismos endógenos desencadeados pelos venenos e toxinas, além de possibilitar a descoberta de novos biomarcadores importantes durante o envenenamento. Técnicas para análise do metaboloma, proteoma e lipidoma baseadas em espectrometria de massa podem fornecer informações qualitativas e quantitativas, em larga escala, a respeito de diferentes moléculas envolvidas no metabolismo e funcionamento celular. Entre elas, podemos citar proteínas, peptídeos, aminoácidos, lipídeos, ácidos nucleicos, ácidos orgânicos, carboidratos, entre outros, os quais estão envolvidos em uma variedade de processos patofisiológicos (MONTI et al., 2019; WISHART, 2019). Alguns trabalhos têm sido realizados para análise do proteoma, metaboloma e lipidoma em amostras de soro ou plasma de animais envenenados com venenos de serpentes (HUANG et al., 2021; WASE et al., 2022), abelha (ZHAO et al., 2018), escorpião (ARJMAND et al., 2015;

ESCALONA et al., 2014) ou em amostras de casos humanos de envenenamento por vespas (YUAN et al., 2022). Entretanto, esse tipo de abordagem ainda não é comum para estudos dos efeitos causados pelos venenos de serpentes em humanos.

Na presente tese, primeiramente o proteoma de células tratadas com a LAAO foi analisado. Células endoteliais ou queratinócitos foram tratados por 3 horas com rLAAO ou rLAAO^{R90A}, e as amostras foram analisadas por espectrometria de massa. Os dados demonstram mais proteínas sendo reguladas nos queratinócitos do que em células endoteliais, reforçando a hipótese de que as células epiteliais são mais sensíveis à toxina, ao menos nas condições testadas. Além disso, as proteínas e vias identificadas variaram nos dois tipos celulares.

As HDMECs tratadas com rLAAO apresentaram 20 proteínas reguladas negativamente e 15 reguladas positivamente, de acordo com os critérios estatísticos definidos. Quando a identidade dessas proteínas é investigada no Uniprot, observa-se a presença de diferentes vias e funções celulares possivelmente afetadas. A título de exemplificação, no grupo das proteínas *down-regulated*, pode-se destacar a regulação da *Methylsterol monooxygenase 1*, envolvida no catabolismo de colesterol (YASUDA et al., 2015) e da *E3 ubiquitin-protein ligase*, que apresenta funções relacionadas a metilação de DNA e modificação de histonas (VAUGHAN et al., 2018). Já para as proteínas *up-regulated*, foram identificadas a *Ras-related protein Rab-22*, associada a endocitose e transporte de proteínas intracelulares (MAGADÁN et al., 2006), e a *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*, que está envolvida em muitos processos, através de vias de transdução de sinais, controlando proliferação e migração de células endoteliais (PRIMO et al., 2007; TANIYAMA et al., 2003).

Análises de enriquecimento utilizando a plataforma GOrilla foram realizadas para identificação de processos e funções celulares possivelmente afetados pela

LAAO. Diferentes vias foram encontradas e, vale ressaltar, que a polimerização de filamentos de actina e a ligação à caderina podem ser processos afetados, corroborando os dados de imunofluorescência apresentados neste trabalho. Além disso, vias de reparo e de ligação ao DNA, assim como direcionamento de proteínas ao retículo endoplasmático também parecem estar afetadas.

Já nas células endoteliais tratadas com rLAAO^{R90A}, um menor número de proteínas foi identificado, sendo que apenas 3 estão reguladas negativamente e 8 reguladas positivamente. Entre as *down-regulated*, a *Nuclear pore complex protein*, envolvida com o complexo formador de poro nuclear, importante para o transporte entre o citoplasma e o núcleo (VASU et al., 2001), parece estar afetada. Dentre as *up-regulated*, pode-se destacar a *Ubiquitin conjugation fator*, que devido a sua similaridade, possivelmente funciona como a *E3 ubiquitin-protein ligase* (também identificada nas células tratadas com rLAAO). Entre os processos encontrados nas análises de enriquecimento, foi observado regulação nas vias de resposta à danos no DNA e em proteínas de ligação à essa molécula, assim como para a rLAAO. Além disso, atividades de geranil-geranilação também parecem ser reguladas. Esse processo é uma modificação pós-traducional, sendo caracterizada pela adição de lipídeos a proteínas, o que desencadeia vias de sinalização relacionadas a crescimento, diferenciação e morfologia celular (LANE; BEESE, 2006; WEI et al., 2020).

O proteoma dos NHEKs tratados com rLAAO, por sua vez, apresentou 29 proteínas reguladas negativamente e 64 reguladas positivamente. Entre as *down-regulated*, destaca-se a *Ataxin-2*, envolvida no processo de endocitose (NONIS et al., 2008) e *Rapamycin-insensitive companion of mTOR*, a qual é uma subunidade de mTOR2 que está associado a mecanismos de crescimento e sobrevivência celular,

além de regular o citoesqueleto de actina (JACINTO et al., 2004). Já entre as proteínas *up-regulated*, foram identificadas a *Alpha-N-acetylgalactosaminidase*, que age removendo os resíduos terminais de alfa-N-acetilgalactosamina de glicolipídeos e glicopeptídeos, sendo necessária para a degradação de glicolipídeos (ASFAW et al., 1998). *Beta-actin-like protein 2,* que é uma isoforma da actina, também foi identificada, estando envolvida em processos relacionados a mobilidade e adesão celular (MALEK et al., 2021). Em relação às vias afetadas pela rLAAO, principalmente processos e funções que envolvem lipídeos foram identificados, tais como catabolismo de fosfolipídeos e glicerofosfolipídeos e atividade de enzimas que agem em lipídeos, como alfa-N-acetilgalactosaminidase e palmitoil hidrolase.

Em relação ao proteoma de queratinócitos tratados com rLAAO^{R90A}, 15 proteínas foram significativamente *down-regulated* e 54 *up-regulated*. Entre as proteínas reguladas negativamente identificou-se a *Ataxin-2*, que também foi encontrada nas células tratadas com rLAAO. Entre as reguladas positivamente, destaca-se a *Acyl-coenzyme A thioesterase 8*, proteína que catalisa a hidrólise de acyl-CoAs em ácidos graxos livres e coenzima A, regulando seus níveis intracelulares (WATANABE et al., 1997). Além isso, essa proteína também está envolvida na regulação metabólica da proliferação de peroxissomos (ISHIZUKA et al., 2004), importantes organelas envolvidas no catabolismo de lipídeos e conversão de espécies reativas de oxigênio. Entre as vias do metabolismo possivelmente alteradas, estão processos de regulação de ligação a lipídeos, acetilação de histonas e ligação à membrana de peroxissomos.

Em geral, os trabalhos presentes na literatura demonstram que estudos envolvendo proteoma são frequentemente realizados para avaliação das proteínas presentes nos venenos de animais peçonhentos (AUGUSTO-DE-OLIVEIRA et al.,

2016; LUNA et al., 2013; NICOLAU et al., 2017). Abordagens analisando células ou amostras provenientes de animais envenenados ainda não são muito comuns, porém alguns trabalhos já podem ser encontrados. Santos e colaboradores (2022), por exemplo, realizaram a caracterização proteômica dos efeitos cardiotóxicos do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, através de análises por espectrometria de massa de amostras do coração de camundongos que receberam injeções do veneno. Diferentes proteínas apresentaram alterações em relação ao controle, principalmente após 6 horas de tratamento, dentre as quais muitas estavam associadas com desregulação celular e dano tecidual (SANTOS et al., 2022).

Considerando trabalhos que utilizem modelos celulares, alguns deles têm focado na análise proteômica de células cancerígenas tratadas com veneno, na tentativa de identificar potenciais alvos anti-tumorais (CHOUDHARY et al., 2018; KISAKI et al., 2021). Por outro lado, estudos que objetivam a caracterização dos efeitos do envenenamento também já foram realizados. Escalona *et. al* (2014) avaliaram o proteoma de células de neuroblastoma, na tentativa de identificar efeitos metabólicos secundários causados pelo veneno do escorpião *Centruroides noxius*. Os autores identificaram que proteínas relacionadas a proteção contra apoptose, a sobrevivência celular e envolvidas na morfologia das células estavam diminuídas, e àquelas associadas ao metabolismo energético estavam aumentadas. Os dados sugerem que o veneno pode modificar a estrutura das células, reduzir a viabilidade e induzir apoptose. Alguns desses efeitos foram comprovados experimentalmente, sugerindo que estudos de proteômica são úteis para predizer e identificar vias do metabolismo afetadas nas células (ESCALONA et al., 2014).

Ahmadi e colaboradores, por sua vez, utilizaram um modelo de pele humana 3D para estudo de dermonecrose induzida pelo veneno de *Naja nigricollis,* em

comparação com o efeito observado *in vivo*. O modelo criado foi incubado com o veneno e, nos animais experimentais, injeções intradérmicas foram realizadas. Ambas as amostras do envenenamento experimental, *in vitro* e *in vivo,* foram submetidas a análises por espectrometria de massa para avaliação do seu proteoma. Embora mais proteínas tenham sido identificadas no modelo animal, houve uma sobreposição relevante nas proteínas identificadas como significativamente reguladas. Um número considerável de proteínas *up-regulated* em comum foram identificadas em ambos os modelos, as quais estavam relacionadas principalmente à regulação do citoesqueleto de actina, sinalização de Rho GTPases e apoptose. Apesar de muitas proteínas identificadas não serem idênticas nos dois modelos, a maioria das vias e processos metabólicos encontrados em análises de enriquecimento são comuns aos modelos *in vitro* e *in vivo*, reforçando o potencial dos ensaios em células para estudos relacionados ao metabolismo (AHMADI et al., 2022).

Após as análises proteômicas, o presente trabalho focou no estudo dos aminoácidos e aminas biogênicas de células tratadas com a LAAO recombinante. Da mesma forma que no proteoma, mais compostos foram afetados em queratinócitos do que em células endoteliais. Os principais aminoácidos afetados, tanto no sobrenadante, quanto no lisado celular de ambas as células, são hidrofóbicos e/ou possuem anel aromático. Além disso, o tratamento com a rLAAO reduz os níveis de alguns aminoácidos polares, tais como lisina, glutamina, histidina e serina. Embora a maioria dos estudos demonstrem que os aminoácidos hidrofóbicos são os substratos preferenciais da LAAO (COSTA et al., 2018b; EL HAKIM et al., 2015), trabalhos também têm demonstrado alguma atividade enzimática, mesmo que baixa, frente a aminoácidos como histidina, arginina, lisina e glutamina (BREGGE-SILVA et al., 2012; COSTA et al., 2018b; ZHANG; WU, 2008).

Em relação aos aminoácidos aumentados, a rLAAO elevou os níveis de alanina nos dois tipos celulares. Além dele, ácido aspártico, cisteína, glicina e prolina também parecem estar aumentados nos queratinócitos após tratamento. Estudos têm demonstrado que o aumento nos níveis de determinados aminoácidos é característico durante a ocorrência de autofagia nas células, processo considerado essencial para a sobrevivência celular (DRÖGE, 2004). Em geral, a diminuição nos níveis de aminoácidos induz a ocorrência de autofagia, que promove um aumento e liberação de aminoácidos livres para proteger as células, na tentativa de manter os níveis intracelulares normais. A quantidade de alguns aminoácidos intracelulares pode servir como um sensor na regulação da autofagia, através da ativação ou inibição da via de mTOR1, por transdução de sinais (LIU et al., 2021). Além disso, Bala e colaboradores (2021) demonstraram que alguns aminoácidos, incluindo a cisteína, estão aumentados no plasma de pacientes com diabetes do tipo 2, sendo, nesse caso, considerados biomarcadores de estresse oxidativo (BALA et al., 2021).

Já nas células tratadas com a rLAAO^{R90A}, os aminoácidos lisina, tirosina e leucina apresentaram seus níveis reduzidos, enquanto alanina, glicina e cisteína aumentaram em relação ao controle. Essas alterações foram as mesmas observadas para a rLAAO, porém as mudanças menores, indicando ação reduzida da proteína mutada quando comparada com a versão que possui a sequência da LAAO nativa.

Quando as aminas biogênicas são analisadas, também se observa alteração nos níveis de um maior número de metabólitos em queratinócitos do que em células endoteliais. Esses dados, assim como os dos aminoácidos, foram utilizados para análises de enriquecimento, as quais auxiliam no entendimento de quais vias do metabolismo estão possivelmente afetadas diante dos compostos que apresentaram diferenças significativas. Como esperado, vias relacionadas ao metabolismo de

aminoácidos foram as mais frequentes nessas análises, provavelmente devido ao efeito direto da LAAO, que catalisa a desaminação oxidativa de L-aminoácidos. Uma das vias interessantemente regulada foi a do metabolismo de selenoaminoácidos. Selênio é um micronutriente essencial para os seres humanos. Ele é incorporado aos aminoácidos resultando em um selenoaminoácido, que funciona como um resíduo catalítico nas selenoproteínas (KRYUKOV et al., 2003). Essas proteínas desempenham papéis biológicos fundamentais, como funções redox, agindo como antioxidantes nas células (LABUNSKYY; HATFIELD; GLADYSHEV, 2014). No caso das células tratadas com rLAAO, a presença de antioxidantes poderia ser um mecanismo de proteção celular frente ao estresse oxidativo causado por essa enzima.

Ainda considerando as funções relacionadas ao estresse oxidativo, vias associadas ao metabolismo de glutationa e taurina, importantes moléculas antioxidantes, também parecem estar aumentadas após o tratamento das células com rLAAO. A glutationa é um tri peptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina, sendo considerado o tiol mais abundante no meio intracelular. Ela apresenta diferentes funções em células animais e uma das mais importantes está relacionada aos efeitos antioxidantes. A glutationa auxilia na eliminação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, além de estar envolvida na remoção de peróxidos de moléculas de hidrogênio e lipídeos, assim como na prevenção de oxidação de biomoléculas em geral (AQUILANO; BALDELLI; CIRIOLO, 2014; WU et al., 2004). A taurina, por sua vez, é um aminoácido não-essencial abundante em muitos tecidos de mamíferos e está envolvida em diferentes funções fisiológicas. Entre elas, a taurina possui atividades antioxidantes e níveis baixos dessa molécula estão associados com doenças mediadas por estresse oxidativo. Embora ela não esteja diretamente associada com a diminuição de espécies reativas de oxigênio, ela exerce sua função

modulando enzimas antioxidantes e mantendo os estoques de glutationa, por exemplo (BALIOU et al., 2021). O aumento nos níveis de ambas as moléculas nas células sugere, mais uma vez, uma resposta celular frente ao estresse oxidativo induzido pela rLAAO. Também é importante destacar que os níveis de cisteína, aminoácido envolvido na biossíntese de ambos os compostos, apresenta níveis aumentados nos queratinócitos.

A indução de estresse oxidativo é um efeito característico no envenenamento causado por viperídeos, ocorrendo, geralmente, devido a produção de espécies reativas de oxigênio (DONG et al., 2021; SUNITHA et al., 2015). *In vivo*, sugere-se que esse estresse pode ser responsável, pelo menos em parte, pelos danos hepáticos e renais observados no envenenamento (RESIERE; MEHDAOUI; NEVIERE, 2022). Além disso, Strapazzon e colaboradores (2015) demonstraram a ocorrência de um estresse oxidativo sistêmico em humanos, através da análise de amostras de sangue de pacientes envenenados por *B. jararaca* ou *B. jararacussu*. Essas amostras foram analisadas 24 horas, 7 e 30 dias após a entrada dos pacientes no hospital e os dados demonstraram a redução nos níveis de atividade de diferentes enzimas tais como catalase e glutationa-peroxidase, assim como na quantidade de glutationa no sangue, indicando potencial dano oxidativo nesses pacientes (STRAPAZZON et al., 2015). Ao contrário, os dados da presente tese indicam a ocorrência de processos celulares antioxidantes. Essa diferença observada pode ser explicada pelo tempo de tratamento (máximo de 6 horas). A hipótese é de que as células apresentam primeiramente um mecanismo para tentar superar os danos oxidativos. Porém, caso os efeitos sejam muito intensos e prolongados, esses mecanismos não são suficientes e o dano oxidativo é estabelecido.

Outro composto que também se destacou entre os dados é a espermidina, a qual as análises de enriquecimento apontam para uma regulação em sua biossíntese. A espermidina é uma poliamina endógena, positivamente carregada, que pode se ligar a diferentes componentes celulares tais como RNA, DNA e proteínas, regulando diversos processos metabólicos. Ela está diretamente relacionada com a indução de autofagia e mitofagia nas células, os quais agem como mecanismos citoprotetores, aumentando a viabilidade celular (MADEO et al., 2018). Essa observação é coerente com a elevação nos níveis de alguns aminoácidos discutida anteriormente, a qual também pode estar relacionada à ocorrência de autofagia nas células.

A autofagia não é muito estudada na toxinologia, porém estudos têm demonstrado que venenos ofídicos, assim como suas toxinas, são capazes de induzir esse processo em modelos celulares (AZEVEDO et al., 2016; COSTAL-OLIVEIRA et al., 2019; YU et al., 2022). Ela é geralmente um mecanismo de sobrevivência ativado nas células em situações de estresse e/ou privação de nutrientes (LUM et al., 2005). Entretanto, a autofagia também pode desencadear vias de morte celular por apoptose e necrose após contato com moléculas citotóxicas, como já demonstrado para PLA_2 de *B. pauloensis* (AZEVEDO et al., 2016) e LAAO de *B. atrox* (COSTAL-OLIVEIRA et al., 2019). Ainda não se sabe se o processo autofágico que ocorre nas células é uma resposta ao ambiente tóxico promovido pelas toxinas ou se é devido a uma ação direta das mesmas durante o envenenamento. Entretanto, no contexto observado nesta tese, acredita-se que esse processo pode ser um mecanismo de defesa celular, na tentativa de conter os efeitos causados pela LAAO.

Por último, o lipidoma dos queratinócitos tratados com a rLAAO foi investigado. As células foram incubadas com a proteína por diferentes tempos (0,5, 1,5, 3 ou 6 horas) e as análises de PCA demonstram uma separação entre os grupos, em relação

ao controle, sugerindo que há um perfil lipídico diferente entre eles. Entretanto, poucos *features* com diferença significativa em relação às células não-tratadas foram identificados. Acredita-se que o tempo de tratamento pode ter sido curto para induzir mudanças em muitos lipídeos ou que a quantidade de rLAAO pode não ter sido suficiente. Porém, essas hipóteses precisam ser melhor investigadas, tratando as células por períodos mais longos ou aumentando a concentração de proteína nos tratamentos.

Contudo, a identidade putativa dos *features* significativamente regulados foi determinada na plataforma LIPID MAPS e pode-se observar diferenças relevantes entre os lipídeos potencialmente *down-regulated* ou *up-regulated*. Algumas categorias de lipídeos como glicerolipídeos, esfingolipídeos e ácidos graxos foram reguladas tanto negativamente como positivamente, porém não exatamente o mesmo lipídeo. Em contrapartida, a maior parte dos lipídeos *down-regulated* pertencem a classe dos glicerofosfolipídeos, enquanto os esteróis foram exclusivamente *up-regulated*.

Glicerofosfolipídeos são a classe mais abundante de fosfolipídeos, sendo encontrados principalmente nas membranas plasmáticas das células, mas também na forma de armazenamento de gordura, em menores quantidades. Eles são considerados uma fonte de compostos fisiologicamente ativos, liberando ácidos graxos, por exemplo, que são necessários para a síntese de eicosanóides, importantes mediadores inflamatórios. Os glicerofosfolipídeos também participam de vias de sinalização e auxiliam no ancoramento de proteínas nas membranas celulares (BLANCO, 2017).

Alguns estudos têm sugerido que o perfil de glicerofosfolipídeos no plasma ou em tecidos humanos pode ser utilizado para distinguir tecidos tumorais ou para

auxiliar no diagnóstico de doenças, como asma (WANG et al., 2021; ZENG et al., 2021). Xia e colaboradores (2019) demonstraram que vias relacionadas ao metabolismo de glicerofosfolipídeos estão *up-regulated* em condições de hipóxia em *Saccharomyces cerevisiae*. Eles sugerem que esses lipídeos podem auxiliar na manutenção da estabilidade das membranas plasmáticas, frente a situações de estresse ou dano celular, além de contribuírem para a produção de energia e consequente sobrevivência das células (XIA et al., 2019). Outro estudo demonstrou que componentes do metabolismo de glicerofosfolipídeos também estão alterados em pacientes com psoríase. Os autores discutem a importância dessa classe de lipídeos em reações inflamatórias e na via de mTOR (ZENG et al., 2017). Como os glicerofosfolipídeos estão regulados negativamente nos queratinócitos tratados com a rLAAO, sugere-se alterações nas vias citadas e, portanto, diminuição da sobrevivência das células.

Os esteróides fazem parte de outra classe de lipídeos de grande importância biológica que inclui compostos como hormônios, vitamina D e esteróis, sendo o colesterol o mais abundante em tecidos animais. O colesterol também faz parte das membranas celulares e é utilizado na biossíntese de outros compostos (BLANCO, 2017). Durante o processo de síntese de colesterol, diferentes intermediários de esteróis são produzidos como precursores e, outros são produzidos a partir do seu metabolismo, como oxisteróis, ácidos biliares e hormônios esteróides. Tanto os precursores quanto os intermediários e produtos do metabolismo possuem funções biológicas importantes. O colesterol também é um componente essencial das balsas lipídicas (*lipid rafts*), as quais estão envolvidas em processos como endocitose e sinalização celular. Os esteróides estão relacionados a condições patológicas, tais como aterosclerose, câncer, doenças neurodegenerativas e infecções (YAMAUCHI;

ROGERS, 2018). Portanto, seu metabolismo vem sendo considerado alvo para o desenvolvimento de terapias.

Em relação aos venenos ofídicos, Wase e colaboradores avaliaram o lipidoma do plasma de camundongos que receberam injeções de *Bothrops asper* ou *Daboia russelii* e encontraram alterações nos níveis de diferentes classes de lipídeos. Os fosfolipídeos apresentaram-se significativamente reduzidos, indicando o processo de hidrólise desses lipídeos. Por outro lado, os níveis de triacilgliceróis apresentaram-se aumentados, sugerindo um processo de estocagem em gotículas lipídicas (WASE et al., 2022), o que já foi observado anteriormente em macrófagos tratados com PLA_2 do veneno de *B. asper* (LEIGUEZ et al., 2011). Essas gotículas lipídicas são formadas principalmente por triacilglicerol e colesterol, e seu acúmulo está relacionado a processos inflamatórios e algumas patologias (MARTIN; PARTON, 2006). O lipidoma de macrófagos tratados com o veneno de *B. alternatus* também foi avaliado por Echeverría e colaboradores (2018), que demonstraram níveis moderados de ácido araquidônico nas células, o que sugere a hidrólise de ácidos graxos e consequente produção de eicosanóides inflamatórios (ECHEVERRÍA et al., 2018).

Considerando essas informações, pode-se supor que glicerofosfolipídeos de membrana estão reduzidos em queratinócitos tratados com a rLAAO devido aos seus efeitos indiretos na membrana plasmática, visto que o estresse oxidativo pode levar a danos na membrana celular (DE LA HABA et al., 2013) e, consequentemente, aos lipídeos que a compõem. Os esteróides, por sua vez, estariam aumentados em consequência da formação de gotículas lipídicas, como mencionado anteriormente. Essas gotículas são sintetizadas no retículo endoplasmático e liberadas para o citoplasma ou direcionadas ao complexo de Golgi. Além de estarem associadas a processos inflamatórios, elas também estão envolvidas no tráfego de intermediários

lipídicos para vias de sinalização, assim como de componentes lipídicos da membrana celular (MURPHY, 2001).

Em suma, reunindo os dados de espectrometria de massa do proteoma, das aminas biogênicas e do lipidoma, determinadas vias do metabolismo se destacam e algumas delas estão presentes nas três análises. No proteoma pode-se evidenciar processos relacionados ao DNA, como metilação, vias de reparo e ligação a ácidos nucléicos. Vias relacionadas à adesão celular, envolvendo proteínas como actina e E-caderina também foram encontradas, assim como processos relacionados a endocitose e transporte de moléculas. As análises de aminoácidos e aminas biogênicas apontam para a regulação de processos autofágicos e antioxidantes. Processos metabólicos que envolvem lipídeos foram amplamente identificados, sendo que o proteoma demonstrou a diminuição de proteínas envolvidas no metabolismo de colesterol e aumento de vias do catabolismo de glicerofosfolipídeos. Isso corrobora os achados do lipidoma, que demonstram um aumento de esteróides e diminuição de glicerofosfolipídeos nas células.

Vias relacionadas a proteínas mTOR foram identificadas nas três análises. mTOR é uma importante proteína quinase envolvida na regulação de diversos processos de crescimento celular, sobrevivência, manutenção do citoesqueleto de actina e autofagia. Ela serve como base para dois complexos proteicos – mTOR1 e mTOR2 (SABATINI, 2017). O mTOR1, que é ativado na presença de quantidades suficientes de aminoácidos, funciona como um sensor do estado nutricional/energético/redox das células e pode estar relacionado a vias autofágicas, como mencionado nos dados de aminas biogênicas (LIU et al., 2021). O mTOR2, por sua vez, está mais associado ao estresse em fibras de actina, assim como vias de sobrevivência celular (JACINTO et al., 2004). Uma das subunidades desse complexo

foi identificada como regulada negativamente nas análises proteômicas, indicando distúrbios associados ao citoesqueleto de actina. Além disso, as análises do lipidoma também remetem a mTOR, uma vez que glicerofosfolipídeos, os quais estão significativamente *down-regulated* nas células tratadas com rLAAO, podem agir como mensageiros secundários para a ativação de vias relacionadas a mTOR (ZHANG et al., 2012).

Os dados ômicos obtidos nessa tese, em conjunto com os ensaios celulares, permitem que uma gama de associações e inferências sejam feitas a partir dos resultados. De posse de todos as análises, pretende-se, posteriormente, realizar um estudo integrado, que envolva os dados do proteoma, das aminas biogênicas e do lipidoma. Esse tipo de abordagem é inovadora e fornecerá uma visão geral a respeito dos processos metabólicos desencadeados pela LAAO e, consequentemente, durante o envenenamento. Além disso, espera-se que através do perfil metabólico obtido, seja possível a identificação de moléculas essenciais envolvidas nos processos tóxicos causados pelo veneno. Esses compostos identificados podem, no futuro, ser utilizados como alvos para o desenvolvimento de terapias para o tratamento do envenenamento local.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- O veneno de *B. atrox* reduz a viabilidade de queratinócitos e afeta a morfologia das células, causando dissociação e retração celular;
- Metaloproteases e L-aminoácido oxidases foram identificadas como as principais proteínas responsáveis pela citotoxicidade causada pelo veneno;
- A LAAO foi produzida em sua forma recombinante e apresentou atividades similares à LAAO nativa purificada a partir do veneno;
- A rLAAO^{R90A} demonstrou que o resíduo Arg90 é importante para a enzima, uma vez que essa proteína não apresentou atividade catalítica e seus efeitos celulares e metabólitos foram significativamente reduzidos;
- As análises do proteoma, dos aminoácidos e aminas biogênicas e do lipidoma das células tratadas indicam que a LAAO está envolvida em processos relacionados ao DNA, na adesão celular, em vias autofágicas e antioxidantes, assim como no metabolismo de lipídeos.

Perspectivas

7. PERSPECTIVAS

- Realizar quantificações dos ensaios de imunofluorescência das células utilizando o *software* Junction Mapper;
- Avaliar os efeitos da rLAAO e rLAAO^{R90A} em outras proteínas importantes para adesão celular, tais como integrinas;
- Investigar o papel das diferentes proteínas identificadas como significativamente reguladas no proteoma das células;
- Realizar as análises de enriquecimento dos aminoácidos e aminas biogênicas para os diferentes tempos de tratamento com rLAAO ou rLAAO^{R90A};
- Analisar os dados do lipidoma de células tratadas com rLAAO^{R90A};
- Analisar os dados de espectrometria de massa do modo positivo do lipidoma das células tratadas com rLAAO ou rLAAO^{R90A};
- Analisar o proteoma, os aminoácidos e aminas biogênicas e o lipidoma das células tratadas com o veneno total de *Bothrops atrox*.

Referências

8. REFERÊNCIAS

ABDELKAFI-KOUBAA, Z. et al. Interaction of a snake venom l-amino acid oxidase with different cell types membrane. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 757–764, 1 jan. 2016.

AHMADI, S. et al. Proteomics and histological assessment of an organotypic model of human skin following exposure to Naja nigricollis venom. **Toxicon**, v. 220, 1 dez. 2022.

ALANGODE, A.; RAJAN, K.; NAIR, B. G. **Snake antivenom: Challenges and alternate approaches**. **Biochemical Pharmacology**Elsevier Inc., , 1 nov. 2020.

ALVES, E. C. et al. Predicting acute renal failure in Bothrops snakebite patients in a tertiary reference center, Western Brazilian Amazon. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, p. 1–16, 2019.

ALVES, R. M. et al. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by l-amino acid oxidase isolated from Bothrops atrox snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 151, n. 4, p. 542–550, 2008a.

AMAZONAS, D. R. et al. Evidence for snake venom plasticity in a long-term study with individual captive Bothrops atrox. **Toxins**, v. 11, n. 5, 1 maio 2019.

ANDE, S. R. et al. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, v. 11, n. 8, p. 1439–1451, ago. 2006.

AQUILANO, K.; BALDELLI, S.; CIRIOLO, M. R. **Glutathione: New roles in redox signalling for an old antioxidant**. **Frontiers in Pharmacology**Frontiers Research Foundation, , 2014.

ARJMAND, M. et al. NMR-based metabonomics survey in rats envenomed by Hemiscorpius lepturus venom. **Toxicon**, v. 94, p. 16–22, 2015.

ASFAW, B. et al. Degradation of blood group A glycolipid A-6-2 by normal and mutant human skin fibroblasts. **Journal of Lipid Research**, v. 39, n. 9, p. 1768–1780, 1998.

AUGUSTO-DE-OLIVEIRA, C. et al. Dynamic Rearrangement in Snake Venom Gland Proteome: Insights into Bothrops jararaca Intraspecific Venom Variation. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 10, p. 3752–3762, 7 out. 2016.

AZEVEDO, F. V. P. V. et al. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA2 homologue from Bothrops pauloensis venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 671–677, 1 jan. 2016.

BALA, C. G. et al. Amino acid signature of oxidative stress in patients with type 2 diabetes: Targeted exploratory metabolomic research. **Antioxidants**, v. 10, n. 4, 1 abr. 2021.

BALIOU, S. et al. **Protective role of taurine against oxidative stress (Review)**. **Molecular Medicine Reports**Spandidos Publications, , 1 ago. 2021.

BANERJEE, S. et al. **JAK–STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects**. **Drugs**Springer International Publishing, , 1 abr. 2017.

BECK, T. P. et al. Mapping of clinical management resources for snakebites and other animal envenomings in the Brazilian Amazon. **Toxicon: X**, v. 16, p. 100137, dez. 2022.

BHAT, S. K. et al. P-I metalloproteinases and L-amino acid oxidases from Bothrops species inhibit angiogenesis. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 27, 2021.

BLANCO. **Medical Biochemistry**. [s.l: s.n.].

BOURY-JAMOT, M. et al. Expression and function of aquaporins in human skin: Is aquaporin-3 just a glycerol transporter? **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1758, n. 8, p. 1034–1042, 2006.

BREGGE-SILVA, C. et al. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel l-amino acid oxidase from Lachesis muta snake venom. **Toxicon**, v. 60, n. 7, p. 1263–1276, 1 dez. 2012.

BULFONE, T. C. et al. Developing Small Molecule Therapeutics for the Initial and Adjunctive Treatment of Snakebite. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2018, 2018.

BULGIN, D.; PODCHEKO, A. Pharmacological Inhibition of Intracellular Signaling Pathways in Radioresistant Anaplastic Thyroid Cancer. Em: **New Aspects in Molecular and Cellular Mechanisms of Human Carcinogenesis**. [s.l.] InTech, 2016.

BURIN, S. M. et al. Bothrops moojeni L-amino acid oxidase induces apoptosis and epigenetic modulation on Bcr-Abl+ cells. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 26, 1 dez. 2020.

CERUTTI, C.; RIDLEY, A. J. Endothelial cell-cell adhesion and signaling. **Experimental Cell Research**, v. 358, n. 1, p. 31–38, 2017.

CHEN, H. SEN et al. Cloning, characterization and mutagenesis of Russell's viper venom l-amino acid oxidase: Insights into its catalytic mechanism. **Biochimie**, v. 94, n. 2, p. 335–344, 2012a.

CHOUDHARY, I. et al. Proteomic investigation to identify anticancer targets of Nemopilema nomurai jellyfish venom in human hepatocarcinoma HepG2 cells. **Toxins**, v. 10, n. 5, 1 maio 2018.

COLLARES-BUZATO, C. B.; CRUZ-HÖFLING, M. A. DA. Disarray of glomerular and tubular cell adhesion molecules in the course of experimental Bothrops moojeni envenomation. **Toxicon**, v. 78, p. 41–46, 2014.

COSTA, T. R. et al. CR-LAAO, an L-amino acid oxidase from Calloselasma rhodostoma venom, as a potential tool for developing novel immunotherapeutic strategies against cancer. **Scientific Reports**, v. 7, 16 fev. 2017.

COSTA, T. R. et al. CR-LAAO causes genotoxic damage in HepG2 tumor cells by oxidative stress. **Toxicology**, v. 404–405, p. 42–48, 1 jul. 2018a.

COSTA, T. R. et al. Kinetic investigations and stability studies of two Bothrops L-amino acid oxidases. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, 4 dez. 2018b.

COSTA TORRES, A. F. et al. Antibacterial and antiparasitic effects of Bothrops marajoensis venom and its fractions: Phospholipase A 2 and l-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 795–804, 2010.

COSTAL-OLIVEIRA, F. **Caracterização de mecanismos citotóxicos induzidos pelo veneno de Bothrops atrox e de sua toxina purificada L-aminoácido oxidase Caracterização dos mecanismos citotóxicos induzidos pelo veneno de Bothrops atrox e de sua toxina purificada L-aminoácido oxid**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

COSTAL-OLIVEIRA, F. et al. L-amino acid oxidase from Bothrops atrox snake venom triggers autophagy, apoptosis and necrosis in normal human keratinocytes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.

CRISTINO, J. S. et al. A painful journey to antivenom: The therapeutic itinerary of snakebite patients in the Brazilian Amazon (the QUALISnake study). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, p. 1–23, 2021.

DAMICO, D. C. S. et al. Cytotoxicity of Lachesis muta muta snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A2 (LmTX-I) in cultured cells. **Toxicon**, v. 49, n. 5, p. 678–692, 2007.

DATASUS. **Acidentes por animais peçonhentos - notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Brasil**. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>. Acesso em: 11 jul. 2021.

DE ALMEIDA, M. T. et al. Inflammatory reaction induced by two metalloproteinases isolated from bothrops atrox venom and by fragments generated from the hydrolysis of basement membrane components. **Toxins**, v. 12, n. 2, 2020.

DE LA HABA, C. et al. Effect of oxidative stress on plasma membrane fluidity of THP-1 induced macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1828, n. 2, p. 357–364, fev. 2013.

DE OLIVEIRA PARDAL, P. P. et al. Clinical trial of two antivenoms for the treatment of Bothrops and Lachesis bites in the north eastern Amazon region of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 28–42, 2004.

DE SOUZA, L. L. et al. Determination of toxic activities in Bothrops spp. snake venoms using animal-free approaches: Correlation between in vitro versus In vivo assays. **Toxicological Sciences**, v. 147, n. 2, p. 458–465, 1 out. 2015.

DIXON, G. et al. QSER1 protects DNA methylation valleys from de novo methylation. **Science**, v. 372, n. 6538, 9 abr. 2021.

DONG, D. et al. Oxidative stress and antioxidant defense in detoxification systems of snake venom-induced toxicity. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 26, 2021.

DRÖGE, W. **Autophagy and aging - Importance of amino acid levels**. **Mechanisms of Ageing and Development**, mar. 2004.

DYSON, M. R. Fundamentals of Expression in Mammalian Cells. Em: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l: s.n.]. v. 896p. 217–224.

ECHEVERRÍA, S. et al. Evaluation of pro-inflammatory events induced by Bothrops alternatus snake venom. **Chemico-Biological Interactions**, v. 281, p. 24–31, 1 fev. 2018.

EL HAKIM, A. E. et al. Heterodimeric l-amino acid oxidase enzymes from Egyptian Cerastes cerastes venom: Purification, biochemical characterization and partial amino acid sequencing. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 165–176, 2015.

ESCALONA, M. P. et al. A proteomic analysis of the early secondary molecular effects caused by Cn2 scorpion toxin on neuroblastoma cells. **Journal of Proteomics**, v. 111, p. 212–223, 5 dez. 2014.

FELICIANO, P. R. et al. Crystal structure and molecular dynamics studies of L-amino acid oxidase from Bothrops atrox. **Toxicon**, v. 128, p. 50–59, 2017.

FLIEDL, L.; GRILLARI, J.; GRILLARI-VOGLAUER, R. Human cell lines for the production of recombinant proteins: on the horizon. **New Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 673–679, 2015.

FRANCIS, G. L. Albumin and mammalian cell culture: Implications for biotechnology applications. **Cytotechnology**, v. 62, n. 1, p. 1–16, 2010.

FREITAS-DE-SOUSA, L. A. et al. Insights into the mechanisms involved in strong hemorrhage and dermonecrosis induced by atroxlysin-Ia, a PI-class snake venom metalloproteinase. **Toxins**, v. 9, n. 8, 2017.

FRY, B. G. et al. Evolution and diversification of the Toxicofera reptile venom system. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 127–136, 2009.

FRY, B. G. Snakebite: When the human touch becomes a bad touch. **Toxins**, v. 10, n. 4, p. 1–24, 2018.

FUNG, S. Y.; LEE, M. L.; TAN, N. H. Molecular mechanism of cell death induced by king cobra (Ophiophagus hannah) venom l-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 96, p. 38–45, 15 mar. 2015.

GAVAGHAN, C. L.; WILSON, I. D.; NICHOLSON, J. K. Physiological variation in metabolic phenotyping and functional genomic studies: Use of orthogonal signal correction and PLS-DA. **FEBS Letters**, v. 530, n. 1–3, p. 191–196, 2002.

GBD, S. E. C. Global mortality of snakebite envenoming between 1990 and 2019. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 6160, 25 out. 2022.

GEBERT, N. et al. Identifying Cell-Type-Specific Metabolic Signatures Using Transcriptome and Proteome Analyses. **Current Protocols**, v. 1, n. 9, 1 set. 2021.

GEORGIEVA, D. et al. The structure of a native l-amino acid oxidase, the major component of the Vipera ammodytes ammodytes venomic, reveals dynamic active site and quaternary structure stabilization by divalent ions. **Molecular BioSystems**, v. 7, n. 2, p. 379–384, 1 fev. 2011.

GRAY, N. et al. High-Speed Quantitative UPLC-MS Analysis of Multiple Amines in Human Plasma and Serum via Precolumn Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate: Application to Acetaminophen-Induced Liver Failure. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 4, p. 2478–2487, 2017a.

GUERRA-DUARTE, C. et al. Partial in vitro analysis of toxic and antigenic activities of eleven Peruvian pitviper snake venoms. **Toxicon**, v. 108, p. 84–96, 2015.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. **Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: State-of-the-art and challenges ahead**. **Toxins**MDPI AG, , 13 maio 2017.

GUTIÉRREZ, J. M. Preclinical assessment of the neutralizing efficacy of snake antivenoms in Latin America and the Caribbean: A review. **Toxicon**, v. 146, p. 138–150, 1 maio 2018.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. In Vitro Tests for Assessing the Neutralizing Ability of Snake Antivenoms: Toward the 3Rs Principles. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 11 jan. 2021.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G.; BURNOUF, T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. **Biologicals**, v. 39, n. 3, p. 129–142, 2011.
HAN, X. **Lipidomics for studying metabolism**. **Nature Reviews Endocrinology**Nature Publishing Group, , 1 nov. 2016.

HARRISON, R. A. et al. Snake envenoming: A disease of poverty. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 12, 2009.

HATAKEYAMA, D. M. et al. Venom complexity of Bothrops atrox (common lancehead) siblings. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 26, n. October 2020, p. 1–17, 2020.

HESS, M. C. et al. Recombinant expression of an l-amino acid oxidase from the fungus Hebeloma cylindrosporum in Pichia pastoris including fermentation. **MicrobiologyOpen**, v. 9, n. 10, 1 out. 2020.

HIU, J. J.; YAP, M. K. K. **Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase**. **Biochemical Society Transactions**Portland Press Ltd, , 8 abr. 2020.

HUANG, Z. et al. Serum metabolomics of Bama miniature pigs bitten by Bungarus multicinctus. **Toxicology Letters**, v. 350, p. 225–239, 10 out. 2021.

ISHIZUKA, M. et al. Overexpression of human acyl-CoA thioesterase upregulates peroxisome biogenesis. **Experimental Cell Research**, v. 297, n. 1, p. 127–141, 1 jul. 2004.

IZIDORO, L. F. M. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: Trends in pharmacology and biochemistry. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

JACINTO, E. et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. **Nature Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 1122–1128, nov. 2004.

KANG, T. S. et al. Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**, v. 278, n. 23, p. 4544–4576, 2011.

KASPAR, H. et al. Advances in amino acid analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 2, p. 445–452, 2009.

KISAKI, C. Y. et al. Bothrops jararaca snake venom modulates key cancer-related proteins in breast tumor cell lines. **Toxins**, v. 13, n. 8, 1 ago. 2021.

KNUDSEN, C. et al. Snakebite Envenoming Diagnosis and Diagnostics. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. April, p. 9–12, 2021.

KOBIELAK, A.; FUCHS, E. α-catenin: At the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 8, p. 614–625, 2004.

KOMMOJU, P. R.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S. Molecular cloning, expression and purification of l-amino acid oxidase from the Malayan pit viper Calloselasma rhodostoma. **Protein Expression and Purification**, v. 52, n. 1, p. 89–95, 2007a.

KRYUKOV, G. V. et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science**, v. 300, n. 5624, p. 1439–1443, 30 maio 2003.

LABUNSKYY, V. M.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. **Selenoproteins: Molecular pathways and physiological roles**. **Physiological Reviews**American Physiological Society, , 1 jul. 2014.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 1970.

LANE, K. T.; BEESE, L. S. **Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I**. **Journal of Lipid Research**, abr. 2006.

LARANCE, M.; LAMOND, A. I. **Multidimensional proteomics for cell biology**. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**Nature Publishing Group, , 23 abr. 2015a.

LEIGUEZ, E. et al. A group IIA-secreted phospholipase A2 from snake venom induces lipid body formation in macrophages: the roles of intracellular phospholipases A2 and distinct signaling pathways. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 1, p. 155–166, 1 jul. 2011.

LEÓN, G. et al. Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. **Toxicon**, v. 76, p. 63–76, 2013.

LIU, C. et al. **Functional amino acids and autophagy: Diverse signal transduction and application**. **International Journal of Molecular Sciences**MDPI, , 1 nov. 2021.

LOWRY, O. H. ; et al. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

LUM, J. J. et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. **Cell**, v. 120, n. 2, p. 237–248, 28 jan. 2005.

LUNA, M. S. et al. Activation of Bothrops jararaca snake venom gland and venom production: A proteomic approach. **Journal of Proteomics**, v. 94, p. 460–472, 6 dez. 2013.

MACHADO, A. R. T. et al. The toxin BjussuLAAO-II induces oxidative stress and DNA damage, upregulates the inflammatory cytokine genes TNF and IL6, and downregulates the apoptotic-related genes BAX, BCL2 and RELA in human Caco-2 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 212–219, 1 abr. 2018.

MACHADO, A. R. T. et al. Cytotoxic, genotoxic, and oxidative stress-inducing effect of an L-amino acid oxidase isolated from Bothrops jararacussu venom in a co-culture

model of HepG2 and HUVEC cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 127, p. 425–432, 15 abr. 2019a.

MADEO, F. et al. **Spermidine in health and disease**. **Science**American Association for the Advancement of Science, , 26 jan. 2018.

MAGADÁN, J. G. et al. Rab22a Regulates the Sorting of Transferrin to Recycling Endosomes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 7, p. 2595–2614, abr. 2006.

MAGALHÃES, S. F. V. et al. Snakebites caused by the genera Bothrops and Lachesis in the Brazilian Amazon: a study of factors associated with severe cases and death. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 55, p. e05582021, 2022.

MALAQUE, C. M. S.; GUTIÉRREZ, M. J. Snakebite Envenomation in Central and South America. Em: **Critical Care Medicine**. [s.l.] Critical Care Toxicology, 2016. p. 1–22.

MALEK, N. et al. The origin of the expressed retrotransposed gene ACTBL2 and its influence on human melanoma cells' motility and focal adhesion formation. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

MAMEDE, C. C. N. et al. Edema, hyperalgesia and myonecrosis induced by Brazilian bothropic venoms: overview of the last decade. **Toxicon**, v. 187, n. April, p. 10–18, 2020a.

MARTIN, S.; PARTON, R. G. **Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.nature.com/reviews/molcellbio>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilânica Epidemiológica**. 1. ed. [s.l: s.n.].

MITRA, J.; SHARMA, K.; BHATTACHARYYA, D. **Molecular modelling approaches for designing inhibitors of L-amino acid oxidase from Crotalus adamanteus venom Characterization of human placental extract View project**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/278683533>.

MONTEIRO, W. M. et al. Bothrops atrox, the most important snake involved in human envenomings in the amazon: How venomics contributes to the knowledge of snake biology and clinical toxinology. **Toxicon: X**, v. 6, 2020a.

MONTI, C. et al. Proteomics turns functional. **Journal of Proteomics**, v. 198, p. 36–44, 30 abr. 2019.

MOUSTAFA, I. M. et al. Crystal Structure of LAAO from Calloselasma rhodostoma with an l-Phenylalanine Substrate: Insights into Structure and Mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 364, n. 5, p. 991–1002, 15 dez. 2006.

MUNAWAR, A. et al. Snake venom peptides: Tools of biodiscovery. **Toxins**, v. 10, n. 11, 2018.

MURPHY, D. J. **The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/plipres>.

NAILWAL, N. P.; DOSHI, G. M. **Role of intracellular signaling pathways and their inhibitors in the treatment of inflammation**. **Inflammopharmacology**Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 jun. 2021.

NASCIMENTO, J. M. et al. Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by Bothrops alternatus snake venom in cultured Madin-Darby canine kidney cells. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 85, n. 5, p. 591–605, 2007a.

NAUMANN, G. B. et al. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from Bothrops leucurus venom. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1810, n. 7, p. 683–694, 2011.

NICOLAU, C. A. et al. An in-depth snake venom proteopeptidome characterization: Benchmarking Bothrops jararaca. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 214–231, 16 jan. 2017.

NOGUEIRA, C. C. et al. Atlas of Brazilian Snakes: Verified Point-Locality Maps to Mitigate the Wallacean Shortfall in a Megadiverse Snake Fauna. **South American Journal of Herpetology**, v. 14, n. Sp1, p. S1–S274, 2019.

NONIS, D. et al. Ataxin-2 associates with the endocytosis complex and affects EGF receptor trafficking. **Cellular Signalling**, v. 20, n. 10, p. 1725–1739, out. 2008.

PAWELEK, P. D. et al. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. **EMBO Journal**, v. 19, n. 16, p. 4204–4215, 2000.

PEREIRA-CROTT, L. S. et al. Bothrops moojeni venom and BmooLAAO-I downmodulate CXCL8/IL-8 and CCL2/MCP-1 production and oxidative burst response, and upregulate CD11b expression in human neutrophils. **International Immunopharmacology**, v. 80, 1 mar. 2020.

PRIMO, L. et al. Essential role of PDK1 in regulating endothelial cell migration. **Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 7, p. 1035–1047, 26 mar. 2007.

RAFFEL, S. et al. **Quantitative proteomics reveals specific metabolic features of acute myeloid leukemia stem cells**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://proteomecentral.proteomexchange.org>.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors (Switzerland)**, v. 12, n. 9, p. 12347–12360, 2012.

RAO, S. et al. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase , a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, v. 11, p. 1439–1451, 2006.

RESIERE, D.; MEHDAOUI, H.; NEVIERE, R. Inflammation and Oxidative Stress in Snakebite Envenomation: A Brief Descriptive Review and Clinical Implications. **Toxins**, v. 14, n. 11, p. 802, 18 nov. 2022.

RIBEIRO, P. H. et al. Mechanism of the cytotoxic effect of L-amino acid oxidase isolated from Bothrops alternatus snake venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 329–337, 1 nov. 2016.

RODRIGUES, C. R. et al. Proteomic profile, biological activities and antigenic analysis of the venom from Bothriopsis bilineata smaragdina (“loro machaco”), a pitviper snake from Peru. **Journal of Proteomics**, v. 187, p. 171–181, 15 set. 2018.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 1–17, 2014.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. LEONARD. **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen & Co, 1959.

SABATINI, D. M. **Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth**. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**National Academy of Sciences, , 7 nov. 2017.

SAMEL, M. et al. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting l-amino acid oxidase from Vipera berus berus (common viper) venom. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1764, n. 4, p. 707–714, abr. 2006.

SANCHEZ, E. F. et al. Direct fibrinolytic snake venom metalloproteinases affecting hemostasis: Structural, biochemical features and therapeutic potential. **Toxins**, v. 9, n. 12, 2017.

SANTOS, W. S. et al. Proteomic analysis reveals rattlesnake venom modulation of proteins associated with cardiac tissue damage in mouse hearts. **Journal of Proteomics**, v. 258, 30 abr. 2022.

SCHNEIDER, F. S. et al. Use of a Synthetic Biosensor for Neutralizing Activity-Biased Selection of Monoclonal Antibodies against Atroxlysin-I, an Hemorrhagic Metalloproteinase from Bothrops atrox Snake Venom. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. 1–9, 2014.

SERRANO, S. M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 19–26, 2013.

SHINODA, K.; TOMITA, M.; ISHIHAMA, Y. emPAI Calc-for the estimation of protein abundance from large-scale identification data by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Bioinformatics**, v. 26, n. 4, p. 576–577, 22 dez. 2009.

SILVA DE OLIVEIRA, S. et al. Bothrops snakebites in the Amazon: recovery from hemostatic disorders after Brazilian antivenom therapy. **Clinical Toxicology**, v. 58, n. 4, p. 266–274, 2020.

SINGH, M.; SHARMA, H.; SINGH, N. Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. **Mitochondrion**, v. 7, n. 6, p. 367–373, dez. 2007.

SOMEYA, T.; AMAGAI, M. Toward a new generation of smart skins. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 382–388, 2019.

SOUZA, T. C. DE et al. Tendência temporal e perfil epidemiológico dos acidentes por animais peçonhentos no Brasil, 2007-2019. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 31, n. 3, 2022.

STRAPAZZON, J. DE O. et al. Systemic oxidative stress in victims of Bothrops snakebites. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 13, n. 2, p. 161–167, 1 maio 2015.
SUNITHA, K. et al. **Inflammation and oxidative stress in viper bite: An insight within and beyond**. **Toxicon**Elsevier Ltd, , 2015.

TAN, K. K.; BAY, B. H.; GOPALAKRISHNAKONE, P. L-amino acid oxidase from snake venom and its anticancer potential. **Toxicon**, v. 144, p. 7–13, 2018.

TANIYAMA, Y. et al. Pyk2- and Src-Dependent Tyrosine Phosphorylation of PDK1 Regulates Focal Adhesions. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 22, p. 8019–8029, 15 nov. 2003.

THUENAUER, R.; RODRIGUEZ-BOULAN, E.; RÜMER, W. Microfluidic approaches for epithelial cell layer culture and characterisation. **Analyst**, v. 139, n. 13, p. 3206–3218, 2014.

TORII, S. et al. Molecular cloning and functional analysis of apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. **Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 3197–3205, 2000a.

ULLAH, A. Structure–Function Studies and Mechanism of Action of Snake Venom L-Amino Acid Oxidases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. February, p. 1–17, 2020a.

VASU, S. et al. Novel vertebrate nucleoporins Nup133 and Nup160 play a role in mRNA export. **Journal of Cell Biology**, v. 155, n. 4, p. 339–353, 12 nov. 2001.

VAUGHAN, R. M. et al. Comparative biochemical analysis of UHRF proteins reveals molecular mechanisms that uncouple UHRF2 from DNA methylation maintenance. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 9, p. 4405–4416, 1 maio 2018.

WANG, S. et al. Revealing the role of glycerophospholipid metabolism in asthma through plasma lipidomics. **Clinica Chimica Acta**, v. 513, p. 34–42, 1 fev. 2021.

WASE, N. et al. Longitudinal Metabolomics and Lipidomics Analyses Reveal Alterations Associated with Envenoming by Bothrops asper and Daboia russelii in an Experimental Murine Model. **Toxins**, v. 14, n. 10, 1 out. 2022.

WATANABE, H. et al. **A Novel acyl-CoA Thioesterase Enhances Its Enzymatic Activity by Direct Binding with HIV NefBIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS**. [s.l: s.n.].

WEI, J. et al. **Geranylgeranylation promotes proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells through the YAP signaling pathwayAm J Transl Res**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.ajtr.org>.

WINGFIELD, P. T. **Overview of the Purification of Recombinant Proteins**. [s.l: s.n.]. v. 176

WISHART, D. S. Metabolomics for Investigating Physiological and Pathophysiological Processes. **Physiol Rev**, v. 99, p. 1819–1875, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO Expert Committee on Biological StandardizationWorld Health Organization technical report series**. [s.l: s.n.].

WU, W. BIN; HUANG, T. F. Activation of MMP-2, cleavage of matrix proteins, and adherens junctions during a snake venom metalloproteinase-induced endothelial cell apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 288, n. 1, p. 143–157, 2003.

WU, G. et al. **Recent Advances in Nutritional Sciences Glutathione Metabolism and Its Implications for Health 1**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://academic.oup.com/jn/article/134/3/489/4688681>.

XIA, Z. et al. Multiple-omics techniques reveal the role of glycerophospholipid metabolic pathway in the response of saccharomyces cerevisiaeagainst hypoxic stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JUN, 2019.

XIAO, H. et al. Snake Venom PLA2, a Promising Target for Broad-Spectrum Antivenom Drug Development. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

YASUDA, K. et al. Human hepatic metabolism of the anti-osteoporosis drug eldecalcitol involves sterol C4-methyl oxidase. **Pharmacology Research and Perspectives**, v. 3, n. 2, p. 1–17, 1 mar. 2015.

YU, J. E. et al. Snake venom induces an autophagic cell death via activation of the JNK pathway in colorectal cancer cells. **Journal of Cancer**, v. 13, n. 12, p. 3333–3341, 2022.

YUAN, H. et al. An integrative proteomics metabolomics based strategy reveals the mechanisms involved in wasp sting induced acute kidney injury. **Toxicon**, v. 205, p. 1–10, 15 jan. 2022.

ZENG, C. et al. Lipidomics profiling reveals the role of glycerophospholipid metabolism in psoriasis. **GigaScience**, v. 6, n. 10, p. 1–11, 1 out. 2017.

ZENG, W. et al. Application of Lipidomics for Assessing Tissue Lipid Profiles of Patients With Squamous Cell Carcinoma. **Technology in Cancer Research and Treatment**, v. 20, 2021.

ZHANG, C. et al. Glycerolipid signals alter mTOR complex 2 (mTORC2) to diminish insulin signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 5, p. 1667–1672, 31 jan. 2012.

ZHANG, L.; WEI, L. J. ACTX-8, a cytotoxic l-amino acid oxidase isolated from Agkistrodon acutus snake venom, induces apoptosis in Hela cervical cancer cells. **Life Sciences**, v. 80, n. 13, p. 1189–1197, 6 mar. 2007.

ZHANG, L.; WU, W. T. Isolation and characterization of ACTX-6: A cytotoxic L-amino acid oxidase from Agkistrodon acutus snake venom. **Natural Product Research**, v. 22, n. 6, p. 554–563, 15 abr. 2008.

ZHANG, Y. YU; NING, B. TAO. **Signaling pathways and intervention therapies in sepsis**. **Signal Transduction and Targeted Therapy**Springer Nature, , 1 dez. 2021.

ZHAO, Y. et al. Altered Serum Metabolite Profiling and Relevant Pathway Analysis in Rats Stimulated by Honeybee Venom: New Insight into Allergy to Honeybee Venom. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 871–880, 31 jan. 2018.

ZHONG, S. R. et al. Purification and characterization of a new l-amino acid oxidase from Daboia russellii siamensis venom. **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 763–771, 2009.

Apêndice

APÊNDICE

Artigos publicados durante o doutorado:

- Castro, KLP*; **Lopes-de-Souza, L***; Oliveira, D; Machado-de-Ávila, RA; Paiva, ALB; Freitas, CF; Ho, PL; Chávez-Olórtegui, C; Guerra-Duarte, C. A Combined Strategy to Improve the Development of a Coral Antivenom Against Micrurus spp. Frontiers in Immunology, 2019. DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02422

* *Esses autores contribuíram igualmente neste trabalho.*

- **Lopes-de-Souza, L**; Costal-Oliveira, F; Stransky S; Freitas, CF; Guerra-Duarte, C; Braga, VMM; Chávez-Olórtegui, C. Development of a cell-based *in vitro* assay as a possible alternative for determining bothropic antivenom potency. Toxicon, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.09.010

- Rincon-Filho, S; Naves-de-Souza, DL; **Lopes-de-Souza; L**; Silvano-de-Oliveira, J; Ferreyra, CB; Costal-Oliveira, F; Guerra-Duarte, C; Chávez-Olórtegui. *Micrurus surinamensis* Peruvian snake venom: Cytotoxic activity and purification of a C-type lectin protein (Ms-CTL) highly toxic to cardiomyoblast-derived H9c2 cells. International Journal of Biological Macromolecules, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.033.

- Alves Belo, A; Naves de Souza, DL; Melo-Braga, MN; **Lopes de Souza, L**; Molina, DAM; Melo, PDV; Larsen, MR; Guerra-Duarte, C; Chávez-Olórtegui, C. Production of a murine mAb against *Bothrops alternatus* and *B. neuwiedi* snake venoms and its use to isolate a thrombin-like serine protease fraction. International Journal of Biological Macromolecules, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.127.