

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

**Mariana do Nascimento Costa**

**Avaliação do potencial anticâncer da L-lisina  $\alpha$ -oxidase  
recombinante de *Trichoderma harzianum***

**RIBEIRÃO PRETO**

**2020**

**Mariana do Nascimento Costa**

**Avaliação do potencial anticâncer da L-lisina  $\alpha$ -oxidase  
recombinante de *Trichoderma harzianum***

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão  
Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do  
título de Doutora em Ciências.**

**Área: Bioquímica.**

**Orientador: Prof. Dr. Roberto do Nascimento Silva**

**Ribeirão Preto/SP**

**2020**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Costa, Mariana do Nascimento

Avaliação do potencial anticâncer da L-lisina  $\alpha$ -oxidase recombinante de *Trichoderma harzianum*. Ribeirão Preto, 2020.

76 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Silva, Roberto do Nascimento.

1. L-lisina  $\alpha$ -oxidase. 2. *Trochoderma harzianum*. 3. Anticâncer.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIANA DO NASCIMENTO COSTA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DA L-LISINA  $\alpha$ -OXIDASE  
RECOMBINANTE DE *Trichoderma harzianum***

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Doutora em  
Ciências.**

**Área de concentração: Bioquímica.**

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Banca examinadora

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico essa tese aos meus pais Ilse e  
Sérgio e a minha avó Onilva. Por  
todo amor e carinho que me dedicam.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus e mentores espirituais que me iluminaram nessa jornada.

Ao Prof. Dr. Roberto pela confiança depositada em mim. Por contribuir para a minha formação científica, por sua compreensão e paciência. Por me incentivar, acreditar no meu trabalho e especialmente por ter me ajudado nos momentos de dificuldade. Obrigada por ser um exemplo de profissional dedicado a ciência e por sempre ser atencioso com seus alunos.

Aos meus pais, Ilse e Sérgio. Por tudo que fizeram e fazem por mim. Por serem minha base, há quem eu sempre recorro nos momentos difíceis. Obrigada por todo amor, apoio e por sempre torcerem por mim.

À minha avó Onilva, por ter sempre uma palavra carinhosa. Por ser um exemplo de positividade e fé. Obrigada por todas as orações. Pelo amor, carinho e atenção.

À toda a minha família que mesmo de longe sempre vibra com as minhas conquistas.

Aos meus amigos de longa data Elise, Malson, Renato, Ana Paula, Camila e Bruno por todos esses anos de amizade. Por tudo que vivemos e viveremos juntos.

Às amigas Nathália, Leka, Karol e Elise por terem compartilhado o lar comigo durante esses anos de doutorado.

Às amigas Alinne, Vanessa, Amanda e Karol pela amizade sincera, pelo carinho e por todas as aventuras que já vivemos juntas.

Aos amigos de laboratório Liliane, David, Iasmin, Cláudia, Mari Z, Letícia, Douglas e Wellington, pessoas incríveis que tenho o privilégio de conviver diariamente. Obrigada pelas discussões científicas, pelas risadas, por tornarem o ambiente de trabalho harmonioso e agradável.

Às técnicas Zuleica, Silvia e Vera por todo o suporte, por manter nosso laboratório sempre organizado e pela convivência diária.

Aos amigos da Bioquímica, Matheus, Sarah, Diego, Jhonatan, Nichelle, André, Tatiana e Leonardo. Por compartilharem das mesmas experiências acadêmicas e também pelos cafês, almoços e momentos de descontração.

À Maria Ivone por todo apoio e dedicação comigo e com todos os colegas de pós-graduação da Bioquímica. E também ao pessoal da secretaria, Rose e Ronaldo.

Aos Professores Eduardo Brandt, Vitor Faça, Marcelo Damário e Cláudio Costa-Neto por disponibilizarem reagentes e seus laboratórios para a utilização de equipamentos imprescindíveis para realização deste trabalho.

Aos docentes do Departamento de Bioquímica e Imunologia por compartilharem seus conhecimentos teóricos, práticos e que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação científica.

Ao Rafael Ricci de Azevedo e Felipe Roberti Teixeira que colaboraram na execução de diversas etapas desse trabalho.

Ao Thiago Aparecido Silva por me auxiliar no planejamento e desenvolvimento dos experimentos com cultura de células e citometria de fluxo. E à Prof.<sup>a</sup> Maria Cristina Barreira por disponibilizar seu laboratório para realização desses experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida a mim.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

*“... que a importância de uma coisa não se mede com fita métrica nem com balanças nem com barômetros etc. Que a importância de uma coisa há que ser medida pelo encantamento que a coisa produza em nós.”*

*Manoel de Barros*

## RESUMO

COSTA, M. N. Avaliação do potencial anticâncer da L-lisina  $\alpha$ -oxidase recombinante de *Trichoderma harzianum*. 2020. 76p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A L-lisina  $\alpha$ -oxidase (LO) de *Trichoderma harzianum* é uma enzima da família das L-aminoácido oxidases (LAAOs), flavoproteínas que são alvo de grande interesse médico devido a sua alta toxicidade sobre diversos patógenos e linhagens de células tumorais. A LO é de grande interesse biotecnológico, porque assim com outras LAAOs, pode promover a depleção de aminoácidos do ambiente tumoral, afetando reações metabólicas essenciais para o crescimento das células do câncer. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial anticâncer da LO recombinante (rLO) de *T. harzianum*, bem como caracterizar o tipo de morte induzido e as vias de sinalização envolvidas. Inicialmente, foram determinadas as condições de estocagem para melhorar a estabilidade de rLO e nossos resultados mostraram que rLO é mais estável quando armazenada em solução de glicerol 50%. Determinou-se que a cauda de GST a qual rLO está fusionada é importante para a estabilidade da enzima e por isso foi mantida. Porém, a proteína GST sozinha não foi tóxica para as células, indicando que o efeito observado é atribuído a rLO. Em seguida, a toxicidade foi testada em células Jurkat por citometria de fluxo e observou-se que concentrações maiores que 1 mU/mL de rLO reduziram significativamente a viabilidade de Jurkat, apresentando um efeito dose-dependente. Além disso, os marcadores Anexina V-FITC e PI foram utilizados para rastrear eventos de apoptose e apoptose tardia, que foi confirmado por citometria de fluxo. Também foi feita uma análise de microscopia *time-lapse* que mostrou que as células estimuladas com rLO entram em apoptose depois de cerca de 8 horas do tratamento. A toxicidade de rLO também foi testada em células não tumorais da linhagem HEK 293T que não teve a viabilidade afetada por rLO, bem como não induziu apoptose nesse tipo celular. Por fim, estudou-se, através do uso de inibidores, as possíveis vias de sinalização envolvidas na indução de morte das células Jurkat tratadas com rLO. As vias que responderam ao estímulo de rLO foram ERK, JNK e p38. Conclui-se, portanto, que LO é capaz de reduzir a viabilidade e promover apoptose em células da linhagem Jurkat através da ativação de MAPKs que regulam diversas atividades celulares relacionadas ao desenvolvimento do câncer, incluindo proliferação, diferenciação, apoptose, autofagia e inflamação.

Palavras-chave: L-lisina  $\alpha$ -oxidase. *Trichoderma harzianum*. Anticâncer.

## ABSTRACT

COSTA, M. N. Evaluation of anticancer potencial of recombinant L-lysine  $\alpha$ -oxidase from *Trichoderma harzianum*. 2020. 76p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

L-lysine  $\alpha$ -oxidase (LO) from *Trichoderma harzianum* is an enzyme of the L-amino acid oxidase's (LAAOs) family. LAAOs are flavoproteins that are the subject of great medical interest because of its high cytotoxicity on various pathogens and tumor cell lines. Like others LAAOs, LO can promote amino acid depletion of the tumor environment, affecting metabolic reactions essential for tumor cell growth. Thus, this work proposes to evaluate the anticancer potential of recombinant LO from *T. harzianum*, as well as to characterize the type of induced death and the signaling pathways applied. Initially, storage conditions were defined to improve the stability of LO and our results show that LO is more stable when stored in 50% glycerol solution. We determined the GST tag which LO is fused is important for enzyme stability so it was maintained. However, a GST protein alone was not toxic to cells, indicating that the effect observed is attributed to LO. Next, the LO's toxicity was tested on Jurkat cells by flow cytometry and we observed that doses higher than 1 mU/mL of LO reduced Jurkat viability, exhibiting a dose-dependent effect. In addition, Annexin V-FITC and PI markers were used to track apoptosis and late apoptosis events, which were confirmed by flow cytometry. A time lapse microscopy analysis was performed which showed that cells stimulated with LO go in apoptosis after 8 hours of treatment. The toxicity of rLO was also tested in HEK 293T cells line, a non-tumor cell type. The rLO did not affect the cell viability and didn't induce apoptosis in this cells. Finally, we used some inhibitors to determine the signaling pathway that is involved in LO mechanism in Jurkat cells. The p38, JNK and ERK reacted to LO's stimulus. We concluded that LO is able to reduce viability and promote apoptosis in Jurkat cell line by activating MAPKs that regulate various physiological activities related to cancer development including proliferation, differentiation, apoptosis, autophagy and inflammation.

Keywords: L-lysine  $\alpha$ -oxidase (LO). *Trichoderma harzianum*. Anticancer.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ATO: *do inglês*, trióxido de arsênio
- BSA: *do inglês*, albumina de soro bovino
- cDNA: DNA complementar
- DMEM: Dullbecco modified Eagle's Minimal Essential Medium
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DNA: *do inglês*, ácido desoxirribonucleico
- DO: densidade óptica
- ERK: *do inglês*, quinase regulada por sinal extracelular
- FAD: flavina adenina dinucleotídeo
- FADH<sub>2</sub>: flavina adenina dinucleotídeo reduzida
- FDA: Food and Drug Administration
- FITC: *do inglês*, isotiocianato de fluoresceína
- FPLC: fast protein liquid chromatography
- GST: Glutathione S-transferase
- INCA: Instituto Nacional do Câncer
- IPTG: *do inglês*, isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
- JNK: *do inglês*, quinase c-jun N-terminal
- Jurkat: Linhagem celular de leucemia linfóide de célula T humana
- H-7: inibidor de PKC
- kDa: *do inglês*, quilodalton
- MAPK: *do inglês*, proteína quinase ativada por mitógeno
- LAAO: L-aminoácido oxidase
- LB: meio Luria-Bertani
- LO: L-lisina α-oxidase
- MBTH: *do inglês*, 3-Metil-2-Benzotiazolinone Hidrazona
- PBMC: *do inglês*, células mononucleares do sangue periférico
- PBS: *do inglês*, tampão fosfato salina
- PCR: *do inglês*, reação em cadeia da polimerase
- PD98059: inibidor de ERK
- PDL: Population Doubling Level

PI: *do inglês*, iodeto de propídio

PKC: *do inglês*, proteína quinase C

PTK: *do inglês*, proteína tirosina quinase

rLO: L-lisina  $\alpha$ -oxidase recombinante

rLO (GST+): L-lisina  $\alpha$ -oxidase recombinante fusionada à GST

rLO (GST-): L L-lisina  $\alpha$ -oxidase recombinante após remoção de GST

Raji: linhagem celular de linfoma de Burkitt - linfócito de célula B humana

RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium

SB202190: inibidor de p38 MAPK

SFB: Soro Fetal Bovino

SP600125: inibidor de JNK

TCA: *do inglês*, ácido tricloroacético

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Resumo das etapas de purificação de LO produzida em 200 mL de meio LB.....	44
Tabela 2. Atividade enzimática de LO antes e depois da reação de oxidação com ferrocianeto de potássio. ....	44
Tabela 3. Atividade de LO frente à diferentes agentes estabilizantes. ....	45
Tabela 4. Atividade enzimática de LO nas etapas de liofilização. ....	45

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da reação catalisada por uma LAAO.....	22
Figura 2. Produtos da reação de desaminação catalítica de L-lisina pela enzima LO.....	24
Figura 3. Principais características que diferenciam as células cancerígenas..	27
Figura 4. Mapa do vetor pGEX-4T1-LO. O vetor bacteriano pGEX-4T1 é usado para expressão de proteínas fusionadas a GST. ....	33
Figura 5. Expressão e purificação de rLO..	43
Figura 6. Expressão e purificação de LO..	43
Figura 7. Avaliação da viabilidade celular por MTT em células Jurkat.....	46
Figura 8. Concentração de células viáveis após tratamento com rLO.....	47
Figura 9. Porcentagem de células Jurkat em apoptose e apoptose tardia após tratamento com diferentes doses de LO. ....	48
Figura 10. Comparação do efeito de rLO(GST+), rLO(GST-) e de LO comercial de <i>T. viride</i> . .....	50
Figura 11. Efeito de diferentes enzimas na promoção de morte celular em Jurkat. ....	50
Figura 12. Avaliação do efeito da proteína GST na viabilidade de células Jurkat.....	51
Figura 13, Avaliação de morte de células Jurkat após tratamento com GST.....	51
Figura 14. Concentração de células Hek viáveis após tratamento com rLO.....	52
Figura 15. Porcentagem de células Hek em apoptose e apoptose tardia após tratamento com rLO..	53
Figura 16. Análise comparativa por HeatMap da viabilidade de células Jurkat tratadas com LO após diferentes tempos de estímulo.....	54
Figura 17. Microscopia time-lapse de células Jurkat tratadas com rLO..	55
Figura 18. Microscopia time-lapse de células Jurkat sem tratamento (controle)..	56
Figura 19. Efeito de rLO em células Jurkat pré-incubadas com inibidores de diferentes vias de sinalização..	58
Figura 20. Via das MAPK envolvidas no mecanismo de ação de rLO.....	64

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. Fungos do gênero <i>Trichoderma</i> : produção de enzimas e suas aplicações biotecnológicas .....	20
2.2. L-aminoácido oxidases: características e aplicação comercial.....	21
2.3. A L-lisina $\alpha$ -oxidase é uma enzima com potencial anticancerígeno .....	24
2.4. Privação de aminoácido como estratégia para terapia anticâncer e mecanismos moleculares envolvidos.....	26
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivo geral .....	31
3.2. Objetivos específicos .....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
4.1. Produção e purificação de L-lisina $\alpha$ -oxidase.....	33
4.2. Reação de formação de pontes dissulfeto intramoleculares por ferricianeto de potássio	34
4.3. Ensaio de atividade enzimática.....	35
4.4. Padronização das condições de estocagem de rLO .....	35
4.5. Manutenção das células .....	36
4.6. Avaliação toxicidade de rLO por MTT .....	36
4.7. Avaliação da toxicidade de rLO por citometria de fluxo.....	37
4.8. Avaliação do efeito de rLO (GST+) e rLO (GST-) em células Jurkat .....	38
4.9. Avaliação cinética da viabilidade de células Jurkat tratadas com rLO.....	38
4.10. Microscopia <i>time-lapse</i> .....	38
4.11. Ensaio de inibição de moléculas sinalizadores em células Jurkat estimuladas com LO	39
4.12. Análise estatística.....	39

5. RESULTADOS.....	42
5.1. Produção e purificação de L-lisina $\alpha$ -oxidase.....	42
5.2. Efeito do agente oxidante $K_4[Fe(CN)_6]$ na atividade enzimática de rLO .....	44
5.3. Efeito de agentes estabilizantes na atividade enzimática de rLO .....	44
5.4. Avaliação da toxicidade de rLO por MTT.....	46
5.5. Avaliação da toxicidade de rLO por citometria de fluxo.....	47
5.5.1. Efeito da concentração de rLO na viabilidade de células Jurkat .....	47
5.5.2. Efeito de rLO na indução de apoptose em células Jurkat .....	48
5.6. Análise comparativa da toxicidade de rLO antes e depois da remoção da cauda de GST 49	
5.7. Avaliação da toxicidade da proteína Glutathione S-transferase (GST).....	51
5.8. Avaliação da toxicidade de rLO em células Hek.....	52
5.9. Análise cinética do efeito de rLO em células Jurkat.....	53
5.10. Microscopia time-lapse .....	54
5.11. Avaliação das vias de sinalização ativadas por rLO .....	57
6. DISCUSSÃO.....	60
7. CONCLUSÕES.....	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70

*Introdução*

---

## 1. INTRODUÇÃO

Biofármaco é a designação dada a medicamentos originados a partir de processos biotecnológicos nos quais o princípio ativo do medicamento é obtido através do emprego industrial de microrganismos ou células modificadas geneticamente. Essa denominação engloba as proteínas terapêuticas (hormônios, enzimas e anticorpos monoclonais), os soros, as vacinas, e outros produtos de alta tecnologia, como os medicamentos de terapia gênica e celular (KESIK-BRODACKA, 2018).

A produção de biofármacos é de alta complexidade. São moléculas grandes (de 5000 a 25000 átomos) cujo processo de produção e purificação traz grandes desafios operacionais e tecnológicos. Muitos são produzidos via tecnologia do DNA recombinante e, devido ao seu caráter biológico, muitas etapas de validação precisam ser realizadas até que se obtenha um produto ativo e estável. Apesar de toda essa complexidade, esses produtos são os que mais avançam no mercado farmacêutico, uma vez que tem alta eficácia, especificidade, e relativa segurança, principalmente nos casos até então não tratáveis (SALERNO; MATSUMOTO; FERRAZ, 2018).

O desenvolvimento desse tipo de medicamento predomina nos Estados Unidos, onde tradicionalmente o investimento em P&D dentro desse setor industrial é alto (cerca de 20% do faturamento anual - US\$ 50 bilhões/ano). Por essa razão, o país foi responsável por mais de 50% das novas moléculas lançadas no mundo na última década (SALERNO; MATSUMOTO; FERRAZ, 2018).

O Brasil produz hoje, via transferência de tecnologia, apenas 25 biofármacos para doenças como hemofilia, esclerose múltipla, artrite reumatóide, leucemia e diabetes. Segundo o 2º Censo da Indústria Farmoquímica Nacional, essa desigualdade reflete uma fragilidade na área relacionada principalmente à capacitação tecnológica e produtiva e tem alto impacto nos cofres públicos, uma vez que, os produtos biológicos representam cerca de 60% dos gastos públicos de medicamentos, consumindo 43% dos recursos do Ministério da Saúde para importação, o que corresponde a cerca de R\$4 bilhões/ano (TURCHI; MORAIS, 2017; FINEP, 2017).

Essa dependência do mercado externo coloca o Brasil em situações difíceis, como em 2015 quando os fornecedores da droga L-asparaginase anunciaram a interrupção da sua produção. Até então, os hospitais adquiriam o medicamento do Laboratório Bagó, que detinha o registro no Brasil da L-Asparaginase com o nome comercial Elspar<sup>®</sup>,

fabricada por indústrias americanas e alemãs. Quando a empresa brasileira que o distribuía informou ao governo federal que o produtor estrangeiro havia interrompido a fabricação, o Ministério da Saúde anunciou um novo pregão que resultou na compra da asparaginase chinesa LeugiNase<sup>®</sup>, uma droga que não apresentava estudos clínicos e, portanto, não tinha eficácia comprovada. Essa situação colocou em risco o tratamento de mais de 4000 pacientes e se prolongou por quase um ano até que o Ministério da Saúde adquirisse uma versão confiável da droga (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Esse medicamento é utilizado no Brasil desde a década de 70 para tratamento de leucemia linfóide aguda, um tipo de câncer que afeta principalmente crianças e adolescentes. Tal enzima possui ação similar à da L-lisina oxidase (LO), objeto de estudo dessa tese, atuando na depleção de aminoácidos importantes para o crescimento tumoral. Sendo que alguns estudos apontam que LO apresenta um espectro diferente e mais amplo de atuação quando comparado à asparaginase. Além disso, nesse mesmo estudo, LO teve ação antiproliferativa mais eficiente, com doses terapêuticas mais baixas. (EDAKOVA; IRSOVA, 2000).

É importante informar que a enzima lisina oxidase foi produzida no nosso laboratório, em um trabalho que teve pedido de registro de patente aprovado. Ela foi produzida de forma recombinante, no extrato solúvel, com atividade enzimática e bom rendimento. Além disso, testes prévios mostraram que a LO recombinante (rLO) produzida por nós, apresentou importante atividade citotóxica e antiproliferativa em células leucêmicas (PROCESSO nº BR 10 2016 020994-3).

É nesse contexto que a L-lisina oxidase revela-se candidata promissora a um biofármaco anticâncer, fazendo-se necessário prosseguir com os testes de avaliação *in vitro* e *in vivo* para a obtenção de dados farmacológicos importantes, tal como a elucidação de seu mecanismo de ação no ambiente tumoral.

*Revisão bibliográfica*

---

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Fungos do gênero *Trichoderma*: produção de enzimas e suas aplicações biotecnológicas

Os fungos do gênero *Trichoderma* (Ascomycetes, Hypocreales) foram descritos por Persoon em 1794, catalogados por Rifai em 1969 e reúne espécies anamórficas que são comumente encontradas no solo e em matéria orgânica em decomposição. Espécies de *Trichoderma* são amplamente distribuídas, podendo ser encontrados em diferentes ecossistemas que variam desde a tundra até o tropical (SAMUELS, 1996). Esses fungos possuem dois estágios morfológicos que são fisiologicamente diferentes. O estágio sexual (teleomérico) possui o nome genérico de *Hypocrea*, enquanto que o estágio assexual (anamórfico) é denominado *Trichoderma*. Dentre as principais características dos isolados de *Trichoderma* estão: a capacidade metabólica diversificada, colônias de rápido crescimento em cultura, a produção de conídios (esporos) de coloração verde e micélio aéreo (DRUZHININA et al., 2011).

*Trichoderma* spp. possuem inúmeros mecanismos de sobrevivência e proliferação, dentre os quais se destacam, o ataque físico a outros fungos e a degradação e utilização de carboidratos complexos (HARMAN et al., 2004). Devido a essas características, esses fungos são de grande interesse econômico e biotecnológico e são amplamente utilizados em aplicações comerciais. *Trichoderma reesei*, por exemplo, é muito estudado quanto a sua alta capacidade de produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, utilizadas na produção de bioetanol de segunda geração a partir de resíduos agrícolas ricos em celulose (KUBICEK et al., 2001). Na agricultura, as espécies *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* e *Trichoderma virens* são muito estudadas por seu papel como agente de biocontrole de doenças e vetores virais (CHET; INBAR; HADAR, 1997). Tais fungos são naturalmente agressivos contra fitopatógenos como *Botrytis*, *Rhizoctonia* e *Fusarium*, agentes responsáveis por perdas substanciais de diferentes culturas agrícolas. A atividade micoparasítica de algumas espécies de *Trichoderma* envolve, além do contato físico, a síntese de enzimas hidrolíticas e também a produção de compostos tóxicos com ação antibactericida (BENÍTEZ et al., 2004).

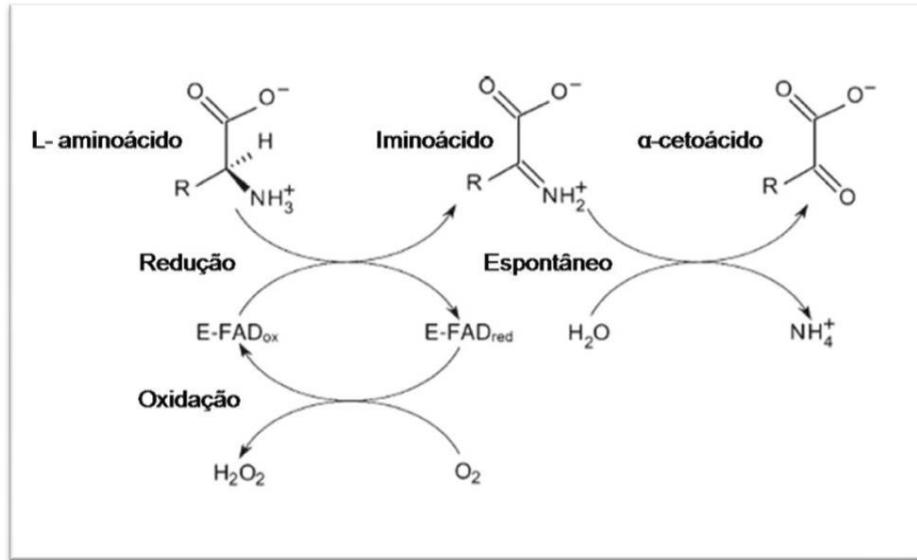
Dentre as enzimas sintetizadas por *Trichoderma* spp. estão as L-aminoácido oxidases (LAAOs), proteínas hidrolíticas naturalmente secretadas pelos fungos. Essas

enzimas foram primeiramente identificadas em uma análise proteômica do extrato de *T. harzianum* em resposta a *Rhizoctonia solani* (TSENG et al., 2008), um fungo patógeno em plantas, que causa podridão das raízes de diversas raízes como feijão, soja e batata (CHET; HARMAN; BAKER, 1981). Yang e colaboradores avaliaram o efeito da LAAO de *T. harzianum* em *R. solani*. Eles observaram que a enzima não só promoveu a lise das hifas, como também a inibição do seu crescimento. Quando observados ao microscópio óptico, eles observaram várias disfunções morfológicas das hifas como, inchaço, vacuolização e malformação. Quando testaram o efeito da enzima contra *T. harzianum* o efeito foi oposto ao de *R. solani*. Tanto a densidade da hifa quanto a esporulação do fungo aumentaram na presença de Th-LAAO, indicando que *T. harzianum* utiliza algum mecanismo de reconhecimento que não só impede a toxicidade como estimula a proliferação. Acredita-se, portanto que as LAAOs têm um envolvimento no mecanismo de micoparasitismo de *T. harzianum* atuando na degradação da parede celular do fungo parasitado (YANG et al., 2011).

Com relação ao mecanismo, inicialmente, acreditava-se que apenas o peróxido de hidrogênio produzido na reação catalisada pelas LAAOs seria o responsável pela toxicidade atribuída a elas (TSENG et al., 2008). Entretanto, a aplicação exógena de peróxido de hidrogênio não promoveu o efeito de inibição do crescimento observado. Logo, foi proposto que essas enzimas estariam promovendo a hidrólise dos aminoácidos das proteínas que compunham a parede celular do fungo parasitado e o peróxido seria responsável por induzir a apoptose (YANG et al., 2011).

### **2.2.L-aminoácido oxidases: características e aplicação comercial**

As L-aminoácido oxidases (LAAO EC 1.4.3.2) são flavoenzimas que foram descritas pela primeira vez em 1944 por Zeller e Maritz. Essas enzimas contêm uma molécula de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) como grupo prostético e catalisam uma reação de desaminação de determinados aminoácidos produzindo  $\alpha$ -cetoácido e amônia (Figura 1). Nesse processo o cofator é reduzido a FADH<sub>2</sub> que na presença de O<sub>2</sub> é regenerado produzindo peróxido de hidrogênio (POLLEGIONI; MOTTA; MOLLA, 2013).



**Figura 1. Esquema da reação catalisada por uma LAAO.** O L-aminoácido é reduzido a iminoácido que, por sua vez, converte-se espontaneamente em um α-cetoácido. O cofator FAD é reduzido e o processo de reoxidação leva a formação do peróxido de hidrogênio. Fonte: Adaptado de POLLEGIONI; MOTA; MOLA, 2013.

As LAAOs são amplamente distribuídas na natureza podendo ser encontradas em diferentes organismos como ofídios, mamíferos, insetos, moluscos, peixes, algas e microorganismos como bactérias, leveduras e fungos (LUKASHEVA; BEREZOV, 2002); YU; QIAO, 2012) e sua função geralmente está envolvida na proteção contra parasitas (YANG et al., 2011). Do ponto de vista bioquímico, as LAAOs de diferentes origens apresentam diferenças quanto a massa molecular, ao substrato de preferência e as modificações pós-traducionais. Adicionalmente, essas enzimas também diferem quanto ao ambiente ótimo de atividade.

As LAAOs de serpentes são os membros mais bem estudados dessa família de enzimas (DU; CLEMETSON, 2002), sendo que as mesmas estão entre os componentes mais tóxicos da peçonha desses animais (IZIDORO et al., 2014). Os eventos após o envenenamento que levam a agregação plaquetária, apoptose e hemorragia, em geral, estão associados à atividade das LAAOs (ANDE et al., 2006). O primeiro trabalho de identificação de LAAO em ofídios foi realizado em 1944, quando Zeller e Maritz analisaram a peçonha de *Vipera aspis*, uma serpente responsável por graves acidentes em alguns países europeus. Desde então, enzimas de diferentes espécies de serpentes foram caracterizadas e estudadas quanto a sua aplicação farmacológica como bactericidas, antivirais e antitumorais (COSTA TORRES et al., 2010); (CISCOTTO et al., 2009).

As LAAOs de serpentes possuem um amplo espectro de substratos, reagindo com diferentes aminoácidos, enquanto que as L-aminoácido oxidases de microorganismos possuem maior especificidade quanto ao substrato de preferência, por exemplo, L-glutamato oxidase de *Streptomyces endus* (BÖHMER et al., 1989), L-fenilalanina oxidase de *Pseudomonas* (KOYAMA, 1982) e L-lisina  $\alpha$ -oxidase de *Trichoderma* (LUKASHEVA; BEREZOV, 2002) oxidam principalmente os aminoácidos que lhe dão o nome e apresentam baixa afinidade por outros (HOSSAIN et al., 2014).

As LAAOs podem ser intracelulares, extracelulares e algumas se encontram ligadas à membrana e sua localização depende de sua origem e função. Aquelas cuja ação esteja ligada à proteção contra ameaças externas, incluindo a L-lisina  $\alpha$ -oxidase de *Trichoderma*, são excretadas para o meio extracelular durante o crescimento do microorganismo (HOSSAIN et al., 2014).

O potencial biotecnológico das LAAOs se aplica a diversas áreas. Uma das mais estudadas é a aplicação dessas enzimas como componentes de biossensores (MUTAGUCHI et al., 2011; CHAUHAN et al., 2013). O desenvolvimento de métodos rápidos e baratos de determinação de concentração de aminoácidos pode ser útil em várias áreas como nas análises clínicas e de diagnóstico (HUANG et al., 1998), no controle e otimização de bioprocessos fermentativos (VÁRADI et al., 1999), na produção de ração animal (CHAUHAN et al., 2013), entre outros.

Além disso, as LAAOs são alvo de grande interesse biotecnológico devido a sua alta toxicidade sobre diversos patógenos como vírus, bactérias (LEE et al., 2011), protozoários (TEMPONE et al., 2001) e, principalmente sobre linhagens de células tumorais; (DU; CLEMETSON, 2002). Abordagens bioquímicas baseadas na especificidade do metabolismo de células cancerosas têm conduzido à elaboração de diversos métodos originais de diagnóstico e terapia.

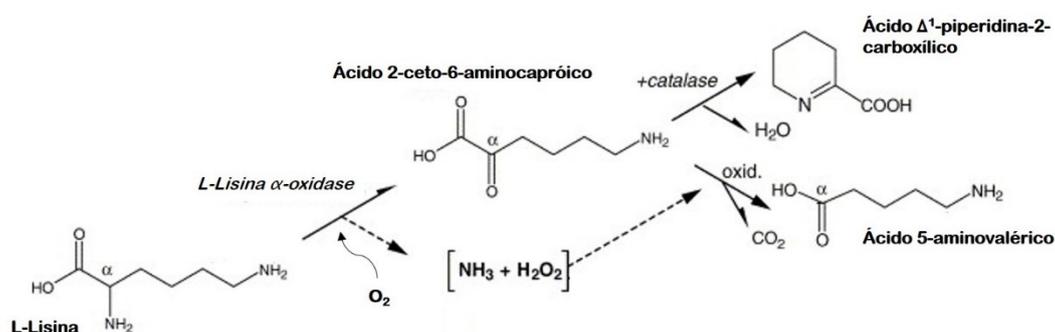
De fato, alguns tumores são seletivamente sensíveis à diminuição do nível de certos metabólitos como os aminoácidos essenciais. Neste sentido, cientistas de todo o mundo têm investido esforços na investigação e caracterização dessas enzimas capazes de quebrar aminoácidos uma vez que elas apresentam uma promissora aplicação nas áreas biomédicas (FUNG; CHAN, 2017); FERNANDES et al., 2017).

Vários estudos investigam os efeitos farmacológicos das LAAOs, sendo que alguns trabalhos já descreveram amplos efeitos biológicos como a indução de apoptose (SUN et al., 2003), inibição de agregação plaquetária (SAKURAI et al., 2001),

hemorragia, hemólise e edema (SUN et al., 2003; STILES; SEXTON; WEINSTEIN, 1991). Esses eventos biológicos ocorrem não só em consequência da hidrólise de aminoácidos mas também devido ao efeito secundário do peróxido de hidrogênio produzido durante a reação enzimática (COSTA TORRES et al., 2010).

### 2.3.A L-lisina $\alpha$ -oxidase é uma enzima com potencial anticancerígeno

As LAAOs isoladas de peixes e outros organismos marinhos assim como as provenientes de fungos, oxidam preferencialmente a L-lisina. A L-lisina  $\alpha$ -oxidase (LO EC 1.4.3.14) ou L-lisil  $\alpha$ -oxidase, possui o nome sistemático de L-lisina: O<sub>2</sub> 2-oxidoreductase e é um homodímero cujas subunidades são idênticas com peso molecular de 60 kDa e contém FAD como cofator. Durante a reação enzimática da LO, a L-Lisina na presença de oxigênio é convertida em ácido 2-ceto-6-aminocapróico que pode ser transformado espontaneamente no derivado cíclico ácido  $\Delta^1$ -piperidina-2 carboxílico. A reação também gera os subprodutos amônia e peróxido de hidrogênio. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode promover a oxidação do ácido 2-ceto-6-aminocapróico convertendo-o em ácido 5-aminovalérico (Figura 2) (LUKASHEVA; BEREZOV, 2002; GÓMEZ et al., 2006).



**Figura 2. Produtos da reação de desaminação catalítica de L-lisina pela enzima LO.** Fonte: Adaptado de GÓMEZ et al., 2006.

A LO foi primeiramente isolada de *Trichoderma viride* Y244-2 (KUSAKABE et al., 1980) e posteriormente, em 1984 de *Trichoderma harzianum*. A investigação da

especificidade por substratos mostrou que a LO de *T. harzianum* catalisa preferencialmente a deaminação oxidativa de L-lisina e com menor rendimento os aminoácidos L-arginina, L-fenilalanina e L-ornitina (LUKASHEVA; BEREZOV, 2002). Da mesma forma que outras L-aminoácido oxidases, LO exibe uma alta estereoespecificidade, sendo absolutamente inerte em relação aos aminoácidos D-isômeros.

Do ponto de vista biotecnológico, uma característica importante de LO é sua estabilidade em uma ampla faixa de pHs e temperaturas (LUKASHEVA; BEREZOV, 2002), que permite seu uso como ferramenta analítica na quantificação de L-lisina em alimentos e em processos de fermentação. Alguns estudos, inclusive, buscam desenvolver sensores de aminoácidos através da imobilização dessa enzima (CHAUHAN et al., 2013).

Existem poucos estudos que mostram a aplicação de LO na medicina do câncer. Entretanto, até o momento sabe-se que essa enzima exibe efeito citotóxico elevado em diversas linhagens tumorais como hepatoma, adenocarcinoma mamário e melanoma. Além disso, estudos com camundongos leucêmicos mostram que LO apresenta efeito superior a L-asparaginase, enzima isolada de *E. coli* e *Erwinia chrysanthemi* e principal droga utilizada atualmente no tratamento de leucemia linfóide aguda (EDAKOVA; IRSOVA, 2000).

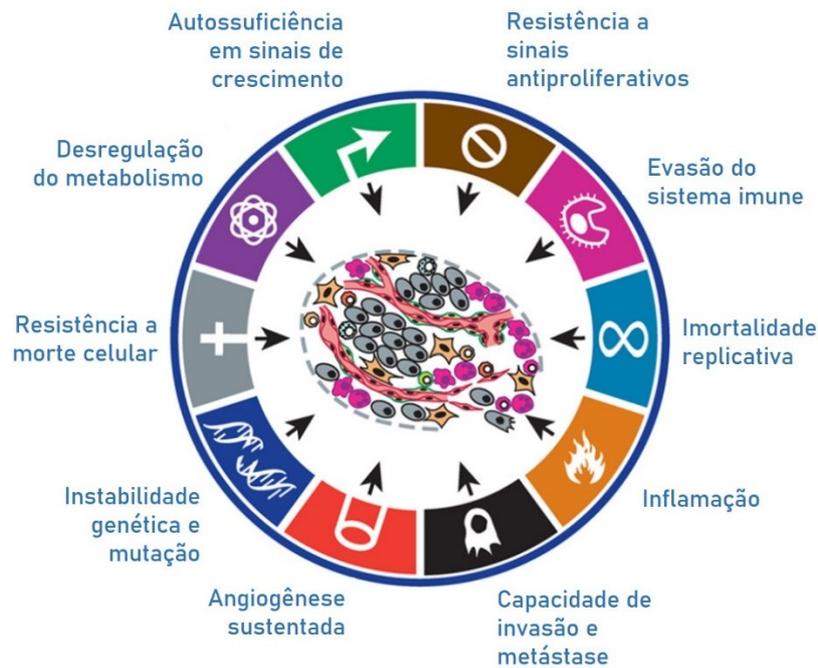
O uso de isótopos radioativos em estudos *in vitro* demonstrou que LO é capaz de suprimir a síntese de DNA, de RNA e de proteínas em células de leucemia da linhagem L5178Y. Além disso, observou-se um aumento de 34 a 45% na sobrevivência de camundongos doentes tratados com LO (KUSAKABE et al., 1980). Pokrovsky e colaboradores (2013) descreveram que LO de *T. aureoviride* é citotóxica para uma grande variedade de células tumorais, incluindo câncer de próstata, de ovário e leucemia eritromieloblastóide. O mesmo estudo mostrou que a administração de altas doses de LO em camundongos que não eram doentes foi bem tolerado, não afetando os níveis do aminoácido essencial L-lisina nos animais saudáveis (POKROVSKY et al; 2013).

O efeito de LO pode ser atribuído a depleção de L-lisina e ao peróxido de hidrogênio produzido. Porém, estudos mostram que a hidrólise de aminoácidos é a principal razão de LO reduzir o crescimento tumoral, uma vez que o efeito, embora reduzido, foi observado mesmo na presença de catalase. (KHADUEV KH. et al., 1991).

#### **2.4.Privação de aminoácido como estratégia para terapia anticâncer e mecanismos moleculares envolvidos**

A sobrevivência de qualquer organismo é dependente de processos de multiplicação, diferenciação e morte celular. Fatores internos e externos das células influenciam esses processos contribuindo para a homeostase e manutenção da população celular dentro dos limites fisiológicos. Quando esse equilíbrio é perturbado, podem ocorrer alterações nos mecanismos reguladores de crescimento e morte celular resultando em proliferação e/ou diferenciação anormal do tecido, tendo como consequência o desenvolvimento do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2000)

Câncer, nome comum para a neoplasia maligna, é um conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de uma população de células que invadem e destroem tecidos adjacentes e que podem migrar para tecidos distantes através de um processo chamado metástase. Hanahan e Weinberg sugerem oito principais alterações na fisiologia celular que, coletivamente, promovem o crescimento maligno das células: autossuficiência de sinais de crescimento, resistência a sinais antiproliferativos, evasão do sistema imune, imortalidade replicativa, inflamação, capacidade de invasão e metástase, angiogênese sustentada, instabilidade genética e mutação, resistência a morte celular, e desregulação do metabolismo (Figura 3) (HANAHAN; WEINBERG, 2011a).



**Figura 3. Principais características que diferenciam as células cancerígenas.** Fonte: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

A desregulação do metabolismo é uma das alterações da fisiologia celular responsáveis pelo crescimento maligno dessas células. O metabolismo glicolítico de células tumorais, por exemplo, é favorecido mesmo na ausência de oxigênio. Isso ocorre em resposta a demanda energética elevada, levando a um estado denominado glicólise aeróbia ou efeito Warburg (HSU; SABATINI, 2008; WARBURG, 1956). Nessas condições a produção de ATP é relativamente baixa, porém os produtos intermediários da glicólise são utilizados na biossíntese de nucleotídeos, aminoácidos e macromoléculas. Nas condições de glicólise aeróbia o metabolismo de aminoácidos está aumentado, de modo que as células tumorais frequentemente apresentam maior expressão de transportadores de glicose e aminoácidos na membrana celular, a fim de obter mais nutrientes da circulação sanguínea (FUNG; CHAN, 2017).

Por diferenciar a célula tumoral da célula saudável, esse aspecto metabólico tem sido explorado por muitos cientistas no desenvolvimento de drogas anticâncer. Os chamados “anti-metabólitos” são drogas capazes de impedir a síntese ou esgotar o suprimento de moléculas essenciais para a proliferação celular como as bases nitrogenadas, os nucleotídeos e os aminoácidos (VANDER HEIDEN, 2011).

Na prática clínica, o uso dos anti-metabólitos é mais comum no tratamento de cânceres hematológicos, como as leucemias e linfomas, porque esses tipos celulares neoplásicos são, frequentemente, auxotróficos à aminoácidos específicos, o que os torna vulneráveis a esses tratamentos (FUNG; CHAN, 2017). Alguns tipos de câncer, como a leucemia linfóide aguda (LLA), possui um defeito na produção da asparagina sintetase, enzima responsável por sintetizar a asparagina intracelular. Esses linfócitos são, portanto, dependentes de fonte externa de asparagina para se desenvolver. É nessa suscetibilidade que atua a L-asparaginase, enzima usada há mais de 40 anos no tratamento de LLA. A L-asparaginase promove a depleção da L-asparagina do meio extracelular impedindo a progressão do câncer e induzindo a apoptose (KAWEDIA; RYTTING, 2014).

Outro exemplo é a glutamina, o aminoácido não-essencial mais abundante no plasma sanguíneo. A glutaminólise (quebra de glutamina) é especialmente aumentada em células tumorais, um indicativo da importância desse aminoácido para essas células. Nesse sentido que o metabolismo de glutamina tem sido explorado, especialmente o desenvolvimento de uma droga inibidora da glutaminase (FUNG; CHAN, 2017). Outros exemplos de sucesso incluem o tratamento de melanomas metastáticos com a enzima arginase, e o uso da metioninase no tratamento de cânceres do sistema nervoso central (FERNANDES et al., 2017).

Os estudos sobre o efeito da lisina no crescimento tumoral remontam o início do século XX quando em 1915 Kocher realizou uma análise quantitativa do conteúdo de aminoácidos de diferentes tipos de tumores. Ele observou que a produção de lisina, arginina e histidina era consideravelmente maior nos tecidos tumorais do que em tecidos saudáveis (WILLIAMS, 1915; KOCHER, 1944). Além disso, a L-lisina e a L-arginina são aminoácidos especialmente requeridos para o rápido crescimento tumoral, uma vez que compõem boa parte das proteínas que organizam a cromatina no núcleo das células (NELSON; COX, 2011).

Além da função nutricional, os aminoácidos possuem uma função reguladora na proliferação das células tumorais através de sinalização direta e integrada do estado energético e de fatores de crescimento (HANAHAN; WEINBERG, 2011b). Sendo assim, a privação de aminoácidos desencadeia uma resposta homeostática nas células que a experimentam. Essa resposta envolve dois mecanismos principais. O primeiro é o aumento da expressão de transportadores de membrana, hormônios de crescimento e enzimas metabólicas com o objetivo de aumentar a captação e a síntese de aminoácidos.

O segundo é a produção de aminoácidos através da reciclagem de proteínas e organelas por autofagia (CHEN et al., 2014; ONODERA; OHSUMI, 2005). Além disso, os tecidos tumorais podem reverter o quadro de *starvation* aumentando a angiogênese (WANG et al., 2013).

Quando esses mecanismos não são suficientes para suprir a falta de aminoácidos, as células passam a inibir a síntese de proteínas, reduzir a taxa de crescimento e por fim submetem-se a morte celular programada. Sendo assim, alguns estudos têm mostrado que os principais mecanismos envolvidos na morte de células submetidas a privação de aminoácidos são a autofagia e a apoptose (MARTINET et al., 2005; SADASIVAN et al., 2006).

Tendo em vista tudo que foi apresentado até então e o potencial de aplicabilidade de LO na indústria farmacêutica que esse trabalho tem como objetivo principal avaliar o potencial anticâncer da L-lisina  $\alpha$ -oxidase recombinante de *Trichoderma harzianum*.

*Objetivos*

---

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Caracterizar os efeitos da enzima L-lisina  $\alpha$ -oxidase recombinante de *Trichoderma harzianum* sobre células de leucemia linfóide Jurkat e investigar os possíveis mecanismos responsáveis por tais efeitos.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Testar condições de estocagem de LO para aumento da estabilidade enzimática;
- Avaliar a toxicidade de rLO em células Jurkat;
- Avaliar a importância da cauda de GST no efeito de rLO células Jurkat;
- Avaliar a toxicidade de rLO em células Hek;
- Avaliar o efeito dose-resposta de rLO na viabilidade de células Jurkat;
- Analisar o efeito temporal de rLO por microscopia time-lapse
- Determinar o mecanismo de ação de rLO através do uso de inibidores de vias de sinalização de MAPK.

*Materiais e métodos*

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Produção e purificação de L-lisina $\alpha$ -oxidase

O protocolo a seguir se refere a produção de rLO, o qual foi desenvolvido durante o projeto de mestrado.

A enzima rLO foi produzida por expressão heteróloga através da transformação do vetor clonado pGEX-4T1-LO (Figura 4) em bactéria *Escherichia coli* da linhagem BL21. O vetor foi construído a partir da clonagem fragmento de LO, amplificado a partir do cDNA de *Trichoderma harzianum*, ao vetor pGEX-4T1 (GE Healthcare).



**Figura 4. Mapa do vetor pGEX-4T1-LO. O vetor bacteriano pGEX-4T1 é usado para expressão de proteínas fusionadas a GST. O vetor possui região de múltipla clonagem que contém vários sítios de restrição dentro dos quais foi adicionado a região correspondente à LO. Entre o domínio de GST e os sítios de clonagem há um sítio de reconhecimento para Trombina que permite a remoção da cauda. Possui também um promotor *lac* para indução com IPTG e região que atribui resistência à ampicilina.**

Bactérias *E. coli* da linhagem BL21 termocompetentes foram transformadas com o vetor pGEX-4T1-LO através de choque térmico. As bactérias foram crescidas exponencialmente a 37°C em meio Luria-Bertani (LB) acrescido de Ampicilina 1µg/µL até atingir a densidade ótica de 0,6 no comprimento de onda de 600 nm. O inóculo foi resfriado à 4 °C e a expressão foi induzida com IPTG 0,5 mM. Além disso, acrescentou-se ao meio de cultura FAD 50 µM. O inóculo foi mantido sob agitação em shaker à 16 °C e 200 rpm por 18 horas.

Passado esse tempo o cultivo foi centrifugado (10000 ×g por 20 minutos a 4 °C) e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi solubilizado em 30 mL de tampão PBS acrescido de lisozima (10 U), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1% e Triton X-100 20 %. A solução foi mantida a 4 °C por 20 minutos e então sonicada para rompimento das células. O extrato resultante da *lise* foi novamente centrifugado (10000 ×g por 20 minutos a 4 °C).

O sobrenadante resultante da centrifugação foi filtrado (filtro de 0,22 µm, Millipore) e inserido em sistema de cromatografia FPLC em coluna empacotada com a resina Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) que possui afinidade pela cauda de GST fusionada a LO. O sistema foi equilibrado com o tampão PBS pH 7,4 e as proteínas foram eluídas com o mesmo tampão acrescido de glutathione reduzida 0,1 M em um fluxo de 0,5 mL/min. As alíquotas coletadas foram armazenadas a -20°C em solução de glicerol 50%.

Quando oportuno, a cauda de GST foi removida através de reação de digestão enzimática com a enzima Protease Trombina (Novagen) na proporção de 1 U para cada 0,5 mg de proteína total. A reação ocorreu a 23 °C, overnight em agitador orbital e após esse período adicionou-se PMSF 0,3 mM para parar a reação de digestão.

Alternativamente, a remoção da cauda foi realizada sem que a proteína fosse eluída da coluna cromatográfica. A coluna foi desmontada e a resina foi incubada diretamente com a Trombina para a digestão.

As enzimas fusionadas ou não à GST foram mantidas à -20°C em solução de glicerol 50%. (PATENTE nº BR 10 2016 020994-3).

#### **4.2.Reação de formação de pontes dissulfeto intramoleculares por ferricianeto de potássio**

Considerando que a LO se encontra naturalmente como um homodímero, procuramos promover a interação entre os monômeros a fim de aumentar a estabilidade da proteína. O protocolo utilizado é baseado na oxidação dos resíduos de cisteína que formam as pontes dissulfeto (ANDREU et al., 1994). O agente oxidante utilizado foi o ferrocianeto de potássio [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] na concentração de 0,01M. A solução de rLO em tampão PBS foi titulada com o ferricianeto de potássio até que a cor levemente amarelada da solução persistisse. A quantidade do oxidante usado foi de aproximadamente 20% do

volume total da solução. O pH foi ajustado para 5 com uma solução de ácido acético. A solução final foi então filtrada em tubo de centrifugação VivaSpin 10kDa MWCO (GE Healthcare) a qual permitiu remoção total da solução e troca para o tampão PBS.

### **4.3. Ensaio de atividade enzimática**

A atividade enzimática de rLO foi avaliada através do método determinado por Kusakabe (1980) adaptado para microplaca. O princípio da reação baseia-se na dosagem do alfa-cetoácido derivado da oxidação da L-lisina. Os componentes da reação são: tampão fosfato de potássio (0,2M pH 8,0), catalase (1U/mL) e L-lisina (0,1M). A enzima rLO é adicionada a mistura (10 µL) e o sistema é incubado à 37°C por 20 minutos. Após esse tempo uma solução de ácido tricloroacético (TCA) (12,5%) é adicionado para parar a reação. O tubo é centrifugado a 6000×g por 5 minutos a fim de remover as proteínas que precipitaram. O sobrenadante é transferido para microplaca térmica juntamente com uma solução de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) (0,1% m/v) e tampão acetato de sódio 1M pH 5,0. A placa é mantida à 50°C por 30 minutos e resfriada até a temperatura ambiente. As amostras são transferidas para microplaca de fundo transparente e a leitura feita no comprimento de onda de 317 nm em espectrofotômetro (xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad). Uma unidade enzimática corresponde a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1 µmol de ácido 6-amino-2-oxohexanóico a partir da L-lisina por minuto a 37 °C e pH 8,0.

### **4.4. Padronização das condições de estocagem de rLO**

O objetivo desse ensaio foi avaliar a estabilidade de rLO quando exposta a diferentes agentes de preservação. Os agentes estabilizantes testados foram: glicerol, manitol e polietilenoglicol em diferentes concentrações. Alíquotas de 100 µL da enzima em tampão PBS e na presença dos diferentes agentes foram conservadas à 4°C e a -20°C. A atividade enzimática das enzimas estocadas nas diferentes condições foi determinada após 30 dias.

#### **4.5. Manutenção das células**

As células foram obtidas no Laboratório de Glicobiologia sob responsabilidade da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Roque Barreira (FMRP/USP). As linhagens utilizadas foram: Jurkat (linfócito T - leucemia linfóide aguda) e Hek 293T (hepatócito). As células foram mantidas sob repiques periódicos em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) ou Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) acrescidos de soro fetal bovino (SFB) 10% e agentes antibacteriano e antimicótico (penicilina 100 µg/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 250 µg/mL), em estufa úmida à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Os meios de cultura, o SFB, e os agentes antibacteriano e antimicótico foram adquiridos da Gibco®, Invitrogen Corporation, Brasil.

As células foram semeadas a uma densidade de  $1 \times 10^6$  células/garrafa e repicadas a cada 48h em fluxo laminar. No início de cada experimento, a suspensão celular foi centrifugada a 200 x g, por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuscitado em 1 ml de meio de cultura. O número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (0,5%) em câmara de Neubauer e foram utilizadas para os experimentos somente as amostras com viabilidade celular superior a 95%.

#### **4.6. Avaliação toxicidade de rLO por MTT**

O MTT é um sal de tetrazolium solúvel em água, que é convertido em um formazam púrpura após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (GERLIER; THOMASSET, 1986). O ensaio colorimétrico funciona como um indicador da função mitocondrial e, por conseguinte, da viabilidade celular.

Sendo assim, células Jurkat na concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL foram semeadas em placas de 96 poços contendo meio de cultura RPMI 1640 completo e concentrações crescentes de rLO (1 a 10 mU/mL). Após 24 e 48 horas de incubação, as placas foram centrifugadas, o sobrenadante removido e adicionou-se ao meio de cultura 10 % (v/v) de solução de MTT (5 mg/ml em PBS). A placa foi mantida em estufa úmida à 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 3 horas. Decorrido esse tempo, o meio de cultura foi removido e os cristais de formazam produzidos foram dissolvidos em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro no comprimento de

onda de 540 nm. A atividade mitocondrial foi expressa como absorbância, sendo que a densidade óptica do grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como 100% de células viáveis.

#### **4.7. Avaliação da toxicidade de rLO por citometria de fluxo**

O princípio deste ensaio baseia-se na ligação da Anexina V à proteína de membrana fosfatidilserina, normalmente encontrada na parte interna da membrana plasmática. Durante o estágio inicial de apoptose ocorre a perda da assimetria da membrana citoplasmática com a consequente externalização dos resíduos de fosfatidilserina. A Anexina V se liga especificamente a estes resíduos e, quando conjugada ao FITC, permite identificar as células em apoptose por citometria de fluxo (VAN ENGELAND et al., 1998). O Iodeto de Propídio, por sua vez, é utilizado como indicador de morte celular. Trata-se de uma molécula que se intercala ao DNA, porém é impermeável à membrana plasmática das células. Desse modo, ele apenas se ligará ao DNA das células mortas, cujo material genético esteja exposto.

Através dessa metodologia é possível identificar a presença de eventos de apoptose, bem como de necrose e viabilidade celular. Esse método foi utilizado nessa tese para avaliar a toxicidade de rLO em células Jurkat e Hek, bem como para caracterizar o efeito dose-resposta, tempo-resposta e também para avaliar o efeito de inibidores em células tratadas com LO.

Sendo assim, as células Jurkat ou Hek na concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL foram semeadas em placas de 96 poços contendo meio de cultura RPMI 1640 completo. A seguir as células foram tratadas com rLO e mantidas em estufa úmida à 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Depois de 24 horas foi adicionado a cada poço 1,5 µL de Anexina V-FITC (BD Pharmigen™) e a placa incubada por mais 30 minutos. O Iodeto de Propídio (1 µL/poço) (Sigma-Aldrich) foi adicionado 5 minutos antes da análise. A concentração e porcentagem de células marcadas com cada fluróforo foi determinada por citometria de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System).

#### **4.8. Avaliação do efeito de rLO (GST+) e rLO (GST-) em células Jurkat**

Como mencionado anteriormente, a L-lisina oxidase recombinante foi produzida fusionada a uma molécula de GST. Essa *tag* pode ser removida em reação enzimática com a enzima Trombina. O efeito das duas formulações (com e sem GST) foi avaliado em células Jurkat, uma vez que testes anteriores mostraram que a remoção de GST promove queda na atividade enzimática de rLO. Para isso, células Jurkat foram semeadas em placa de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^6$  cel/mL e tratada com as enzimas (3 mU/mL). A placa foi mantida em estufa à 37 °C e atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. A concentração e porcentagem de células marcadas com cada fluoróforo foi determinada por citometria de fluxo conforme protocolo descrito no item 4.7 (Guava EasyCyte™ Mini System). A fim de facilitar a compreensão dos resultados as formulações foram denominadas rLO(GST+) para rLO fusionada à GST e rLO(GST-) para rLO sem GST.

#### **4.9. Avaliação cinética da viabilidade de células Jurkat tratadas com rLO**

Esse ensaio foi realizado a fim de verificar o tempo que rLO leva para induzir efeito antiproliferativo nas células Jurkat. Além disso, concentrações mais baixas das testadas até então foram avaliadas. As células Jurkat foram tratadas com diferentes doses de rLO (0,25, 0,5, 1, 2 e 4 mU/mL) e incubadas em estufa à 37°C. A viabilidade das células tratadas foi determinada por citometria de fluxo após os tempos de 6, 10 e 24 horas. No momento das leituras iodeto de propídio foi adicionado a fim de determinar a porcentagem de células viáveis por concentração de rLO e por tempo de tratamento. Células sem tratamento correspondiam ao controle negativo e àquela tratadas com trióxido de arsênio, o controle positivo.

#### **4.10. Microscopia *time-lapse***

A microscopia de *time-lapse* permite observar um objeto microscópico ao longo do tempo. As sequências de imagens do microscópio são fotografadas e depois visualizadas em uma velocidade maior para fornecer uma visão acelerada do processo microscópico. Através dessa técnica podemos observar o efeito temporal de rLO nas

células tratadas. Para isso, células Jurkat na concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL foram tratadas com 1 mU/mL de rLO em meio RPMI completo acrescido de 7  $\mu$ L de Anexina V-FITC (BD Biosciences) e 2  $\mu$ L de PI 1  $\mu$ g/mL (Sigma-Aldrich). A cultura foi transferida para uma placa óptica com fundo de vidro (MatTek Corporation) e encaminhada para análise. O microscópio é equipado com uma câmara incubadora que permite manter a temperatura a 37°C e a concentração de CO<sub>2</sub> a 5% (BioStation IMq, Nikon). A captação das imagens se iniciou após um período de 1 hora, necessário para estabilização da cultura e ajuste do foco. Oito campos diferentes foram selecionados e uma foto foi tirada a cada 3 minutos. Os filtros utilizados foram os de 480nm (corresponde a luz verde - FITC), 600 nm (correspondente a luz vermelha – PI) e o campo claro. Após um período de 18 horas de gravação, as fotos foram reunidas para produção de um vídeo que permite observar a incorporação dos marcadores Anexina e PI pelas células ao longo do tempo. O mesmo experimento foi realizado para células não tratadas com rLO. As imagens foram editadas e vídeo obtido através do software Fiji ImageJ (SCHINDELIN et al., 2012)

#### **4.11. Ensaio de inibição de moléculas sinalizadores em células Jurkat estimuladas com LO**

As células Jurkat ( $1 \times 10^5$  cél/mL) foram distribuídas em microplacas de 96 poços e mantidas em estufa à 37°C por 1 hora para que as células se depositassem no fundo da placa. Após esse tempo, as células foram pré-tratadas com os seguintes inibidores: PD98059 (inibidor de ERK), genisteína (inibidor de PTK), SB202190 (inibidor de p38), SP600125 (inibidor de JNK) e H-7 (inibidor de PKC), todos na concentração de 20  $\mu$ M. Depois de 3 horas, rLO 1 mU/mL foi adicionada à cultura de células. Após um período de 24 horas as células foram analisadas por citometria de fluxo em relação a ligação do marcador Anexina V-FITC e a incorporação do iodeto de propídio. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.

#### **4.12. Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism 8. A diferença estatística

entre os grupos estudados foi determinada pela análise de variância (1-way ANOVA) seguido do teste de múltipla comparação de Bonferroni. As diferenças que forneceram um  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significantes.

*Resultados*

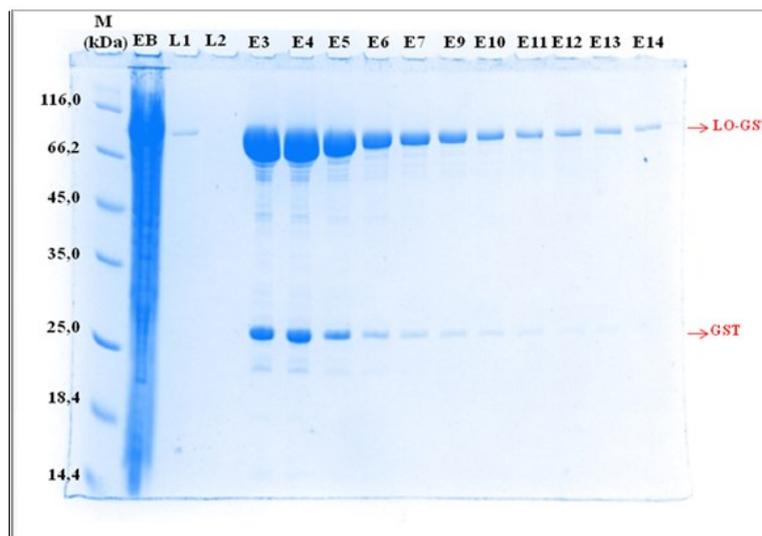
---

## 5. RESULTADOS

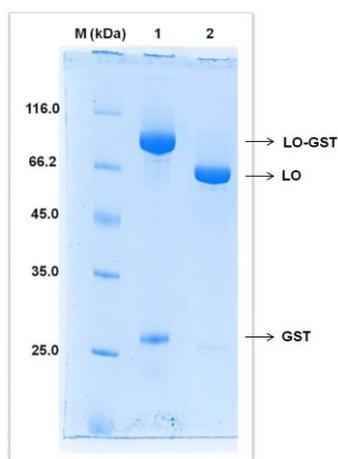
### 5.1. Produção e purificação de L-lisina $\alpha$ -oxidase

A proteína LO recombinante foi produzida a partir do inóculo de uma colônia de bactéria transformada com o vetor pGEX-LO. As bactérias cresceram em meio LB líquido com ampicilina à 37 °C e 200 rpm até alcançar a densidade óptica de 0.6. Após esse período, a indução da expressão da proteína foi feita com IPTG 0,5 mM e FAD 0,5 mM a 16 °C. Após 18 horas nessas condições, as células bacterianas foram rompidas e o extrato solúvel submetido à cromatografia de afinidade em coluna com a resina Gluthatione Sepharose. A figura 5 mostra o perfil proteico das frações de lavagem e eluição da cromatografia. Nas frações de eluição (E) pode se notar uma banda forte entre 66 e 116 kDa referente a proteína recombinante em fusão com a cauda de GST. Além disso, observa-se também uma proteína menor, de aproximadamente 26 kDa correspondente a GST.

As frações coletadas foram reunidas e dialisadas contra o tampão ótimo da enzima de restrição Trombina Protease. Após a diálise, a amostra foi incubada com a trombina e 20 $\mu$ L da resina para clivagem e remoção da cauda de GST do meio. A amostra resultante continha a enzima LO não-fusionada, como se pode ver no gel SDS-PAGE representado na figura 6. Na coluna 1 observa-se a amostra antes da digestão, com as duas bandas: GST de 26 kDa e LO fusionada a GST, de aproximadamente 92 kDa. A proteína pura está na coluna 2 do gel, que mostra uma banda única de aproximadamente 60 kDa. (Dados publicados - PATENTE nº BR 10 2016 020994-3)



**Figura 5. Expressão e purificação de rLO.** A enzima recombinante foi expressa em *E. coli*, intracelularmente, porém solúvel. A purificação foi feita por afinidade à resina Glutathione Sepharose na figura: gel SDS-PAGE das frações coletadas. M: marcador de peso molecular. EB: extrato bruto. L (lavagem): fração eluída após lavagem. E (eluição): frações coletadas após lavagem da coluna com tampão de eluição.



**Figura 6. Expressão e purificação de LO.** A enzima recombinante foi expressa em *E. coli*, intracelularmente, porém solúvel. A purificação foi feita por afinidade à coluna Glutathione Sepharose 4FF. A proteína teve a cauda de GST removida através de reação de digestão com trombina. M: marcador de peso molecular. Coluna 1: Proteína LO fusionada a GST. Coluna 2: Proteína LO após remoção da cauda de GST.

Abaixo, a tabela 1 mostra os dados de atividade enzimática e concentração de proteínas em cada etapa de produção de rLO. Após a cromatografia de afinidade o rendimento total é de 37,39% com valores de 12,2 U/mL de atividade e 8,1 U/mg de atividade específica. A atividade cai consideravelmente depois de alguns dias de congelamento que passa a ser de 2,2 U/mL. Além disso, a remoção de GST também prejudica a função enzimática de rLO, que cai para 0,6 U/mL.

**Tabela 1** Resumo das etapas de purificação de LO produzida em 200 mL de meio LB.

Etapa	Proteína total (mg)	Volume (mL)	Atividade (U/mL)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)
Extrato bruto	27	30	43,5	195,75	7,25	100
Cromatografia de afinidade	9	6	12,2	73,2	8,1	37,39

### 5.2.Efeito do agente oxidante $K_4[Fe(CN)_6]$ na atividade enzimática de rLO

Os dados da literatura indicam que LO nativa de *T. harizanum* apresenta-se na forma homodimérica, cuja estrutura tridimensional é importante para a sua função enzimática. O sistema de expressão bacteriano não é capaz de realizar a dimerização de proteínas heterólogas, portanto esse procedimento deve ser realizado posteriormente a sua purificação. Para isso, a enzima rLO nas versões fusionada [rLO(GST+)] e não fusionada à GST [(rLO(GST-))] foram submetidas a titulação com o reagente oxidante ferrocianeto de potássio em um protocolo que facilita a formação de pontes dissulfeto intermoleculares. Na tabela 2 abaixo, tem-se os dados de atividade enzimática antes e depois da reação de oxidação. Como pode-se observar, a reação promoveu um aumento de na atividade de rLO(GST+) de 2,2, para 4,6 U/mL, correspondendo a mais de 200%. A versão não fusionada, rLO(GST-), também reagiu com um aumento de 0,6 para 1,0 U/mL.

**Tabela 2.** Atividade enzimática de LO antes e depois da reação de oxidação com ferrocianeto de potássio.

Enzima	Atividade enzimática (U/mL)	
	Antes da reação	Depois da reação
rLO(GST-)	0,6	1,0
rLO(GST+)	2,2	4,6

### 5.3.Efeito de agentes estabilizantes na atividade enzimática de rLO

A estabilidade da L-lisina oxidase foi testada com diferentes estabilizantes, os quais PEG 3350, 6000 e 8000, sorbitol, glicerol e manitol todos na concentração de 1M

e glicerol 20 e 50% v/v. As amostras foram mantidas em geladeira (4°C) ou freezer (-20°C) e a atividade enzimática foi testada depois de 30 dias de estocagem.

A tabela 3 apresenta os dados de atividade relativa de cada condição. A atividade é dada em porcentagem em relação a amostra sem estabilizantes. Todas as amostras foram diluídas em tampão fosfato salino PBS (pH 7,4). Como pode-se observar, a atividade tende a se perder com o tempo, sendo o efeito mais pronunciado naquelas armazenadas na geladeira. O glicerol 50% e o PEG 8000 foram os agentes estabilizantes mais eficientes, sendo que o primeiro promoveu inclusive aumento na atividade enzimática quando comparado ao controle. A partir desses dados a armazenagem de LO em glicerol 50% e freezer foi eleita a condição padrão de estocagem.

**Tabela 3. Atividade de LO frente à diferentes agentes estabilizantes.**

Estabilizante	Atividade relativa (%)	
	Geladeira (4°C)	Freezer (-20°C)
Sem estabilizante	100	100
PEG 3350 0,01M	12	46
PEG 6000 0,01M	15	51
PEG 8000 0,01M	42	98
Sorbitol 1M	18	22
Glicerol 1M	33	39
Manitol 1M	20	25
Glicerol 20% (v/v)	37	50
Glicerol 50% (v/v)	76	217

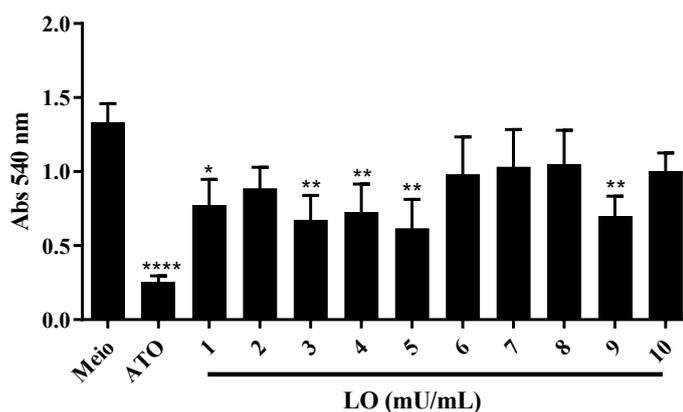
Outra possibilidade testada foi a liofilização de LO. Para isso, 3 mg de proteína recém purificada foi dialisada contra o tampão bicarbonato de amônio 0,02 M. A amostra foi então congelada em nitrogênio líquido e liofilizada. Para os testes de atividade a proteína foi ressuspensa em tampão PBS. A tabela 4 mostra os dados de atividade da enzima durante o processo. Observa-se uma queda brusca na atividade de LO depois da diálise que não é recuperada posteriormente.

**Tabela 4. Atividade enzimática de LO nas etapas de liofilização.**

Etapa	Atividade enzimática (U/mL)
Antes da diálise	4,2 U/mL
Depois da diálise	0,6 U/mL
Depois de liofilizar	0,6 U/mL

#### 5.4. Avaliação da toxicidade de rLO por MTT

A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). O MTT é um sal solúvel em água, que é convertido em um formazam púrpura após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983). Nesse experimento as células da linhagem Jurkat (foram tratadas com diferentes concentrações de rLO e incubadas à 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>). Após o período de incubação de 24 horas, o meio de cultura removido e adicionado novo meio contendo MTT 0,5 mg/ml por 2 horas à 37°C e o formazam reduzido foi solubilizado pela adição de dimetilsulfóxido (DMSO). A avaliação da viabilidade celular foi medida em um leitor de Elisa (540 nm). Como observado na figura 7 não foi possível determinar um comportamento dose-resposta com as concentrações testadas, embora seja possível verificar que a maioria das concentrações testadas tenha promovido um efeito de redução da viabilidade das células. Outros testes foram realizados, os quais indicaram falta de reprodutibilidade no teste de MTT. Talvez isso aconteça porque as células Jurkat são suspensas (não-aderentes) e a manipulação do meio para a realização do teste pode inviabilizar/remover algumas células, causando variabilidade nos resultados finais. Portanto, testamos outra metodologia a fim de melhor avaliar o efeito de rLO sobre as células.



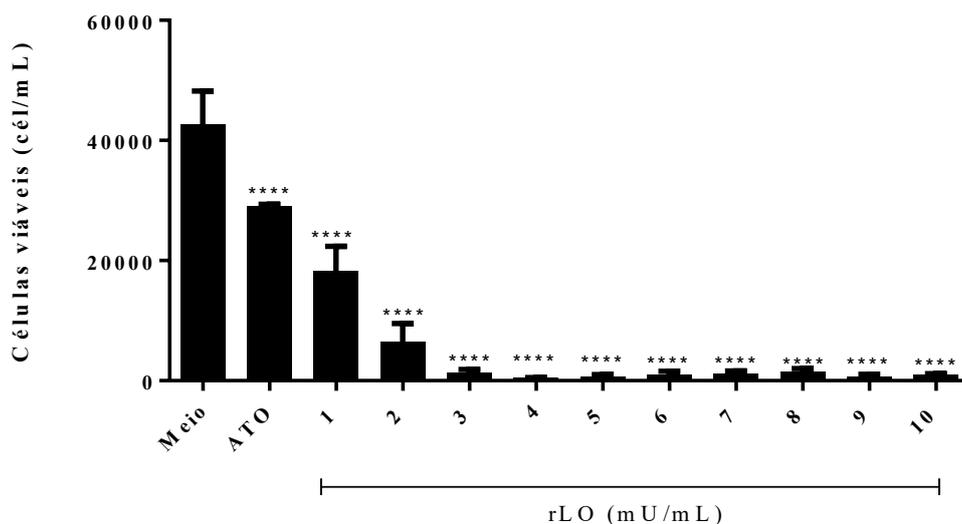
**Figura 7. Avaliação da viabilidade celular por MTT em células Jurkat.** Células Jurkat foram tratadas com diferentes doses de rLO (1 a 10 mU/mL).

### 5.5. Avaliação da toxicidade de rLO por citometria de fluxo

Os experimentos a seguir foram realizados utilizando a enzima fusionada à GST a qual, para simplificar, foi denominada rLO.

#### 5.5.1. Efeito da concentração de rLO na viabilidade de células Jurkat

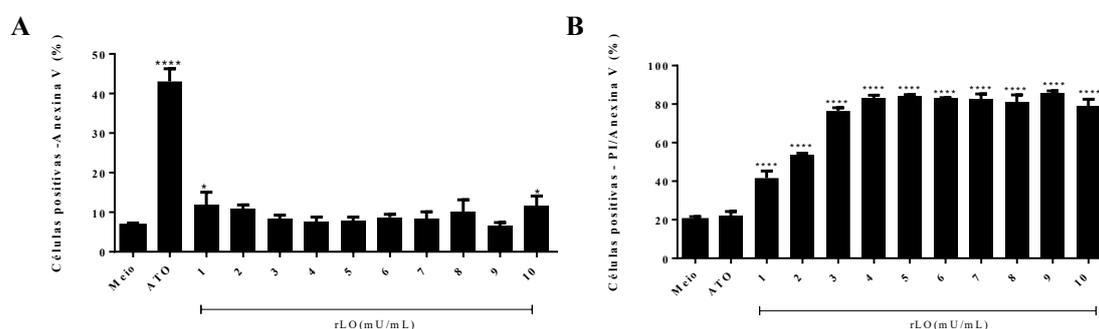
A influência de rLO na viabilidade de células Jurkat foi avaliada por citometria de fluxo através da análise da incorporação do iodeto de propídio (PI). O PI é incorporado às células necróticas, cujo conteúdo genético esteja exposto. Sendo assim, as células viáveis correspondem à população de células que não foram marcadas com PI. A figura 8 mostra a concentração de células viáveis (PI-negativas) depois de 24 horas de tratamento com diferentes doses de LO e trióxido de arsênio (ATO). A diminuição da concentração de células viáveis foi progressiva em relação ao aumento da concentração de rLO. Houve uma redução de cerca de 58% da viabilidade das células tratadas com 1mU/mL de LO. Já a dose de 10mU/mL promoveu uma redução de 98% na viabilidade das células. Esses resultados indicam que LO diminui a viabilidade das células Jurkat de modo dose-dependente, apresentando eficiência superior ao do controle positivo (ATO). Além disso, pode-se inferir que rLO tem efeito antiproliferativo nessa linhagem celular.



**Figura 8. Concentração de células viáveis após tratamento com rLO.** As células da linhagem Jurkat foram tratadas com doses de 1 a 10 mU/mL de LO e após 24 horas analisadas por citometria de fluxo. A viabilidade foi determinada pela comparação do número de células PI-negativas entre o controle negativo (meio) e os tratamentos testados. Controle positivo: ATO.

### 5.5.2. Efeito de rLO na indução de apoptose em células Jurkat

Além do efeito na viabilidade, também foi avaliado se rLO induzia apoptose nas células Jurkat. Para isso, foi utilizado a Anexina V marcado com FITC, um ligante de fosfatilserina, que por sua vez, é um sinalizador de apoptose. A figura 9 apresenta dois gráficos, o primeiro (gráfico A) mostra a porcentagem de células positivas para Anexina V após 24 horas tratamento com LO. O gráfico B apresenta a porcentagem de células marcadas tanto com Anexina V quanto com PI. Como pode-se observar no gráfico A, a porcentagem de células marcadas somente com Anexina V nas condições testadas foi baixa (máximo de 11%). Ou seja, apresentou baixa significância em comparação às células sem tratamento (6% de células positivas) enquanto que cerca de 43% das células tratadas com ATO apresentavam marcação para apoptose. Por outro lado, no gráfico B, a porcentagem de células duplamente marcadas após estímulo com LO é alto. Quando comparada ao meio (20%), a porcentagem é aproximadamente 2 vezes maior (41%) para a concentração mais baixa (1mU/mL) e 4 vezes maior para as concentrações mais altas (de 3 a 10mU/mL). Esses dados indicam que LO induz apoptose nas células Jurkat, porém como em 24 horas essa marcação veio acompanhada da incorporação do PI, dá-se a esse evento o nome de apoptose tardia, uma vez que as células já se encontram mortas. Sendo assim, concluímos que nas condições testadas, LO foi capaz de induzir apoptose nas células Jurkat em menos de 24 horas de tratamento.



**Figura 9. Porcentagem de células Jurkat em apoptose e apoptose tardia após tratamento com diferentes doses de LO.** Gráfico A: Células positivas para Anexina V (apoptose). Gráfico B: Células positivas para PI e Anexina V (apoptose tardia). Controle negativo (meio): células sem tratamento. Controle positivo: ATO.

### **5.6. Análise comparativa da toxicidade de rLO antes e depois da remoção da cauda de GST**

A fim de facilitar a compreensão dos resultados as formulações foram denominadas rLO(GST+) para a enzima fusionada à GST e rLO(GST-) para a enzima não fusionada.

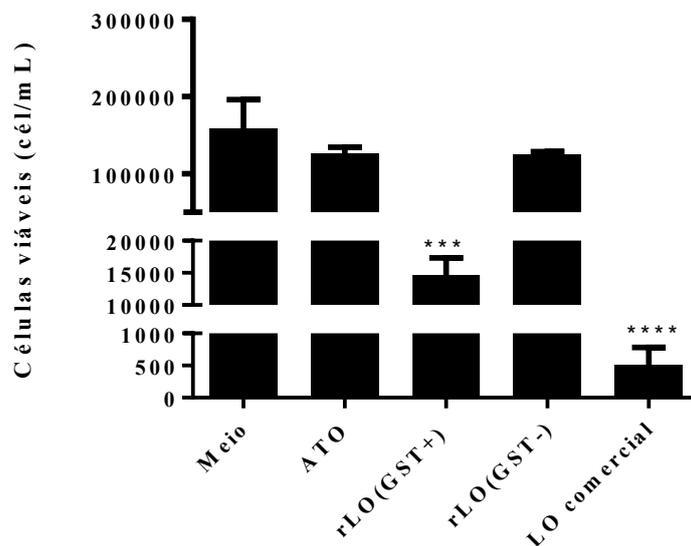
A enzima L-lisina oxidase foi produzida em *E. coli* através da transformação do vetor pGEX 4T1 clonado a com sequência genômica de LO. A proteína é expressa fusionada a GST, uma proteína de 26 kDa que tem alta afinidade por glutatona, o que permite a purificação por cromatografia de afinidade em coluna Glutathione Sefarose. A GST pode ser separada de LO através de uma reação com a enzima Trombina, uma vez que há um sítio de restrição para essa enzima localizado entre a LO e a *tag*. Entretanto, os testes de estabilidade apresentados no item 5.1., mostraram que a atividade enzimática de rLO cai significativamente depois da remoção de GST. Sendo assim, foi realizada uma análise comparativa das duas enzimas (com e sem GST) com relação a toxicidade de ambas em células Jurkat. Além disso, uma LO comercial de *T. viride* foi testada nas mesmas condições. Todas as enzimas foram testadas na concentração de 3 mU/mL. Os marcadores PI e Anexina V permitiriam determinar a viabilidade bem como eventos de apoptose e apoptose tardia das células tratadas com cada uma dessas enzimas.

A Figura 10 mostra a concentração de células Jurkat viáveis após 24 horas de tratamento com as diferentes enzimas. Como pode-se observar, não houve diferença significativa na viabilidade das células tratadas com rLO sem GST [rLO(GST-)]. Por outro lado, rLO(GST+) apresentou alta toxicidade com uma redução de 90% no número de células viáveis. A LO comercial foi ainda mais tóxica, apresentando menos de 1% de células viáveis.

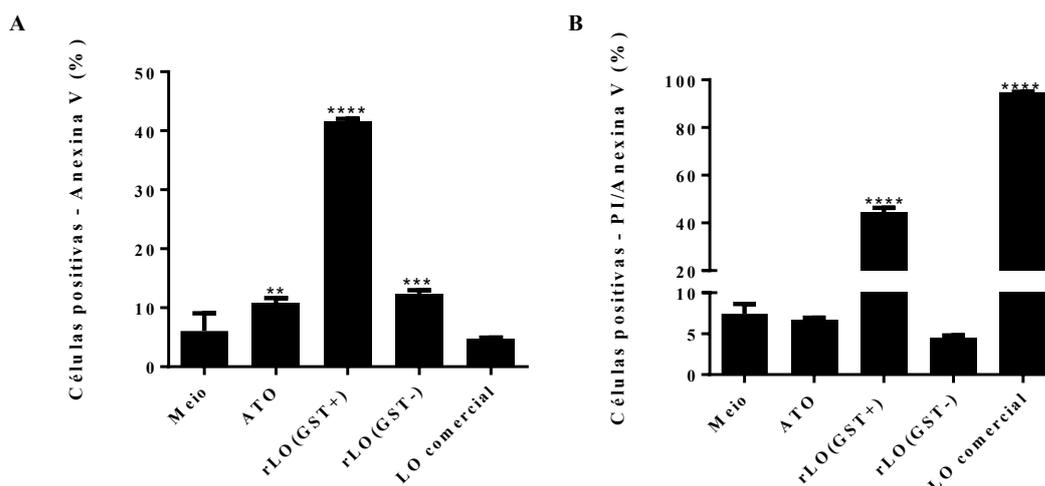
A Figura 11A mostra que após 24 horas, cerca de 41% das células tratadas com rLO(GST+) estavam em estágio inicial de apoptose. O efeito de rLO(GST-) foi menos pronunciado com cerca de 12% de células marcadas com Anexina V. LO comercial apresentou 4%, enquanto que o meio (células sem tratamento) tinha cerca de 6% de células positivas.

A dupla marcação com Anexina V e PI indica a porcentagem da população de células que tiveram morte celular em decorrência de estímulo apoptótico. Essa variável

está representada na Figura 11B, que mostra que apenas rLO(GST+) e LO-comercial apresentaram diferença significativa quando comparada ao controle, com valores de 44% e 94% respectivamente. Por outro lado, o controle (meio) apresentou 7% e LO 4% de células em apoptose tardia.



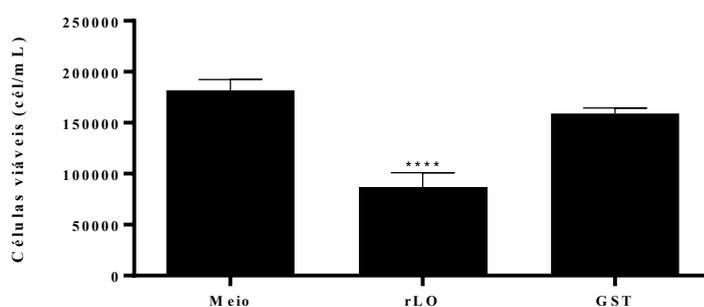
**Figura 10. Comparação do efeito de rLO(GST+), rLO(GST-) e de LO comercial de *T. viride*.** A viabilidade das células Jurkat foi determinada por análise de exclusão de PI via citometria de fluxo. Controle negativo (meio): células sem tratamento. Controle positivo: ATO



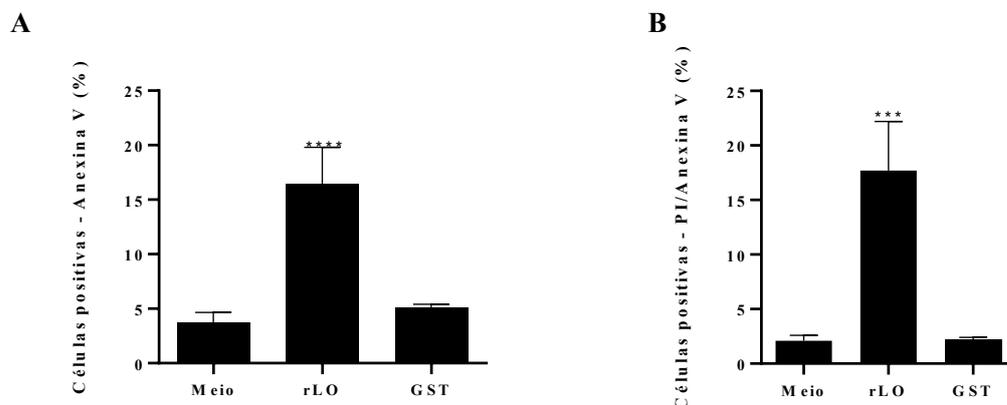
**Figura 11. Efeito de diferentes enzimas na promoção de morte celular em Jurkat.** Gráfico A: Porcentagem de células positivas para Anexina V. Gráfico B: porcentagem de células positivas para PI + Anexina V. Controle negativo (meio): células sem tratamento. Controle positivo: ATO.

### 5.7. Avaliação da toxicidade da proteína Glutationa S-transferase (GST)

Tendo em vista os resultados do acima foi questionado se o efeito de LO-GST poderia ser atribuído unicamente à GST. Sendo assim, foi realizada uma análise comparativa entre rLO (que contém a cauda de GST) e a proteína GST sozinha, com relação aos mesmos parâmetros avaliados anteriormente. O que se observou foi que não houve diferença significativa na viabilidade das células tratadas com GST (Figura 12), enquanto que rLO reduziu em 52% a viabilidade dessas células. O mesmo comportamento foi observado na análise de células positivamente marcadas para Anexina V e PI+Anexina V (Figura 13 A e B). Esses dados indicam que a toxicidade de rLO pode ser atribuída a ação da enzima LO e não a presença da cauda de GST que provavelmente contribui para a estabilização de rLO.



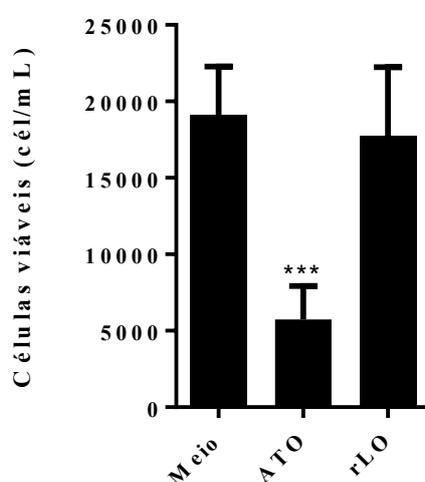
**Figura 12. Avaliação do efeito da proteína GST na viabilidade de células Jurkat.** As células Jurkat foram tratadas com GST. A concentração de células viáveis foi determinada por citometria de fluxo em ensaio de exclusão de iodeto de propídio. Controle negativo (meio): células sem tratamento. Controle positivo: rLO.



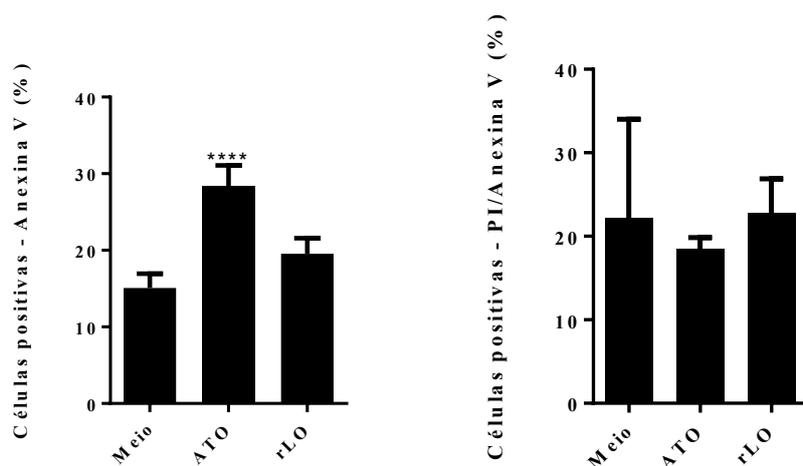
**Figura 13, Avaliação de morte de células Jurkat após tratamento com GST.** A capacidade de GST em promover apoptose e apoptose tardia foi avaliada por marcação de Anexina V e PI em citometria de fluxo. Gráfico A: Porcentagem de células positivas para Anexina V. Gráfico B: porcentagem de células positivas para PI + Anexina V. Controle negativo (meio): células sem tratamento. Controle positivo: rLO.

### 5.8. Avaliação da toxicidade de rLO em células Hek

A toxicidade de rLO foi testada em células de linhagem não cancerosa Hek 293T (hepatócito) por citometria de fluxo. A viabilidade foi determinada por exclusão de iodeto de propídio e a apoptose por marcação com Anexina V. A figura 14 apresenta a concentração de células Hek viáveis depois de 24 horas do tratamento com rLO e ATO. Como pode-se observar, LO não afetou a viabilidade e não inibiu o crescimento das células. Além disso, não houve diferença na porcentagem de células em apoptose e apoptose tardia entre o controle (meio) e as células tratadas com LO (figura 15).



**Figura 14. Concentração de células Hek viáveis após tratamento com rLO.** As células da linhagem Hek 293T foram tratadas com a dose de 3 mU/mL de rLO e após 24 horas foram analisadas por citometria de fluxo. A viabilidade foi determinada pela comparação do número de célula PI-negativas entre o controle negativo (meio) e os tratamentos testados. Controle positivo: ATO.



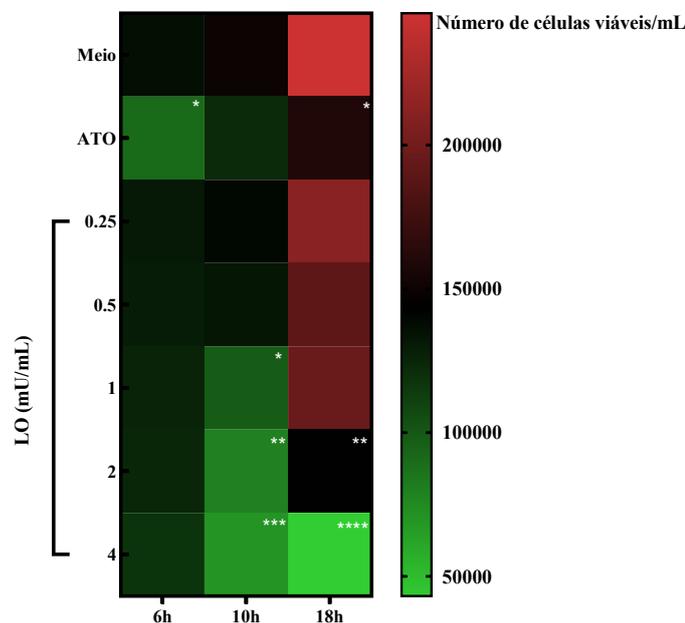
**Figura 15. Porcentagem de células Hek em apoptose e apoptose tardia após tratamento com rLO.** Gráfico A: Células positivas para Anexina V (apoptose). Gráfico B: Células positivas para PI e Anexina V (apoptose tardia). Controle negativo (meio): células sem tratamento. Controle positivo: ATO.

### 5.9. Análise cinética do efeito de rLO em células Jurkat

Considerando a alta taxa de morte celular promovida nas condições testadas no item 5.5, um novo experimento foi realizado, dessa vez com concentrações de 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 mU/mL de rLO. Além disso, o experimento foi realizado de modo a se obter uma análise cinética da morte celular induzida por rLO. Para isso, a viabilidade das células tratadas foi examinada após os tempos de 6, 10 e 18 horas de tratamento. O parâmetro utilizado para determinar a viabilidade foi, novamente, a incorporação do iodeto de propídio.

A figura 16 apresenta o HeatMap que compara a concentração de células viáveis nos diferentes tempos e tratamentos. A análise estatística indicou que não houve diferença significativa na viabilidade entre os tratamentos e o meio no período de 6 horas, exceto para o controle positivo, ATO. É possível verificar o efeito de rLO no tempo de 10 e 18 horas nas concentrações de 1, 2 e 4mU/mL apresentando, inclusive, efeito superior ao de ATO. As concentrações de 0,25 e 0,5mU/mL promoveram uma discreta diminuição da viabilidade (13 e 22%, respectivamente) no tempo de 18 horas, porém, esses valores não foram considerados significativos. Observa-se também que, de modo geral o número de células aumenta no tempo de 18 horas em relação aos tempos anteriores (exceto para a

condição de 4 mU/mL). Provavelmente, isso acontece porque as células que não foram afetadas continuam a proliferar se sobrepondo ao efeito da droga.

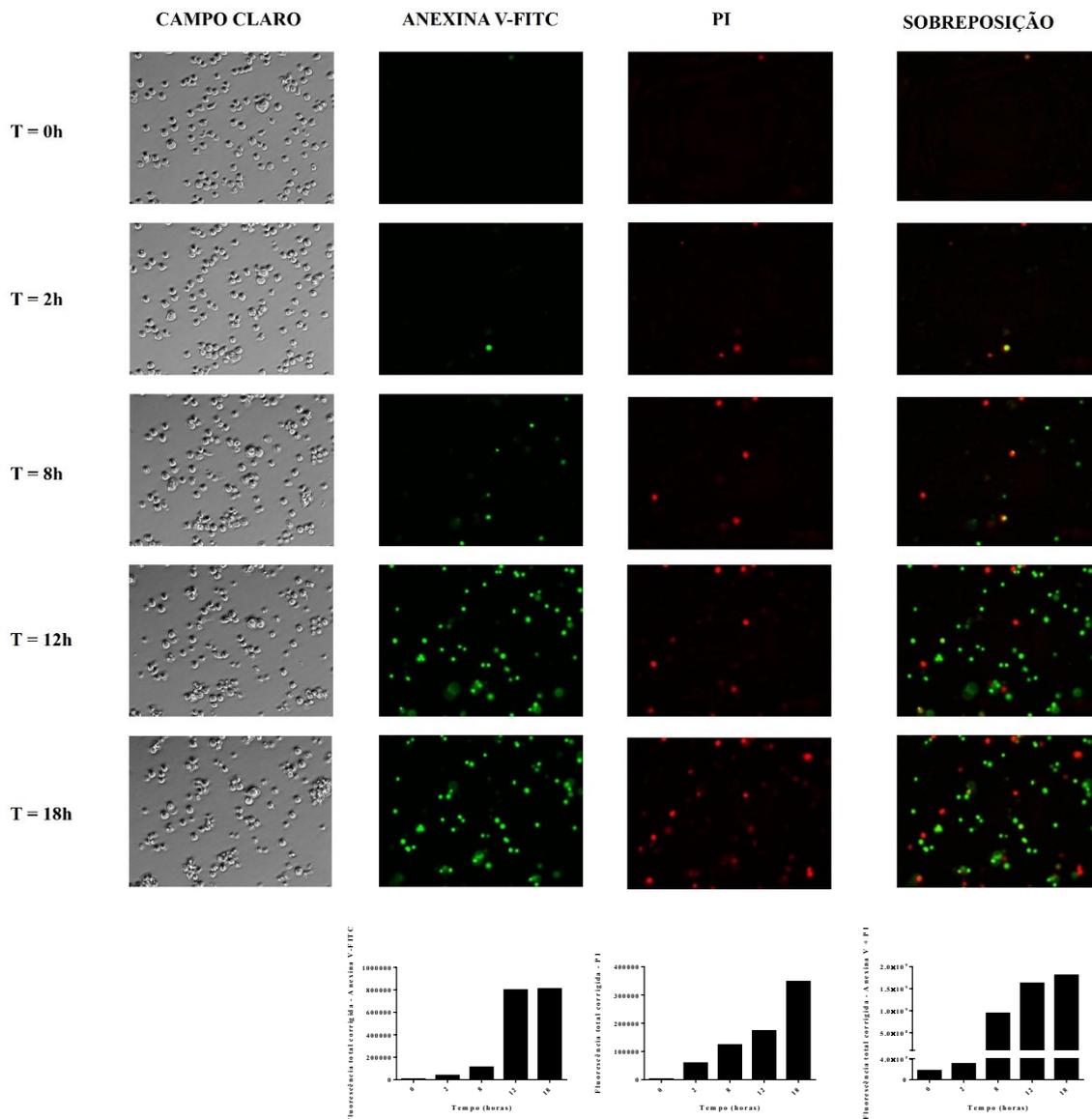


**Figura 16. Análise comparativa por HeatMap da viabilidade de células Jurkat tratadas com LO após diferentes tempos de estímulo.** Células da linhagem Jurkat foram tratadas com as doses de 0,25, 0,5, 1, 2 e 4mU/mL de rLO. Após os tempos de 6, 10 e 18 horas foi adicionado iodeto de propídio às amostras e a viabilidade foi determinada por análise da incorporação de PI por citometria de fluxo. Controle negativo (meio): células sem tratamento. Controle positivo: ATO.

### 5.10. Microscopia time-lapse

A microscopia time-lapse é interessante porque permite observar os eventos microscópicos durante determinado tempo. O experimento foi realizado no microscópio de fluorescência BioStation IMq (Nikon) que é equipado com uma câmara incubadora que permite manter a temperatura a 37°C e a concentração de CO<sub>2</sub> a 5%. Com o uso dos fluoróforos Anexina V-FITC e PI foi possível observar o efeito de rLO (1 mU/mL) em Jurkat por um período de 18 horas, sendo que a incorporação dos fluoróforos foi medida a cada 3 minutos. O vídeo produzido permite observar o momento em que as células sinalizam apoptose e passam a morrer. A figura 17 mostra as fotos tiradas nos tempos de 0, 2, 8, 12 e 18 horas. Os recortes foram feitos nesses tempos para mostrar o aumento da intensidade e fluorescência em diferentes etapas, que se inicia no tempo de 8h tanto no verde quanto no vermelho. A marcação para apoptose continua aumentando até o tempo

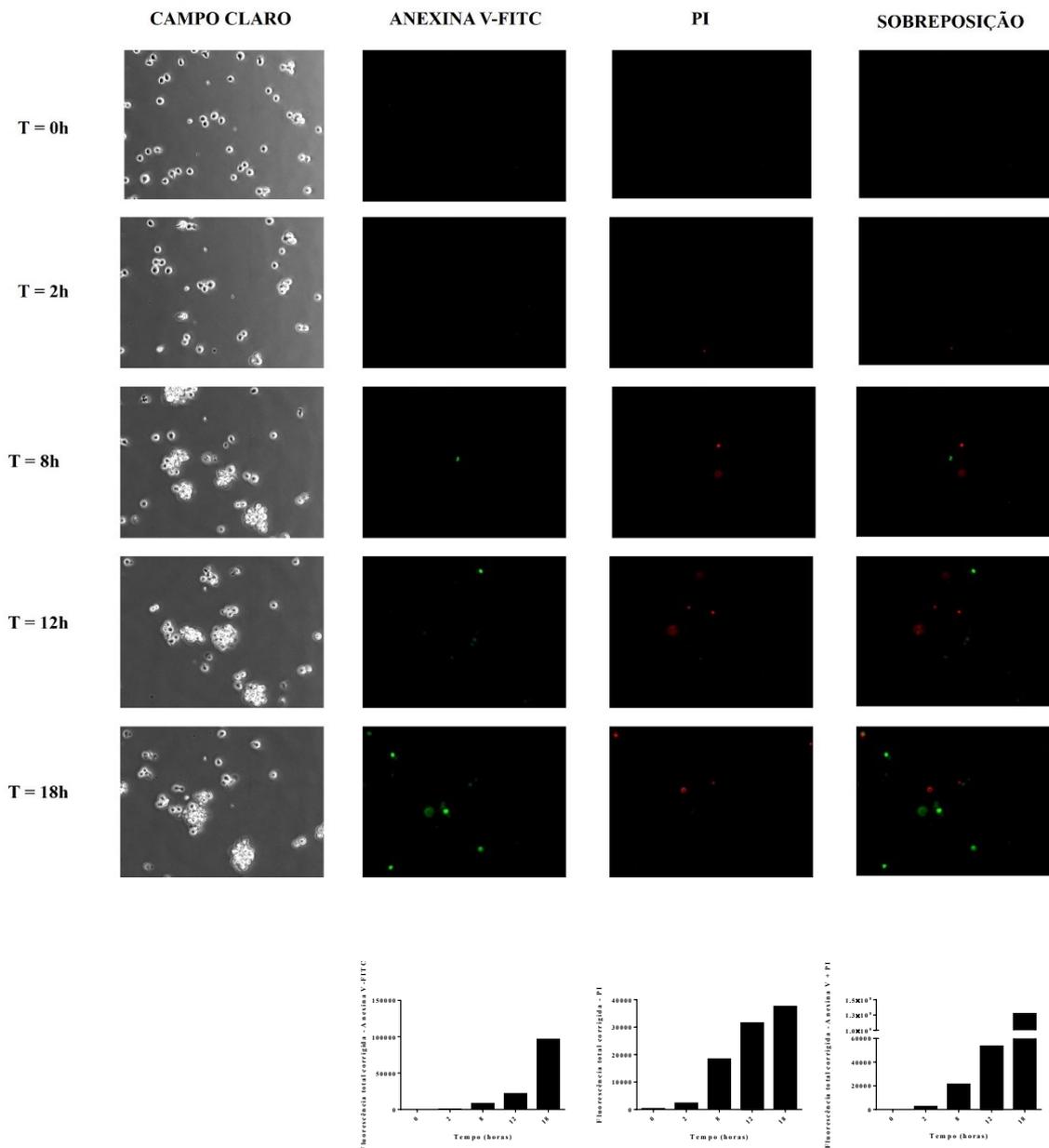
de 18 horas, quando as células transacionam mais pronunciadamente para a cor vermelha, indicando que estão de fato mortas. Logo abaixo encontram-se os gráficos da quantificação da fluorescência total corrigida (FTC) para os 3 campos fluorescentes.



**Figura 17. Microscopia time-lapse de células Jurkat tratadas com rLO.** As fotografias eram tiradas a cada 3 minutos por um período de 22 horas. Na figura as fotos correspondem aos frames 1, 40, 160, 340 e 360 que correspondem aos tempos de 0, 2, 8, 12 e 18 horas depois do estímulo com rLO 1 mU/mL. Na primeira coluna as fotos do campo claro, na segunda coluna as células marcadas com Anexina V-FITC, na terceira coluna as células marcadas com PI e na quarta coluna a sobreposição dos campos fluorescentes.

A figura 18 diz respeito ao controle negativo, no qual foi observado os mesmos parâmetros em células Jurkat não tratadas, apenas em meio de cultura. Eventos isolados de apoptose e necrose foram observados até o tempo de 18 horas, quando a intensidade

de marcação começa a aumentar, provavelmente devido à falta de nutrientes do meio de cultura que é limitado, ou mesmo as condições do equipamento que não são ideais para cultura de células. Logo abaixo encontram-se os gráficos da quantificação da fluorescência total corrigida (FTC) para os 3 campos fluorescentes.



**Figura 18. Microscopia time-lapse de células Jurkat sem tratamento (controle).** As fotografias eram tiradas a cada 3 minutos por um período de 22 horas. Na figura as fotos correspondem aos frames 1, 40, 160, 340 e 360 que correspondem aos tempos de 0, 2, 8, 12 e 18 horas. Na primeira coluna as fotos do campo claro, na segunda coluna as células marcadas com Anexina V-FITC, na terceira coluna as células marcadas com PI e na quarta coluna a sobreposição dos campos fluorescentes.

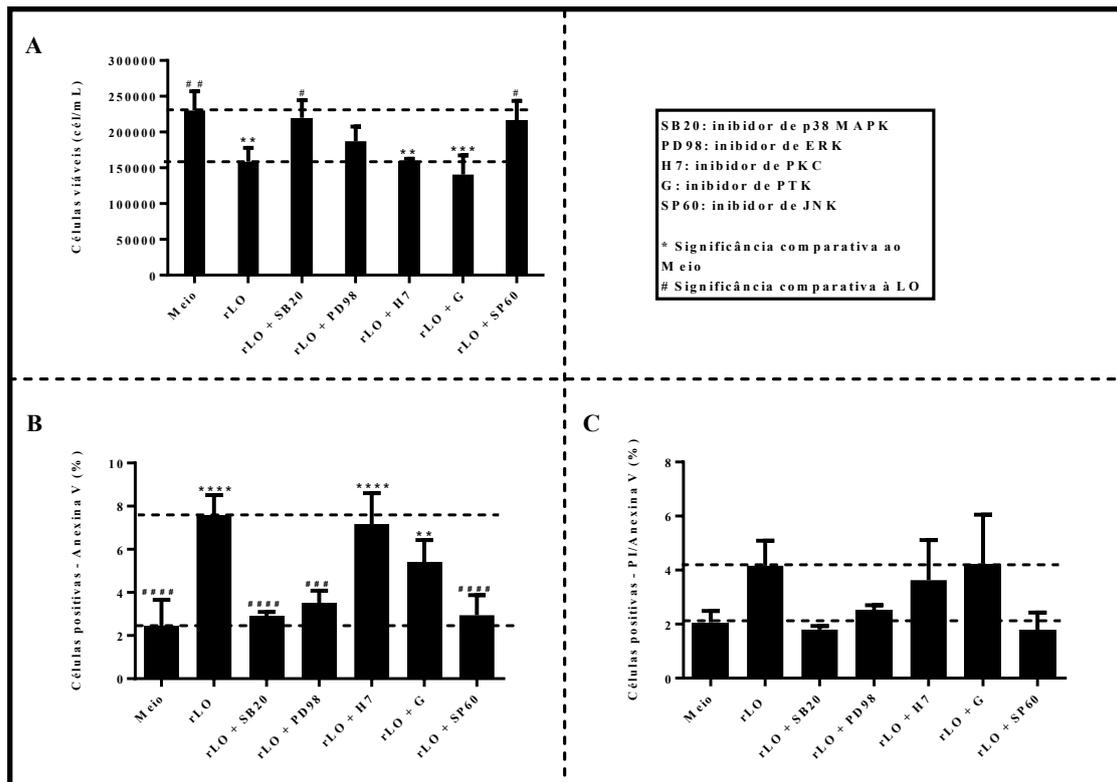
### 5.11. Avaliação das vias de sinalização ativadas por rLO

A fim de avaliar possíveis mecanismos de ação de LO na morte de células Jurkat, foram utilizados inibidores de moléculas-chave em diferentes vias de sinalização. Para isso, as células Jurkat foram pré-incubadas com os inibidores SB20, PD48, H7, genisteína e SP60. Após um período de 3 horas de incubação, as células foram tratadas com rLO 1 mU/mL. O efeito na viabilidade e apoptose foi avaliado depois de 18 horas por citometria de fluxo. Os diferentes tratamentos foram comparados tanto com o controle negativo (meio) quanto com células estimuladas apenas com rLO (sem inibidores). Caso o efeito de rLO tenha sido minimizado ou mesmo inexistente na presença do inibidor, é um indicativo de que aquela via é importante para a atuação da droga.

A figura 19A mostra o efeito dos diferentes tratamentos testados na viabilidade de Jurkat. Pode-se observar que as condições: rLO, rLO+H7 e rLO+G, apresentaram redução na viabilidade comparada ao meio. Isso indica que as vias de sinalização de PKC e PTK provavelmente não são ativadas por rLO, uma vez que a inibição das mesmas não foi suficiente para bloquear o efeito da enzima. Já as vias ativadas por p38 MAPK e JNK, as quais foram inibidas por SB20 e SP60, respectivamente, apresentaram comportamento oposto. Ou seja, a inibição dessas moléculas bloqueou o efeito de rLO, de modo que não houve diferença significativa dessas condições com as células sem tratamento.

O mesmo comportamento pode ser observado no gráfico B, que mostra a porcentagem de células marcadas com Anexina V. Os inibidores H7 e G não inibem o efeito de rLO. Já SB20 e SP60 bloqueiam seu efeito, apresentando um comportamento mais parecido com o do controle negativo. Além disso, nesse gráfico, é possível inferir que a via de JNK, inibida por PD48, também pode ser ativada por rLO, pois apresentou diferença significativa quando comparada à rLO.

O gráfico C mostra as porcentagens da população de células duplamente marcadas com Anexina V e PI. O que se observa é uma tendência em manter o comportamento observado nos gráficos anteriores, embora não tenha se observado diferença significativa em nenhuma das condições testadas. Isso se deve, provavelmente, ao alto desvio padrão observado nas amostras. Outra explicação seria que na concentração testada e/ou no tempo de 18 horas, as células ainda não estejam de fato mortas, ou seja, o conteúdo citoplasmático ainda esteja intacto.



**Figura 19. Efeito de rLO em células Jurkat pré-incubadas com inibidores de diferentes vias de sinalização.** Gráfico A: concentração de células viáveis. Gráfico B: Porcentagem de células marcadas com Annexina V. Gráfico C: Porcentagem de células duplamente marcadas com Annexina V e PI. Controle negativo (meio): células sem tratamento.

*Discussão*

---

## 6. DISCUSSÃO

A L-lisina  $\alpha$ -oxidase de *Trichoderma harzianum* é uma flavoproteína pertencente à família das L-aminoácido oxidases, enzimas estudadas em diferentes contextos na medicina devido a sua toxicidade contra patógenos e células tumorais. A LO foi produzida de forma heteróloga através da tecnologia do DNA recombinante em nosso laboratório, a qual rendeu um registro de patente. A enzima foi produzida na forma ativa, na fração solúvel, com alto rendimento e baixos custos, tendo em vista o processo de purificação simplificado. Isso se mostra evidente principalmente ao comparar com a produção de LO recombinante de *Scomber japonicus* a qual foi produzida em *Pichia pastoris*. Nesse estudo, foram necessárias três etapas de cromatografia para obter a proteína, o que gerou um rendimento de 4,5% na produção de rLO, valor abaixo do apresentado por nós que foi de 37,4% (TANI et al., 2015).

Nossos dados mostram que rLO apresenta alta atividade enzimática logo após a purificação que, lamentavelmente, se perde rapidamente em questão de dias. A desnaturação proteica pode ser causada pelo desdobramento errôneo da estrutura terciária da enzima em um polipeptídeo desordenado no qual os resíduos envolvidos no reconhecimento do substrato ficam desalinhados, comprometendo a funcionalidade da proteína. Uma vez que a influência desnaturante seja removida, esse comprometimento pode ser revertido. Nossos esforços foram ineficientes na identificação da causa dessa perda, logo, nos concentramos em técnicas de recuperação da atividade (GIANFREDA; SCARFI, 1991; SILVA et al., 2018).

Existem diversas técnicas de reenovelamento proteico, dentre os quais o processo de dimerização de monômeros em proteínas que sejam naturalmente diméricas. Essa técnica envolve a oxidação dos resíduos de cisteína, favorecendo a formação de pontes dissulfeto entre as unidades. Nesse trabalho, foi utilizado o reagente ferrocianeto de potássio como agente oxidante (ANDREU et al., 1994). Nossos resultados mostram aumento significativo da atividade enzimática de rLO submetida a esse procedimento, especialmente a enzima fusionada à GST.

Além disso, foi necessário avaliar as melhores condições de estocagem e definir a formulação de rLO. Nós testamos a atividade enzimática de rLO submetidas a ação de

diferentes agentes estabilizantes, como açúcares e polímeros e também a enzima liofilizada.

A obtenção de enzimas estáveis e ativas geralmente é um trabalho desafiador, porque elas não evoluíram naturalmente para serem usadas fora do ambiente fisiológico. Entretanto, sua integridade pode ser mantida na presença de altas concentrações de excipientes cuja influência auxiliem as forças de interação como ligações de hidrogênio, forças de solvatação, eletrostática, forças de Van der Waals, entre outras. A adição de polióis e açúcares a soluções aquosas de proteínas promove o fortalecimento das interações hidrofóbicas entre resíduos de aminoácidos não polares, levando à das proteínas e melhorando a termoestabilidade (SILVA et al., 2018).

Algumas teorias afirmam que os açúcares tem esse efeito protetor pois substitui as moléculas de água que são removidas das conchas de hidratação das proteínas. Isso acontece porque a interação água-açúcar é mais forte que a interação água-proteína. Desse modo, a água é direcionada para a região mais externa da proteína formando um escudo protetor para essas moléculas (BALCÃO; VILA, 2015). De fato, a adição de açúcares foi a estratégia de estabilização mais bem-sucedida nesse trabalho, uma vez que houve retenção da atividade enzimática na presença de manitol e glicerol. O uso dos polímeros de PEG não foi tão efetivo, visto que houve perda significativa de atividade com o tempo. Além disso, nossa tentativa de liofilização foi frustrada em parte porque o passo anterior de diálise causa uma queda brusca na atividade de rLO. Essa etapa é importante para remover o sal da amostra que precipitaria junto com a proteína durante a liofilização, porém provavelmente promove a perda do cofator enzimático FAD. Porém, tendo em vista o sucesso desse procedimento em formulações enzimáticas de uso médico, que pretendemos reavaliar outras formas de testar esse método, inclusive utilizando o glicerol como estabilizante.

Ainda discutindo sobre a estabilidade de rLO, é importante analisar a influência de GST sobre rLO. Uma vez que remoção da cauda de GST leva uma queda brusca na atividade enzimática, avaliamos qual seria o efeito de rLO fusionado ou não nas células Jurkat. Como esperado, a remoção da cauda de GST reduziu significativamente o efeito de rLO sob às células, de modo que prosseguimos no trabalho utilizando a versão fusionada da enzima.

Acreditamos que a presença da *tag* de GST é essencial para a estabilidade de rLO da mesma forma que foi importante para o sucesso obtido na expressão de rLO. O sistema

glutathiona-S-transferase, o qual pertence o vetor pGEX, foi descrito primeiramente por Smith e Johnson em 1988, inclui uma série de vetores de expressão nos quais o cDNA é expresso e facilmente purificado usando condições não-desnaturantes. A principal vantagem do sistema GST é que a maioria das proteínas fusionadas permanece solúvel, sendo que a GST funcionaria como âncora, ou seja, um veículo facilitador, estabilizando a estrutura dos peptídeos a ela ligados. Devido a essa característica que esse sistema de expressão é muito usado, por exemplo, na obtenção de cristais para estudos estruturais de proteínas (KURSULA; HEAPE; KURSULA, 2005).

Além disso, como as condições desnaturantes não são necessárias em nenhum passo da purificação, as proteínas expressas têm maior chance de manter sua estrutura e função, e, na maioria das vezes a presença de GST não influencia na atividade e antigenicidade da proteína de interesse (ROSENBERG, 2005; BUTOROV, 2015). Um exemplo disso é o trabalho de Belviso e colaboradores (2017) expressaram uma asparaginase fusionada a GST e testaram a toxicidade da enzima em células leucêmicas das linhagens K562, NALM-6 e MOLT-4. Eles verificaram que a enzima fusionada apresentou alta toxicidade, enquanto que o controle, representado por GST sozinho, não teve efeito sobre as células (BELVISO et al., 2017). Resultado similar ao obtido nesse trabalho, quando testamos o efeito de LO-GST e GST nas células Jurkat. Nossos resultados mostraram que GST não teve efeito significativo na viabilidade das células, nem na promoção de eventos apoptóticos, de modo que a toxicidade de rLO pode ser atribuída a ação da enzima Lisina oxidase.

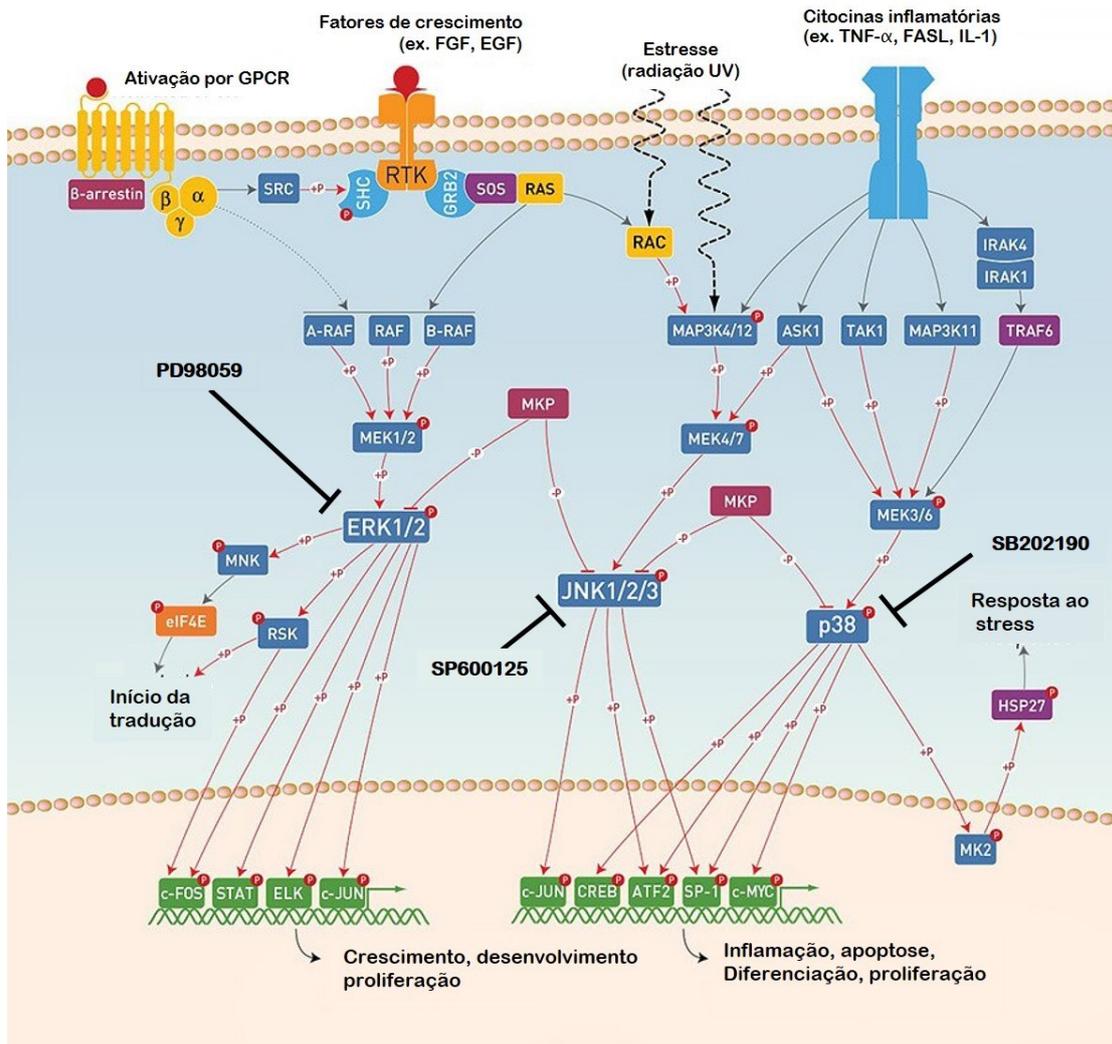
No que diz respeito a toxicidade de rLO, nesse trabalho avaliamos o efeito promovido por rLO em células de leucemia linfóide da linhagem Jurkat. Inicialmente, utilizamos o ensaio do MTT, de atividade mitocondrial para avaliar a toxicidade de rLO. Porém, depois de vários testes não obtivemos reprodutibilidade. Partimos então para uma análise mais rebuscada, por citometria de fluxo, que permitiu verificar a viabilidade das células tratadas com rLO e também a ocorrência de eventos de apoptose, necrose e apoptose tardia.

Nós observamos um comportamento dose-reposta de rLO em células Jurkat, uma vez que quanto maior a dose, menor a viabilidade das células depois de 24 horas de tratamento. rLO foi tóxica em todas as concentrações testadas (1 a 10 mU/mL), sendo que a análise por citometria de fluxo indicou aumento na porcentagem de células em apoptose tardia no tratamento de 24 horas. Quando avaliamos a toxicidade relativa ao

tempo, observamos a presença de eventos apoptóticos já no tempo de 10h, indicando que depois de 24 horas as células sob efeito de rLO, já tinham avançado para o um quadro de rompimento da membrana celular, indicado pelo aumento de eventos de apoptose tardia nesse tempo. Tais eventos foram, inclusive, mais significativos, do que os observados nas células tratadas com o ATO. A análise de microscopia mostrou que a marcação para apoptose se inicia com 2 horas de tratamento, ficando bem evidente com 8 horas. Esse experimento permitiu observar a transição das células de apoptose para apoptose tardia, que é quando as células perdem a viabilidade, caracterizada pelo aumento da fluorescência para a coloração vermelha. Esses dados nos permitem afirmar que as células Jurkat estimuladas com rLO morrem em decorrência de apoptose.

Nesse estudo, avaliamos também as vias de sinalização envolvidas na indução de morte em células Jurkat tratadas com rLO. As vias testadas foram as das MAPK: JNK, ERK, p38, PKC e PKC. Através desse experimento constatamos que as vias JNK, ERK e p38 estão envolvidas na morte celular promovida por rLO, uma vez que os inibidores dessas vias foram capazes de prevenir a morte das células tratadas.

Todas essas moléculas são MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos), uma família de quinases serina/treonina e tirosina que regulam diversas atividades celulares relacionadas ao desenvolvimento do câncer, incluindo proliferação, diferenciação, apoptose, autofagia e inflamação (KIM; CHOI, 2015). Em particular, JNK (quinase c-Jun N-terminal), ERK (quinase regulada por sinal extracelular) e p38 são os principais subgrupos envolvidos na carcinogênese. A via ERK é ativada principalmente por fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico, enquanto que a sinalização JNK e p38 são ativadas por vários estímulos de estresse, incluindo radiação ultravioleta, espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina (IL-1 $\beta$ ) (Figura 20) (PELUSO et al., 2019).



**Figura 20. Via das MAPK envolvidas no mecanismo de ação de rLO.** As vias ERK1/2, JNK e p38 estão envolvidas na indução de morte celular promovida por rLO. Na figura a indicação das moléculas sinalizadoras e dos inibidores utilizados nesse trabalho. Fonte: Adaptado de termofisher.com (20/01/2020).

Embora existam diversos estudos mostrando o papel das LAAOs na indução apoptose, necrose e autofagia (ANDE et al., 2006), pouco se sabe sobre as vias de sinalização e mecanismo de ação dessas enzimas. Um dos poucos trabalhos nesse campo, é o de Pontes e colaboradores (2016) que descreve a ativação da via p38 MAPK e PI3K na indução de morte em neutrófilos pela LAAO de *Calloselasma rhodosthoma*. Além disso, eles viram que Cr-LAAO induziu fagocitose e foi capaz de estimular os neutrófilos a liberar mediadores pró-inflamatórios como IL-8 e TNF- $\alpha$ , bem como de NETs, mostrando que o Cr-LAAO desencadeia eventos pró-inflamatórios relevantes nessas células (PONTES et al., 2014).

Talvez o exemplo mais próximo de rLO seja a L-asparaginase, que, embora não seja uma L-aminoácido oxidase, tem função similar na depleção de aminoácidos. Essa enzima é usada a mais de 40 anos no tratamento de LLA, logo seu mecanismo de ação já está bem caracterizado. Dados da literatura informam que as vias de sinalização de ERK e Akt/mTOR são as principais vias envolvidas na apoptose e autofagia induzida por asparaginase (SONG et al., 2015). De fato, a privação de aminoácidos desencadeia uma resposta apoptótica e autofágica nas células que a experimentam. Inicialmente, o estado de *starvation* promove um aumento na expressão de transportadores de membrana, hormônios de crescimento e enzimas metabólicas com o objetivo de aumentar a captação e a síntese de aminoácidos. Posteriormente, é ativado um mecanismo de produção de aminoácidos através da reciclagem de proteínas e organelas por autofagia. Por fim, quando esses mecanismo falham, as células passam a inibir a síntese de proteínas, reduzir a taxa de crescimento e por fim submetem-se a morte celular por apoptose (CHEN et al., 2014; ONODERA; OHSUMI, 2005).

Além do que está apresentado nessa tese, a rLO produzida no nosso laboratório apresentou capacidade antiproliferativa contra células Jurkat e K562. Nossos dados mostraram que doses superiores a 0,5 mU/mL promoveram redução significativa no crescimento das células tratadas (Patente nº BR 10 2016 020994-3). Esses resultados corroboram com um estudo desenvolvido por Zhukova e colaboradores (1985), que analisaram de forma mais detalhada o efeito de LO no ciclo proliferativo de células de linfoma de Burkitt. Nesse trabalho, os pesquisadores mostraram que a enzima na concentração de 1 mU/mL impediu a transição das células da fase S para a fase G2/M, que é quando ocorre a duplicação do DNA no núcleo celular. Com isso, sugere-se que LO também é capaz de inibir o crescimento das células tumorais através da ativação de mecanismos de atuação no ciclo celular (ZHUKOVA et al., 1985).

Experimentos em células leucêmicas L5178Y mostraram também que, além da clivagem da L-lisina, o crescimento celular também foi inibido pela presença do peróxido de hidrogênio formado durante a reação enzimática (KUSAKABE, 1980). No entanto, há dados que indicam que mesmo na presença de catalase, a qual decompõe o peróxido de hidrogênio, LO suprime o crescimento de células do tipo MM1, o que sugere que a diminuição na concentração de L-lisina do meio é a principal razão para o efeito anti-invasivo de LO *in vitro* (KHADUEV et al., 1991).

Estudos *in vivo* comparam a citotoxicidade de LO em relação a L-asparaginase. Além de apresentar efeito antimetástico, LO exibe efeito antileucêmico em doses menores que as empregadas no tratamento com L-asparaginase (KHADUEV et al., 1989). Edakova e colaboradores (2000) avaliaram a capacidade de LO em inibir o crescimento de tumores sólidos e ascíticos de diferentes linhagens em camundongos e ratos. Eles observaram que LO teve comportamento superior a L-asparaginase frente a diferentes tumores. Os melhores resultados foram obtidos usando LO em camundongos que tinham hepatoma ascítico; o tratamento com LO promoveu além do aumento de sobrevivência dos animais, em alguns casos levou o animal a completa remissão (EDAKOVA; IRSOVA, 2000).

Tendo em vista tudo que foi apresentado, nossas perspectivas para continuação desse trabalho incluem a produção de rLO em biorreator, simulando condições mais próximas da escala industrial. A modificação da molécula para formulações como a peguilação, uma técnica que se mostrou eficaz para a L-asparaginase, por aumentar a estabilidade da enzima, reduzir a imunogenicidade e aumentar o tempo de vida na circulação dos pacientes tratados. Pretendemos também caracterizar o mecanismo de ação de rLO quanto a autofagia e produção de ROS e, por fim, testar a toxicidade de rLO em camundongos para avaliar o comportamento da enzima *in vivo*.

*Conclusões*

---

## 7. CONCLUSÕES

- A enzima rLO é altamente instável visto que foi produzida com alta atividade enzimática que se perde bruscamente com o tempo de estocagem;
- A reação de oxidação com ferrocianeto de potássio promove aumento da atividade enzimática de rLO, provavelmente por promover a dimerização das unidades de rLO;
- A manutenção de rLO em solução de glicerol 50% aumenta a estabilidade da enzima em mais 200%;
- A *tag* de GST é importante para a estabilidade de rLO, porém a proteína GST sozinha não é tóxica para as células Jurkat;
- rLO reduz a viabilidade de células Jurkat de forma dose-dependente, apresentando toxicidade em doses maiores que 1 mU/mL;
- rLO induz apoptose em células Jurkat, sendo que esses eventos são observáveis depois de 8 horas de tratamento com LO;
- As vias de sinalização de ERK, JNK e p38 estão envolvidas na indução de morte em células Jurkat estimuladas com rLO.

## *Referências bibliográficas*

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDE, S. R.; KOMMOJU, P. R.; DRAXL, S.; MURKOVIC, M.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; FERRANDO-MAY, E. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, 2006.
- ANDREU, D.; ALBERICIO, F.; SOLÉ, N. A.; MUNSON, M. C.; FERRER, M.; BARANY, G. **Formation of disulfide bonds in synthetic peptides and proteins. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, 1994. .
- BALCÃO, V. M.; VILA, M. M. D. C. **Structural and functional stabilization of protein entities: State-of-the-art** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015. .
- BELVISO, S.; IULIANO, R.; AMATO, R.; PERROTTI, N.; MENNITI, M. The human asparaginase enzyme (ASPG) inhibits growth in leukemic cells. **PLoS ONE**, 2017.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249–260, 2004.
- BÖHMER, A.; MÜLLER, A.; PASSARGE, M.; LIEBS, P.; HONECK, H.; MÜLLER, H. G. A novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces endus*. Purification and properties. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 182, n. 2, p. 327–332, 1989.
- BUTOROV, E. V. Ia. Influence of L-lysine amino acid on the HIV-1 RNA replication in vitro. **Antiviral chemistry & chemotherapy**, v. 24, n. 1, p. 39–46, 2015.
- CHAUHAN, N.; NARANG, J.; SUNNY; PUNDIR, C. S. Immobilization of lysine oxidase on a gold-platinum nanoparticles modified Au electrode for detection of lysine. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 4–5, p. 265–271, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.01.006>>.
- CHEN, R.; ZOU, Y.; MAO, D.; SUN, D.; GAO, G.; SHI, J.; LIU, X.; ZHU, C.; YANG, M.; YE, W.; HAO, Q.; LI, R.; YU, L. The general amino acid control pathway regulates mTOR and autophagy during serum/glutamine starvation. **Journal of Cell Biology**, 2014.
- CHET, I.; HARMAN, G. E.; BAKER, R. *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. **Microbial Ecology**, 1981.
- CHET, I.; INBAR, J.; HADAR, I. Fungal antagonists and mycoparasites. In: **The Mycota IV**. [s.l: s.n.]
- CISCOTTO, P.; MACHADO DE AVILA, R. A.; COELHO, E. A. F.; OLIVEIRA, J.; DINIZ, C. G.; FARIAS, L. M.; DE CARVALHO, M. A. R.; MARIA, W. S.; SANCHEZ, E. F.; BORGES, A.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 3, p. 330–341, 2009.
- COSTA TORRES, A. F.; DANTAS, R. T.; TOYAMA, M. H.; FILHO, E. D.; ZARA, F. J.; RODRIGUES DE QUEIROZ, M. G.; PINTO NOGUEIRA, N. A.; ROSA DE OLIVEIRA, M.; DE OLIVEIRA TOYAMA, D.; MONTEIRO, H. S. A.; MARTINS, A. M. C. 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.

- DRUZHININA, I. S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P. K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I. V.; KUBICEK, C. P. **Trichoderma: The genomics of opportunistic success***Nature Reviews Microbiology*, 2011. .
- DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. **Snake venom L-amino acid oxidases***Toxicon*, 2002. .
- EDAKOVA, L. U. a S.; IRSOVA, G. A. a F. Anticancer Enzyme L-Lysine  $\alpha$ -Oxidase. v. 88, 2000.
- FERNANDES, H. S.; SILVA TEIXEIRA, C. S.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J.; CERQUEIRA, N. M. F. S. A. **Amino acid deprivation using enzymes as a targeted therapy for cancer and viral infections***Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2017. .
- FUNG, M. K. L.; CHAN, G. C. F. **Drug-induced amino acid deprivation as strategy for cancer therapy***Journal of Hematology and Oncology*, 2017. .
- GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods*, 1986.
- GIANFREDA, L.; SCARFI, M. R. Enzyme stabilization: state of the art. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1991.
- GÓMEZ, D.; LUCAS-ELÍO, P.; SANCHEZ-AMAT, A.; SOLANO, F. A novel type of lysine oxidase: l-lysine- $\epsilon$ -oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, v. 1764, n. 10, p. 1577–1585, 2006.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>>.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation***Cell*, 2011b. .
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. Trichoderma species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 1, p. 43–56, 2004.
- HOSSAIN, G. S.; LI, J.; SHIN, H. D.; DU, G.; LIU, L.; CHEN, J. L-Amino acid oxidases from microbial sources: Types, properties, functions, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, n. 4, p. 1507–1515, 2014.
- HSU, P. P.; SABATINI, D. M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 2008.
- HUANG, T.; WARSINKE, A.; KUWANA, T.; SCHELLER, F. W. Determination of L-Phenylalanine Based on an NADH-Detecting Biosensor. *Analytical Chemistry*, 1998.
- IZIDORO, L. F. M.; SOBRINHO, J. C.; MENDES, M. M.; COSTA, T. R.; GRABNER, A. N.; RODRIGUES, V. M.; DA SILVA, S. L.; ZANCHI, F. B.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. F. C.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. **Snake venom L-amino acid oxidases: Trends in pharmacology and biochemistry***BioMed Research International*, 2014. .
- KAWEDIA, J. D.; RYTTING, M. E. Asparaginase in acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, v. 14, n. September, p. S14–S17, 2014.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clml.2014.06.017>>.

KESIK-BRODACKA, M. **Progress in biopharmaceutical development***Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2018. .

KHADUEV KH., S.; UMANSKY YU., V.; VESA, V. S.; SHINKAI, K.; AKEDO, H.; BEREZOV, T. T. Lysine oxidase from *Trichoderma* sp.: Anti-invasive effect in vitro and anti-metastatic action in vivo. **Byulleten Eksperimentalnoi Biologii i Meditsiny**, 1991.

KHADUEV, S. K.; GLAZKOVA, T. I.; VESA, V. S.; LAUGALENE, N. F.; PUODZHIUTE, S. P.; DENIS, G. I.; IURCHENKO, N. I.; BEREZOV, T. T. Evaluation of antileukemic activity of L-lysine- $\alpha$  oxidase from *Trichoderma* sp. in chemotherapeutic experiments. **Biulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny**, v. 108, n. 10, p. 476–477, 1989.

KHADUEV, S. K.; UMANSKII, V. Y.; VESA, V. S.; SHINKAI, K.; AKEDO, H.; BEREZOV, T. T. Anti-invasive and antimetastatic action of lysine oxidase from *Trichoderma* sp. in vitro and in vivo. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 112, n. 4, p. 1489–1493, 1991.

KIM, E. K.; CHOI, E. J. **Compromised MAPK signaling in human diseases: an update***Archives of Toxicology*, 2015. .

KOCHER, R. A. Effects of a Low Lysine Diet on the Growth of Spontaneous Mammary Tumors in Mice and on the N2 Balance in Man. **Cancer Research**, v. 4, n. 4, p. 251–256, 1944.

KOYAMA, H. Purification and characterization of a novel L-phenylalanine oxidase (Deaminating and decarboxylating) from *Pseudomonas* sp. P-501. **Journal of biochemistry**, v. 92, n. 4, p. 1235–1240, 1982.

KUBICEK, C. P.; MACH, R. L.; PETERBAUER, C. K.; LORITO, M. *Trichoderma*: From genes to biocontrol. **Journal of Plant Pathology**, 2001.

KURSULA, I.; HEAPE, A.; KURSULA, P. Crystal Structure of Non-Fused Glutathione S-Transferase from *Schistosoma japonicum* in Complex with Glutathione. **Protein & Peptide Letters**, 2005.

KUSAKABE, H.; KODAMA, K.; KUNINAKA, A.; YOSHINO, H.; SODA, K. Effect of L-lysine  $\alpha$ -oxidase on growth of mouse leukemic cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 387–392, 1980.

LEE, M. L.; TAN, N. H.; FUNG, S. Y.; SEKARAN, S. D. Antibacterial action of a heat-stable form of l-amino acid oxidase isolated from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 237–242, 2011.

LUKASHEVA, E. V.; BEREZOV, T. T. L-Lysine  $\alpha$ -oxidase: physicochemical and biological properties. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 67, n. 10, p. 1152–1158, 2002.

MARTINET, W.; DE MEYER, G. R. Y.; HERMAN, A. G.; KOCKX, M. M. Amino acid deprivation induces both apoptosis and autophagy in murine C2C12 muscle cells. **Biotechnology Letters**, 2005.

MUTAGUCHI, Y.; OHMORI, T.; SAKURABA, H.; YONEDA, K.; DOI, K.;

- OHSHIMA, T. Visible wavelength spectrophotometric assays of l-aspartate and d-aspartate using hyperthermophilic enzyme systems. **Analytical Biochemistry**, 2011.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger** **Princípios de bioquímica de Lehninger**, 2011. .
- ONODERA, J.; OHSUMI, Y. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. **Journal of Biological Chemistry**, 2005.
- PELUSO, I.; YARLA, N. S.; AMBRA, R.; PASTORE, G.; PERRY, G. **MAPK signalling pathway in cancers: Olive products as cancer preventive and therapeutic agents** **Seminars in Cancer Biology**, 2019. .
- POKROVSKY, V. S.; TRESHALINA, H. M.; LUKASHEVA, E. V; SEDAKOVA, L. A.; MEDENTZEV, A. G.; ARINBASAROVA, A. Y.; BEREZOV, T. T. Enzymatic properties and anticancer activity of L-lysine  $\alpha$ -oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKMf-4268D. **Anti-cancer drugs**, v. 24, n. 8, p. 846–51, 2013.
- POLLEGIONI, L.; MOTTA, P.; MOLLA, G. L-Amino acid oxidase as biocatalyst: A dream too far? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 21, p. 9323–9341, 2013.
- PONTES, A. S.; SETÚBAL, S. D. S.; NERY, N. M.; DA SILVA, F. S.; DA SILVA, S. D.; FERNANDES, C. F. C.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M.; ZULIANI, J. P. P38 MAPK is involved in human neutrophil chemotaxis induced by L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodosthoma*. **Toxicon**, 2016.
- RIFAI, M. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, 1969.
- ROSENBERG, I. M. **Protein analysis and purification: Benchtop techniques: Second edition**. [s.l: s.n.]
- SADASIVAN, S.; WAGHRAY, A.; LARNER, S. F.; DUNN, W. A.; HAYES, R. L.; WANG, K. K. W. Amino acid starvation induced autophagic cell death in PC-12 cells: Evidence for activation of caspase-3 but not calpain-1. **Apoptosis**, 2006.
- SAKURAI, Y.; TAKATSUKA, H.; YOSHIOKA, A.; MATSUI, T.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; FUJIMURA, Y. Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. **Toxicon**, v. 39, n. 12, p. 1827–1833, 2001.
- SALERNO, M. S.; MATSUMOTO, C.; FERAZ, I. **BIOFÁRMACOS NO BRASIL: CARACTERÍSTICAS, IMPORTÂNCIA E DELINEAMENTO DE POLÍTICAS PÚBLICAS PARA SEU DESENVOLVIMENTO**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ipea.gov.br/portal/publicacoes>>.
- SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. **Mycological Research**, 1996.
- SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I.; FRISE, E.; KAYNIG, V.; LONGAIR, M.; PIETZSCH, T.; PREIBISCH, S.; RUEDEN, C.; SAALFELD, S.; SCHMID, B.; TINEVEZ, J. Y.; WHITE, D. J.; HARTENSTEIN, V.; ELICEIRI, K.; TOMANCAK, P.; CARDONA, A. **Fiji: An open-source platform for biological-image analysis** **Nature Methods**, 2012. .

SILVA, C.; MARTINS, M.; JING, S.; FU, J.; CAVACO-PAULO, A. **Practical insights on enzyme stabilization***Critical Reviews in Biotechnology*, 2018. .

SONG, P.; YE, L.; FAN, J.; LI, Y.; ZENG, X.; WANG, Z.; WANG, S.; ZHANG, G.; YANG, P.; CAO, Z.; JU, D. Asparaginase induces apoptosis and cytoprotective autophagy in chronic myeloid leukemia cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 6, p. 3861–3873, 2015.

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

SUN, L. K.; YOSHII, Y.; HYODO, A.; TSURUSHIMA, H.; SAITO, A.; HARAKUNI, T.; LI, Y. P.; KARIYA, K.; NOZAKI, M.; MORINE, N. Apoptotic effect in the glioma cells induced by specific protein extracted from Okinawa Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom in relation to oxidative stress. **Toxicology in Vitro**, v. 17, n. 2, p. 169–177, 2003.

TANI, Y.; OMATSU, K.; SAITO, S.; MIYAKE, R.; KAWABATA, H.; UEDA, M.; MIHARA, H. Heterologous expression of l-lysine  $\alpha$ -oxidase from *Scomber japonicus* in *Pichia pastoris* and functional characterization of the recombinant enzyme. **Journal of Biochemistry**, v. 157, n. 4, p. 201–210, 2015.

TEMPONE, A. G.; ANDRADE, H. F.; SPENCER, P. J.; LOURENÇO, C. O.; ROGERO, J. R.; NASCIMENTO, N. Bothrops moojeni venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 280, n. 3, p. 620–624, 2001.

TSENG, S. C.; LIU, S. Y.; YANG, H. H.; LO, C. T.; PENG, K. C. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in response to *Rhizoctonia solani*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 6914–6922, 2008.

TURCHI, L. M.; MORAIS, J. M. de. **POLÍTICAS DE APOIO À INOVAÇÃO TECNOLÓGICA NO BRASIL: avanços recentes, limitações e propostas de ações.** [s.l: s.n.]

VAN ENGELAND, M.; NIELAND, L. J. W.; RAMAEKERS, F. C. S.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. **Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure***Cytometry*, 1998. .

VANDER HEIDEN, M. G. **Targeting cancer metabolism: A therapeutic window opens***Nature Reviews Drug Discovery*, 2011. .

VÁRADI, M.; ADÁNYI, N.; SZABÓ, E. E.; TRUMMER, N. Determination of the ratio of D- and L-amino acids in brewing by an immobilised amino acid oxidase enzyme reactor coupled to amperometric detection. **Biosensors and Bioelectronics**, 1999.

WANG, Y.; NING, Y.; ALAM, G. N.; JANKOWSKI, B. M.; DONG, Z.; NÖR, J. E.; POLVERINI, P. J. Amino acid deprivation promotes tumor angiogenesis through the GCN2/ATF4 pathway. **Neoplasia (United States)**, 2013.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, 1956.

WILLIAMS, G. Hexone Bases of Malignant Tumors. 1915.

YANG, C. A.; CHENG, C. H.; LO, C. T.; LIU, S. Y.; LEE, J. W.; PENG, K. C. A novel L-amino acid oxidase from *Trichoderma harzianum* ETS 323 associated with antagonism of *Rhizoctonia solani*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4519–4526, 2011.

YU, Z.; QIAO, H. **Advances in non-snake venom L-amino acid oxidase** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012. .

ZELLER, E. A.; MARITZ, A. Über eine neue l-Aminosäure-oxydase. (1. Mitteilung). **Helvetica Chimica Acta**, v. 27, n. 1, p. 1888–1902, 1944.

ZHUKOVA, O. S.; KHADUEV, S. K.; DOBRYNIN, I. V; SMIRNOVA, M. P.; LUKASHEVA, E. V. Effect of L-lysine-alpha-oxidase on the cell cycle kinetics of cultured Burkitt's lymphoma cells. **Eksperimental'naia onkologiya**, v. 7, n. 6, p. 42–44, 1985.