

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA – UNIR
NÚCLEO DE SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

ADRIANA SILVA PONTES

EFEITO DA L-AMINOÁCIDO OXIDASE ISOLADA DO VENENO DA SERPENTE
Calloselasma rhodostoma NA FUNÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Porto Velho - RO

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA – UNIR
NÚCLEO DE SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

EFEITO DA L-AMINOÁCIDO OXIDASE ISOLADA DO VENENO DA SERPENTE
Calloselasma rhodostoma NA FUNÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Tese apresentada à Fundação Universidade Federal de Rondônia, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Experimental no Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental.

Orientado: Adriana Silva Pontes

Orientador: Prof.^a Dr.^a Juliana Pavan Zuliani

Porto Velho - RO

2016

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

Pontes, Adriana Silva.

P814e Efeito da L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *calloselasma rhodostoma* na função de neutrófilos /Adriana Silva Pontes .- Porto Velho, 2016.
80f. :il.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana Pavan Zuliani

Tese (Doutorado em Biologia Experimental) – Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2016.

1.Biologia. 2.Veneno - serpente. 3.Neutrófilos. 4.Serpente – reativa – oxigênio I.Zuliani, Juliana Pavan. II.Fundação Universidade Federal de Rondônia. III Título.

CDU:598.1

Bibliotecária responsável: Carolina Cavalcante- CRB11/1579

FOLHA DE APROVAÇÃO

ADRIANA SILVA PONTES

EFEITO DA L-AMINOÁCIDO OXIDASE ISOLADA DO VENENO DA SERPENTE
Calloselasma rhodostoma NA FUNÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Data: __/__/____

BANCA EXAMINADORA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

Aos meus amados pais,
estou realizando um sonho, e minha vitória é fruto do incentivo, amor,
dedicação, carinho e apoio que vocês sempre me oferecem. Vocês são a
peça-chave do meu existir. Através da educação e dos ensinamentos
recebidos, aprendi a ser gente, gente que luta pelo que quer, gente que
procura fazer a diferença, gente que não deixa um sonho morrer. Sou e
serei grata, por toda minha vida, por me encorajar nos momentos de
desânimo e por colaborarem para que conseguisse alcançar meu sucesso.
Esta vitória pertence à vocês...

Nilo & Rosa

Amo Vocês!!!

A minha filha **Larissa Pontes**,

“ Filha, menina escolhida por Deus

Pra fazer sorrir a nossa vida

Com você os meus dias serão primavera

A flôr mais bela que Deus plantou em meu jardim.”

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora,

Juliana Pavan Zuliani,

Pelo auxílio, disponibilidade de tempo e material, me ajudando nas horas mais difíceis, sempre com uma simpatia e sabedoria contagiante que contribuíram para o meu desenvolvimento profissional.

Pelos ensinamentos que ficarão comigo por toda a vida, suas palavras de incentivo me ajudarão diante das adversidades.

Ao meu marido,

Raylan, obrigada por sempre está ao meu lado, pelo apoio na minha caminhada, pelos conselhos e pelo seu carinho.

As minhas amigas e amigos,

Sulamita Setúbal, Neriane, Bruna, Paula, Francisquinha, Weverson, Charles, Mauro, Jéssica e André;

As minhas mais novas amigas, Bruna, Mycarla, Lorraine, Paola, Piquena e Sara.

Com vocês aprendi a sorrir com meus acertos e rir de meus erros, desfrutar nossos sucessos e compartilhar nossos fracassos, a respeitar a vida e suas diferenças. A trilhar um caminho com amor e sabedoria.

“A amizade não se explica, ela simplesmente existe”.

AGRADECIMENTOS

Dedico meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma colaboraram com um pouco de si para a realização deste trabalho e em particular:

Ao professor Dr. Andreimar Soares, pela colaboração, ajuda e pela toxina utilizada neste estudo sem as quais, não existira este trabalho.

Aos os doadores de sangue

A Capes pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao CNPq e FINEP pelo auxílio financeiro

Ao CEBio e plataformas técnicas da Fiocruz Rondônia

A todos os funcionários da Fiocruz Rondônia.

A todos, o meu muito obrigada.

Epígrafe

“Não faças de ti
Um sonho a se realizar.
Vai. Sem caminho marcado.
Tu és o de todos os caminhos.
Sê apenas uma presença.
Invisível presença silenciosa.
Todas as coisas esperam a luz,
sem dizerem que a esperam.
Sem saberem que existe.
Todas as coisas esperarão por ti,
Sem te falarem.
Sem lhes falares. “

Cecilia Meireles

RESUMO

PONTES, A.S. Efeito da L-Aminoácido Oxidase Isolada do Veneno da Serpente *Calloselasma rhodostoma* na Função de Neutrófilos Humanos. Tese (Doutorado).

O veneno de serpentes consiste em uma mistura complexa de proteínas, peptídeos, lipídios, polissacarídeos e substâncias químicas inorgânicas. Polipeptídeos e proteínas estão presentes em maiores proporções, chegando a 90-95% do seu peso seco. Dentre os constituintes proteicos do venenos temos as metaloproteases, fosfolipases, hialuronidase, fosfolipases A₂ (PLA₂) e L-aminoácido oxidase (LAAO). A LAAO é uma enzima que se encontra amplamente distribuída em várias espécies de seres vivos. Além de peçonhas de serpentes, a enzima foi identificada em insetos, fungos e em plantas. Esta proteína desperta um grande interesse na área científica por apresentar efeitos de oxidação sobre diversos patógenos, como fungos e vírus e, sobre várias linhagens celulares. Parte desses efeitos é creditado ao peróxido de hidrogênio, gerado na reação oxidativa dessa enzima. Estudos anteriores realizados por Pontes et al. (2014) demonstraram a capacidade da LAAO, isolada do veneno da serpente *Calloselasma rhodostoma*, em ativar neutrófilos humanos isolados. Vale ressaltar que esta foi à primeira descrição desse efeito. No presente estudo, a LAAO não apresentou toxicidade sobre os neutrófilos. Nas concentrações de 50 e 100 µg/ mL, a toxina estimulou a migração dos neutrófilos, inibida pelo tratamento com Wortimanina (inibidor da PI3K) e SB 202190 (inibidor da p38 MAPK). Também, foi capaz de estimular a produção de espécies reativas do oxigênio seguido de degranulação, fagocitose de partículas de zimosan e liberação de mieloperoxidase pelos neutrófilos. Além disso, a LAAO estimulou estas células a liberar citocinas pró-inflamatórias como a IL-8, após 3 horas e, a IL-6, após 1 hora de incubação. Os mediadores lipídicos, prostaglandina E₂ e o leucotrieno B₄ foram detectados após 1 e 2 horas de incubação com a LAAO, respectivamente. A LAAO também foi capaz de estimular a formação e liberação de NETs, durante a 1ª hora de incubação. Este estudo permitiu uma melhor compreensão do mecanismo de ação da LAAO sobre neutrófilos, possibilitando novas perspectivas para sua utilização como modelo molecular no estudo de processos fisiopatológicos e para o desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chave: LAAO. Inflamação. Neutrófilos. Quimiotaxia. Fagocitose. Espécies reativas de oxigênio. NETs.

ABSTRACT

PONTES, A. S. Effect of L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodostoma* snake venom on human neutrophil functions. Thesis (PhD).

Snake venoms consists of a complex mixture of proteins, peptides, lipids, polysaccharides and inorganic chemical substances. Polypeptides and proteins are present in high content, ranging from 90-95% of its dry weight. Among the protein constituents of snake venoms are the metalloproteases, phosphodiesterases, hyaluronidase, phospholipase A₂ (PLA₂) and L-amino acid oxidase (LAAO). LAAO is an enzyme widely distributed in various species of living beings. Besides snake venoms, the enzyme was identified in insects, fungi and plants. This protein attracts great interest in the scientific area by present oxidation effects on various pathogens, like viruses and fungi, and several cell strains. Part of these effects are credited to the hydrogen peroxide generated in the oxidative reaction of this enzyme. Previous studies conducted by Pontes et al. (2014) demonstrated the capacity of LAAO, isolated from *Calloselasma rhodostoma* snake venom, to activate isolated human neutrophils. It is worth mentioning that this was the first description of this effect. In the present study, LAAO was not toxic to neutrophils. At concentrations of 50 and 100µg/mL, the toxin stimulated neutrophils migration inhibited by treatment with Wortmanin (a PI3K inhibitor) and SB 202190 (a p38MAPK inhibitor). Also, LAAO was able to stimulate reactive oxygen species production followed by degranulation, phagocytosis of zymosan particles and release of myeloperoxidase from neutrophils. In addition, LAAO stimulated neutrophils to release proinflammatory cytokines such as IL-8, after 3 hours, and IL-6, after 1 hour of incubation. In addition, prostaglandin E₂ and leukotriene B₄ were also detected after 1 and 2 hours of incubation with LAAO, respectively. LAAO was able to stimulate the formation and release of NETs during the 1st hour of incubation. This study enabled to a better understand of the mechanism of action of LAAO on neutrophils, allowing for new perspectives to be used as molecular model in the study of pathophysiological processes and/or for the development of new drugs.

Keywords: LAAO. Inflammation. Neutrophils. Chemotaxis. Phagocytosis. Oxigen-reactive species.Nets.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ação de uma LAAO sobre um L-aminoácido, mostrando a desaminação esteroespecífica oxidativa.....	15
Figura 2. Estrutura cristalográfica da LAAO de <i>Calloselasma rhodostoma</i>	16
Figura 3. Serpente: <i>Calloselasma rhodostoma</i>	20
Figura 4. Microscopia eletrônica de um neutrófilo.....	21
Figura 5. Efeito da LAAO sobre a viabilidade de neutrófilos humanos.....	37
Figura 6: Efeito da LAAO sobre a quimiotaxia de neutrófilos humanos.....	38
Figura 7. Efeito dos inibidores de PI3K (Wortimanina) e p38 MAPK (SB 202190) sobre a quimiotaxia de neutrófilos.....	40
Figura 8. Efeito da LAAO sobre a produção de espécies reativas do oxigênio.....	41
Figura 9. Efeito da LAAO sobre a fagocitose de zimosan por neutrófilos humanos.....	42
Figura 10. Efeito da LAAO sobre a liberação de MPO por neutrófilos humanos.....	43
Figura 11. Efeito da LAAO sobre a produção de PGE ₂ por neutrófilos humanos.....	44
Figura 12. Efeito da LAAO sobre a produção de LTB ₄	45
Figura 13. Liberação de DNA por neutrófilos induzidos pela LAAO.....	46
Figura 14. Efeito da LAAO sobre a produção de IL-6 e IL-8 por neutrófilos humanos.....	47
Figura 15. <i>Imunoblotting</i> para p38 MAPK constitutiva e fosforilada.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA: Ácido araquidônico
- COX 1: Ciclooxigenase-1
- COX 2: Ciclooxigenase-2
- DCFDA: Diacetato de diclorofluoresceína
- DAB: Diaminobenzidina
- EIA: Ensaio imuno enzimático
- ERO: Espécies reativas do oxigênio
- ERK: Proteína cinase regulada por sinal extracelular
- FAD: Flavina adenina dinucleotídeo
- FLAP: Proteína ativadora da 5-LO
- FMN: Flavina mononucleotídeo
- FMLP: N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina
- GPCR: Receptores acoplados à proteína G
- HIV: Vírus da Imunodeficiência Adquirida Humana
- HPETE: Hidroperoxieicosatetraenóico
- H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio
- IL-1: Interleucina-1
- IL-6: Interleucina-6
- IL-8: Interleucina-8
- JNK: proteína cinase c-Jun N-terminal
- kDa: Quilodalton
- LAAO: L-aminoácido oxidase
- LO: Lipooxigenase
- LPS: Lipopolissacarídeo
- LT: Leucotrieno
- LTB₄: Leucotrieno B₄
- MPO: Mieloperoxidase
- MyD88: Fator 88 de diferenciação mielóide
- NADPH oxidase: Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato oxidase
- NETs: Redes extracelulares de neutrófilos
- PAF: Fator ativador de plaquetas
- PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

MAPKs: Proteínas cinase ativadas por mitógenos

PIP3K: Fosfatidilinositol-3 quinase

PIP3: Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato

PGE₂: Prostaglandina E₂

PMA: Acetato de forbol miristato

TLR: Receptores tipo “toll”

TMB: Tetrametilbenzidina

TNF- α : Fator de necrose Tumoral-alfa

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS ESPECIAIS	6
AGRADECIMENTOS	7
EPIGRAFE	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 L-AMINOÁCIDO OXIDASE.....	15
1.2 A SERPENTE <i>Calloselasma rhodostoma</i>	20
1.3 NEUTRÓFILOS – ASPECTOS GERAIS	21
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 LAAO	30
3.2 ENSAIO DA ATIVIDADE DA L-AMINO ÁCIDO OXIDASE	30
3.3 OBTENÇÕES DE NEUTRÓFILOS HUMANOS.....	30
3.4 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR POR EXCLUSÃO DO AZUL DE TRIPAN31	
3.5 QUIMIOTAXIA EM PLACA <i>TRANSWELL</i>	31
3.5.1 Modulação farmacológica da quimiotaxia	32
3.6 ATIVIDADE FAGOCÍTICA POR NEUTRÓFILOS HUMANOS.....	32
3.7 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO POR NEUTRÓFILOS HUMANOS	32

3.8	LIBERAÇÃO DE MIELOPEROXIDASE	33
3.9	QUANTIFICAÇÃO DO MEDIADOR LIPÍDICO PGE ₂ E LTB ₄	33
3.10	QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE INTERLEUCINA-8 (IL-8) E INTERLEUCINA -6 (IL-6).....	34
3.11	QUANTIFICAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE NETs POR NEUTRÓFILOS HUMANOS.....	35
3.12	IMUNOBLOTTING PARA P38 MAP CINASE	35
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
4	RESULTADOS	37
4.1	EFEITO DA LAAO SOBRE A VIABILIDADE DE NEUTRÓFILOS HUMANOS..	37
4.2	EFEITO DA LAAO SOBRE A QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS.	38
4.3	EFEITO DOS INIBIDORES WORTIMANINA E SB 202190 SOBRE A QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS INDUZIDAS PELA LAAO.	39
4.4	EFEITO DA LAAO SOBRE A LIBERAÇÃO DE EROs.....	41
4.5	EFEITO DA LAAO SOBRE A FAGOCITOSE DE ZIMOSAN POR NEUTRÓFILOS HUMANOS.....	42
4.6	EFEITO DA LAAO SOBRE A LIBERAÇÃO DE MIELOPEROXIDASE POR NEUTRÓFILOS HUMANOS.....	43
4.7	EFEITO DA LAAO SOBRE A PRODUÇÃO DE PGE ₂ POR NEUTRÓFILOS HUMANOS.....	44
4.8	EFEITO DA LAAO SOBRE A PRODUÇÃO DE LTB ₄ POR NEUTRÓFILOS HUMANOS.....	45
4.9	EFEITO DA LAAO SOBRE A LIBERAÇÃO DE NETs POR NEUTRÓFILOS HUMANOS.....	45
4.10	EFEITO DA LAAO SOBRE A PRODUÇÃO DE INTERLEUCINA-8 (IL-8) E INTERLEUCINA -6 (IL-6) POR NEUTRÓFILOS HUMANOS.	47
4.11	IMUNOBLOTTING PARA P38 MAP cinase	48
5	DISCUSSÃO	49
6	CONCLUSÕES	58

REFERÊNCIAS	59
ANEXOS	80

1 INTRODUÇÃO

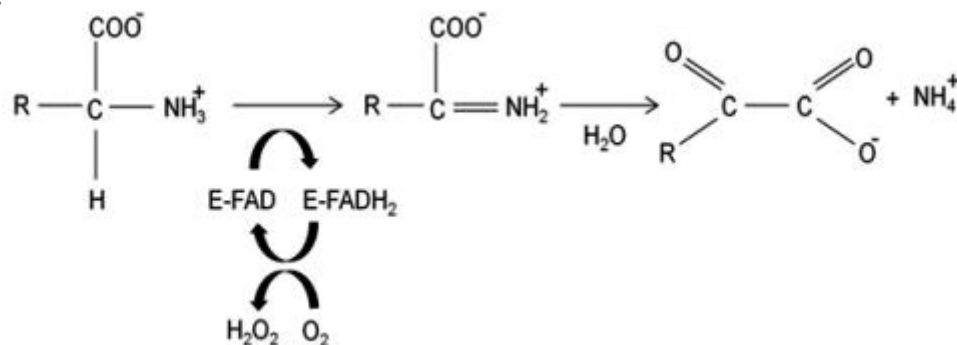
1.1 L-AMINOÁCIDO OXIDASE

Os principais componentes dos venenos de serpentes são peptídeos e proteínas, alguns destes constituintes tornaram-se valiosos como ferramentas e/ou terapêutica, devido à sua elevada especificidade farmacológica e potência para alvos moleculares (KING et al., 2011). Cerca de 20 tipos diferentes de enzimas são conhecidos até agora, encontradas no veneno de serpentes em diferentes combinações e concentrações. Destas, incluem acetilcolinesterases, serinoproteases, metaloproteínases, fosfolipases A₂ e L-aminoácido oxidases (JAIN; KUMAR, 2012).

Os venenos das serpentes da família Viperidae, Crotalidae e Elapidae são fontes ricas de LAAO. Contém FAD ou FMN ligados as glicoproteínas, que são responsáveis pela coloração amarelo do veneno e contribui para a toxicidade do envenenamento por meio do estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (GUO et al., 2012).

As L-aminoácido oxidases (LAAO) são flavoenzimas que catalisam a oxidação estereoespecífica de um L-aminoácido para um α -acetoácido com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia por meio de um iminoácido intermediário (CURTI et al., 1992; ZULIANI et al., 2009) (Figura 1).

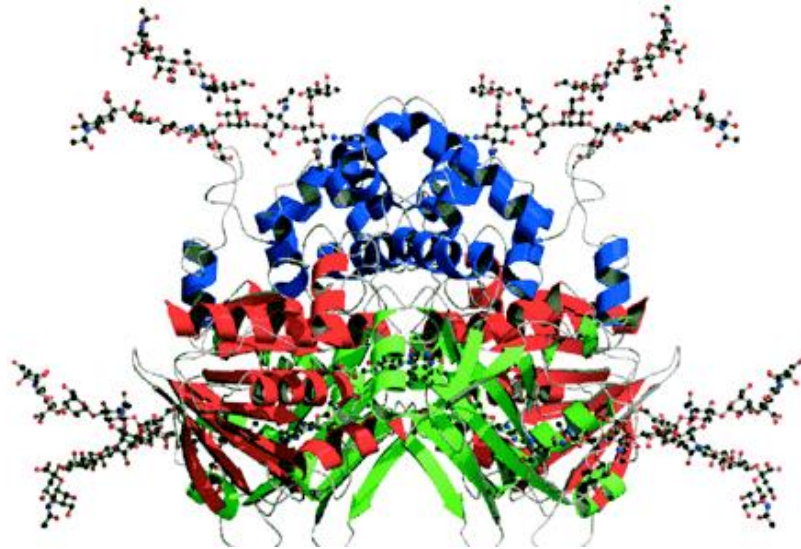
Figura 1. Ação de uma LAAO sobre um L-amino ácido, mostrando a desaminação estereoespecífica oxidativa.



Fonte: Costa et al., (2014).

De acordo com Macheroux e colaboradores (2001) a LAAO isolada do veneno da serpente *Calloselasma rhodostoma* é dimérica e contém três domínios distintos: helicoidal, ligante do substrato e ligante do FAD (Figura 2).

Figura 2. Estrutura cristalográfica da LAAO de *Calloselasma rhodostoma*.



O domínio ligante do FAD é mostrado em vermelho, o de ligação do substrato em verde e o helicoidal em azul.

Fonte: Geyer et al., 2001

A LAAO de *Calloselasma rhodostoma* é uma proteína que se apresenta em forma de homodímero e possui massa molar de 110 a 150 kDa. Dois sítios de glicosilação foram observados: um no domínio de ligação do substrato e, outro, no domínio helicoidal (PAWELEK et al., 2000). Alguns carboidratos como: galactose, manose, fucose e ácido siálico foram identificados nas LAAOs, correspondendo a aproximadamente 5,4% da proteína (DE KOK; RAWITCH, 1969; SOLIS et al., 1999; ALI et al., 2000).

Esta enzima tem despertado o interesse devido ao seu potencial biológico, como mostrou Skarnes em 1970, com a LAAO de *Crotalus adamanteus* que apresentou atividade bactericida sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Mais tarde, em 1991, Stiles e colaboradores realizaram estudos sobre o efeito bactericida de venenos de serpentes, mais especificamente de *Pseudochis australis*, do qual isolou componentes antimicrobianos. Vários estudos foram realizados com diferentes serpentes: *Bothrops alternatus* (STÁBELI et al., 2004), *Trimeresurus mucrosquamatus* (WEI et al., 2003), *Bothrops pirajai* (IZIDORO et al., 2006), *Agkistrodon halys pallas* (LIU et al., 2002), *Crotalus durissus cascavella* (TOYAMA et al., 2006), *Vipera lebetina* (TONISMAGI et al., 2006), *Bothrops moojeni* (STÁBELI et al., 2007), *Naja naja oxiana* (SAMEL et al., 2008), *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES et al., 2009), *Bothrops jararaca* (CISCOTTO et al., 2009), *Bothrops marajoensis* (TORRES et al., 2010), *Ophiophagus hannah* (LEE et al., 2011), *Calloselasma rhodostoma* e *Ophiophagus hannah* (KUNALAN et al., 2012) e *Crotalus durissus cumanensis* (VARGAS et al., 2013) e evidenciam o potencial anti-microbiano, da toxina.

Durante anos, a LAAO tornou-se de interesse para estudos biomédicos, por apresentar alguns efeitos biológicos opostos. Como mostra Stábéli et al. (2007) a LAAO isolada de *Bothrops moojeni* induz a agregação plaquetária, em plasma rico em plaquetas, de forma dose-dependente. Esses achados também foram reportados por Li et al. (1994), com a LAAO de *Ophiophagus hannah*, Wei et al. (2003) com a LAAO de *Trimeresurus mucrosquamatus*, Stábéli et al. (2004) com a LAAO de *Bothrops alternatus*, Wei et al. (2007) com a LAAO de *Agkistrodon blomhoffi*, Alves et al. (2008) com a LAAO de *Bothrops atrox* e Rodrigues et al. (2009) com a LAAO de *Bothrops pauloensis*. Dados da literatura mostram que a produção de H_2O_2 pela LAAO pode promover a síntese de tromboxano A_2 pela via da ciclooxigenases (LI et al., 1994), assim o H_2O_2 pode atuar de forma oxidativa sobre as plaquetas, causando sua ativação (STÁBELI et al., 2007).

Contudo, outros estudos demonstraram que a LAAO de *Echis colorata* (NATHAN et al., 1982), *Agkistrodon halys pallas* (LIU et al., 2002), *Naja naja kaouthia* (SAKURAI et al., 2001), *Agkistrodon halys blomhoffii* (TAKATSUKA et al., 2001), *Ophiophagus hannah* (JIN et al., 2007) e *Daboia russelii* (ZHONG et al., 2009) inibiu a agregação plaquetária. Essa atividade inibitória da LAAO, deve-se a interferência do H_2O_2 nos receptores das plaquetas GPIIb/IIIa, pela reduzida ligação de seu agonista: ADP ou fibrinogênio (BELISARIO et al., 2000; PIGNATELLI et al., 1998; SUHR; KIM, 1996; DU; CLEMETSON 2002).

Outro importante efeito biológico da LAAO isolada de serpentes é a atividade antiviral e antiprotozoária. A LAAO de *Trimeresurus stejnegeri* mostrou atividade de inibição e anti-replicação do vírus HIV-1, de forma dose-dependente, no entanto, quando adicionou-se H_2O_2 exógeno, não houve atividade anti-viral (ZHANG et al., 2003). Um provável mecanismo de ação anti-HIV, envolve interação da enzima com a superfície da célula que ajuda a gerar altas concentrações locais de H_2O_2 , desencadeando uma ativação celular, resultando na inibição da infecção (TAN; FUNG 2008).

As LAAOs, isoladas de venenos serpentes, atuam sobre protozoários, como a *Leishmania sp*, segundo estudos realizados por Tempone et al. (2001). Neste estudo, os autores mostraram que a LAAO isolada do veneno de *Bothrops moojeni* apresentou efeito de inibição de crescimento sobre *Leishmania amazonensis*. Do mesmo modo, a LAAO isolada do veneno de *Crotalus durissus cascavella* (TOYAMA et al., 2006), também inibiu o crescimento de *Leishmania amazonensis*, assim como a LAAO de *Bothrops pirajai* que, também, inibiu o crescimento das promastigotas de *Leishmania donovani*, *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania major* (IZIDORO et al., 2014) e, a de *Bothrops marajoensis* que inibiu o crescimento de promastigotas de *Leishmania chagasi* e

Leishmania amazonensis de forma dose dependente (COSTA et al., 2010). O efeito leishmanicida observado com as LAAOs isoladas de venenos de serpentes pode ser atribuído ao estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio nos protozoários, gerando uma atividade proteolítica nos mesmos (IZIDORO et al., 2006) e, subsequente distúrbios na função mitocondrial, devido ao aumento da concentração de cálcio intracelular (MOREIRA et al., 1996). A ação tóxica da LAAO também foi observada sobre *Trypanosoma cruzi*. Neste caso, a LAAO isolada do veneno de *Bothrops moojeni* e de *Bothrops jararacussu* mostraram ação citotóxica sobre o protozoário, inibida pela adição de catalase (FRANÇA et al., 2007). Do mesmo modo, observou-se o efeito tóxico da LAAO de *Bothrops moojeni* sobre o *Trypanosoma cruzi* de forma dose dependente (STÁBELI et al., 2007).

Outra característica funcional importante das LAAOs isoladas de venenos é sua ação citotóxica sobre diversas linhagens celulares humanas, como: células endoteliais vasculares (TORII et al., 1997), células embrionárias do rim 293T (TORII et al., 2000), células pró-mielocíticas HL-60 (STÁBELI et al., 2007), células monocíticas MM6 (ALI et al., 2000), células tumorais de mama MCF-7 (COSTA et al., 2014; MUKHERJEE et al., 2015), células neoplásicas de fígado HepG2 (GUO et al., 2015) e células de linhagem prostática PC-3 (LEE et al., 2014). Ainda exerce efeito sobre células tumorais murinas: leucemia linfocítica L1210 (SUHR; KIM, 1996), melanoma B16/F10 e sarcoma S180 (AHN et al., 1997; GU et al., 2012; COSTA et al., 2014). Além da ação tóxica sobre células, também foi observado que a LAAO isolada do veneno de *Bothrops moojeni* apresentou atividade contra tumores de Ehrlich de forma dose dependente (STÁBELI et al., 2007; VIEIRA SANTOS et al., 2008). O efeito tóxico da LAAO sobre estas células é creditado ao H_2O_2 , gerado durante a reação enzimática (PONNUDURAI et al., 1994). Visto que as membranas de células tumorais apresentam concentrações mais altas de lipídios do que as células normais, especula-se que o peróxido de hidrogênio produzido pela LAAOs exerça uma ação sobre a membrana dessas células, com menor toxicidade sobre as células normais (LEE et al., 2002). Adicionalmente, Paiva et al. (2011) evidenciaram que a LAAO pode desestabilizar o estado do ciclo celular das células cancerosas. A análise por citometria de fluxo, das células HL-60, mostrou que a LAAO isolada do veneno de *Bothrops atrox*, nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, impediram as células de saírem da fase G0/G1. Do mesmo modo, a LAAO isolada do veneno de *Naja Naja atra*, inibiu o crescimento das células de tumores sólidos por bloquear a transição celular da fase S para a G2 (CHEN et al., 2009). Esses efeitos podem ser atribuídos à produção de H_2O_2 que é permeável à membrana plasmática, e assim capaz de interferir em ácidos nucleicos e proteínas e causar danos no ciclo celular (FINDRIK et al., 2006). Além disso, DiPietrantonio

et al. (1999) observou o aumento na atividade de caspase 3 em células HL-60 expostas ao peróxido de hidrogênio exógeno, o qual pode induzir a expressão de Fas (“receptores de morte”) em células humanas endoteliais (SUHARA et al., 1998). Recentemente Burin et al., (2016) mostraram que a LAAO de *Calloselasma rhodostoma* promoveu a apoptose de células mielóides leucêmicas por induzir a atividade das caspases 3,8 e 9.

Evidências mostraram a capacidade da LAAO, isolada do veneno de *Calloselasma rhodostoma*, em ativar neutrófilos humanos *in vitro*, por estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-8 e TNF- α , além de induzir a produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, assim como a formação de redes de neutrófilos (NETs) (PONTES et al., 2014).

As LAAOs ofídicas estão revelando, cada vez mais efeitos biológicos, demonstrando o grande potencial dessas proteínas. Estudos de caracterização estrutural e funcional dessa classe de enzima serão importantes, tanto do ponto de vista de compreensão do seu mecanismo de ação quanto de sua potencial aplicação biotecnológica.

1.2 A SERPENTE *Calloselasma rhodostoma*

A *Calloselasma rhodostoma*, antigamente conhecida como *Agkistrodon rhodostoma* (Figura 3) é uma serpente terrestre, encontrada no sul do Vietnã, Laos Tailândia e Camboja. Abrange também toda a borda do oeste da Malásia, por isso o nome de “Jararaca da Malásia” (GLOYD; CONANT, 1990).

Estas regiões são afetadas, devido a alta densidade populacional e intensa atividades agrícolas (CHIPPAUX, 1998), sendo a serpente *Calloselasma rhodostoma* a principal causadora de envenenamento, na qual abrange uma larga faixa de distribuição geográfica (SAWAI et al., 1972).

Figura 3. Serpente: *Calloselasma rhodostoma*



Fonte: www.venimologia.kazeo.com

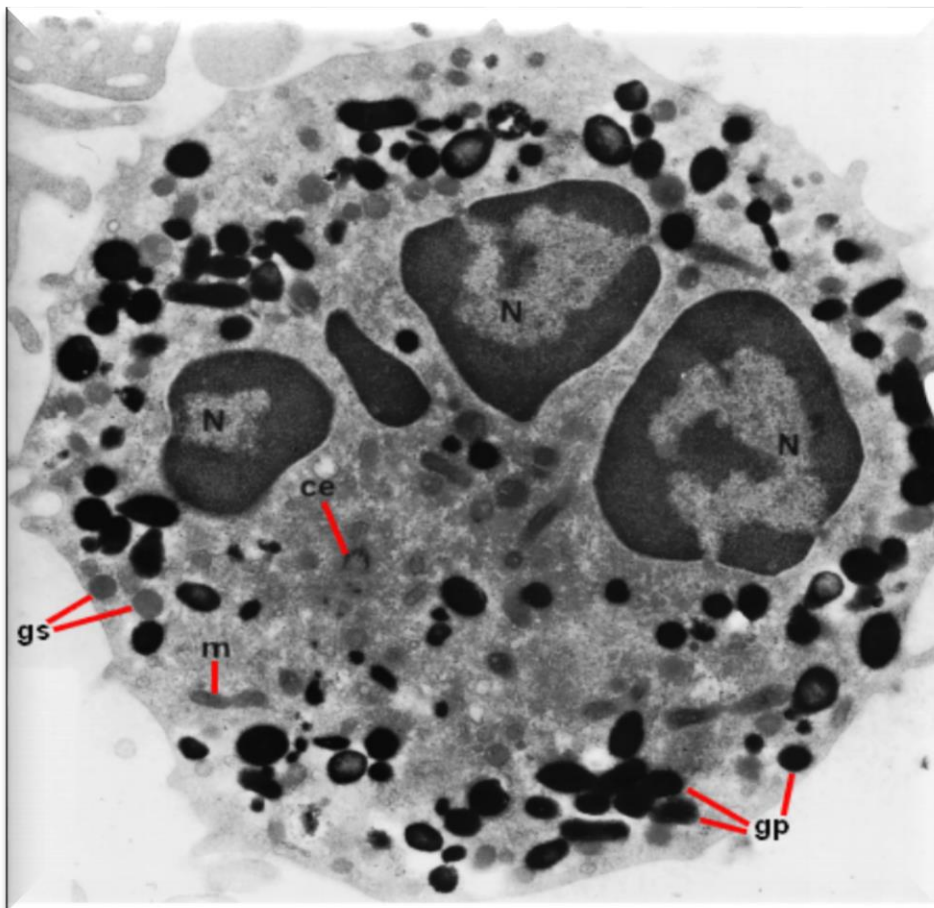
Os envenenamentos causados por essa serpente não chegam a ser fatais, no entanto muitas vítimas apresentam permanentes (WARRELL et al., 1986).

A serpente exibe uma variedade de cores que vão do marrom ao cinza e também apresenta uma faixa clara que vai do olho até a mandíbula.

1.3 NEUTRÓFILOS – ASPECTOS GERAIS

Os neutrófilos são os leucócitos mais numerosos do sangue periférico, sendo classificados como granulócitos polimorfonucleares e constituem cerca de 60 a 70% do total de leucócitos circulantes (LAGRANHA et al., 2008; CARLO et al., 2001). Morfologicamente, os neutrófilos apresentam-se com o tamanho de aproximadamente 12 a 15 μM de diâmetro, nucléolo ausente e presença de grânulos citoplasmáticos (KUIJPERS, 2001) os quais podem ser classificados em grânulos primários ou azurófilos, grânulos secundários ou específicos (Figura 4) e grânulos terciários (FAURSCHOU; BRREGAARD 2003).

Figura 4. Microscopia eletrônica de um neutrófilo.



Observa-se os grânulos azurófilos ou primários (gp) (maiores e densos) e os grânulos secundários ou específicos (gs). O núcleo segmentado (N), mitocôndria (m) e centríolos (ce).

Fonte: WITKO-SARSAT et al., 2000.

Os grânulos primários ou azurófilos aparecem quando os neutrófilos encontram-se no estágio de promielócitos e, caracterizam-se por possuírem mieloperoxidase, serinoprotease (FOURET et al., 1989), elastase (DAMIANO et al., 1988), catepsina G e defensinas (PHAM,

2006). No estágio de metamielócitos, os grânulos secundários ou específicos começam a se formar, e caracterizam-se por possuírem lactoferrina, colagenase (WITKO-SARSAT et al., 2000), liozima, gelatinase e fosfatase alcalina (BORREGAARD et al., 1993), seguido dos grânulos terciários que possuem gelatinase e metaloproteinase (DELCLAUX et al., 1996; PHAM, 2006). Além desses três tipos de grânulos, os neutrófilos possuem vesículas secretoras que são responsáveis pelo armazenamento e expressão de moléculas de adesão, tais como CD18, CD66, CD67, além de receptores, TNFR1 e 2, MyD88, fMLP, TLR-1, -2, -4, -6, -8 e, de proteínas bactericidas como as defensinas, liozimas e mieloperoxidase (BORREGAARD et al., 2007; HAGER, 2010). Seu núcleo apresenta segmentos constituídos de cromatina púrpura e densa com 3 a 5 lóbulos interligados (JOHNSON et al., 1992).

Os neutrófilos são constantemente produzidos e armazenados na medula óssea e liberados na corrente sanguínea, com uma vida média na circulação de 6-7 horas (RODRIGUES, 2012). Contudo, quando ativados migram para os tecidos, e aumentam o tempo de vida para 2 a 6 dias (CASSATELA, 2003; MONCH, 2005; PILLAY et al., 2010). Fazem parte da resposta imune inata (KUMAR; SHARMA 2010) e formam uma das primeiras linhas de defesa, respondendo rapidamente a estímulos quimioatrativos (KAUFMANN et al., 2006; BORREGAARD, 2010; KOLACZKOWSKA, 2010). Seu recrutamento para o sítio lesado ou infeccioso é um dos mecanismos cruciais de defesa do hospedeiro contra os agentes patológicos (LEHRER et al., 1988; KOLACZKOWSKA, 2010). A quimiotaxia constitui em um importante processo da resposta imune, pelo qual as células migram para o sítio infeccioso, inflamatório, fisiológico, como no caso de embriogênese, e câncer, em caso de metástases (HAYNES; KIM, 2012). Os neutrófilos são guiados por moléculas sinalizadoras chamadas quimioatrativos que não apenas os direcionam como também ativam essas células (MOSER et al., 2004). A maioria dos quimioatrativos, atuam via receptores acoplados a proteína G (GPCR) (DEVALARAJA; RICHMOND, 1999; GAMBARDELLA; VERMEREN, 2013). São expressos na superfície celular e possuem uma estrutura característica de sete domínios α -helicoidais transmembrana acoplados à proteína G. De acordo com os mediadores envolvidos na resposta celular, os receptores dividem-se em cinco grupos: receptores para fMLP (MIGEOTTE et al., 2006), PAF, LTB₄, C5a (YOKOMIZO et al., 1997; RABIET et al., 2007; LEE et al., 2008) e quimiocinas da família CXC, principalmente receptores CXCR1 e CXCR2 e, para IL-8 (PREMACK; SCHALL, 1996; JOHNSTON et al., 1999).

As proteínas G são moléculas heterotriméricas, formadas por três polipeptídios distintos, α , β e γ e, assim designadas por interagir com grupos guanílicos guanosina difosfato

(GDP) e guanosina trisfosfato (GTP) (MOURA; VIDAL, 2011), sendo a subunidade α ligada a guanosina difosfato. Quando ativadas, as subunidades $G\beta\gamma$ são liberadas em decorrência da formação do complexo GTP- $G\alpha$ (FUTOSI et al., 2013). De acordo com o tipo de subunidade α , apresenta diferentes tipos de proteínas G. Se a subunidade α for do tipo α_s , será denominada proteína G estimulatória (G_s), que catalisa a formação de 3'-5' adenosina monofosfato cíclico (AMPc) ativando a proteína cinase dependente de AMPc (PKA) (OKA et al., 2009; FUTOSI et al., 2013). Por outro lado, se a ativação for pela subunidade α_i , ocorrerá a inibição (G_i) da enzima adenilato-ciclase (GUILLARD et al., 2003). Além disso, a proteína G_q está envolvida na ativação da enzima fosfolipase C (PLC) que degrada o fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP_2) presente nas membranas celulares em 1,4,5 trifosfato de inositol (IP_3) e 1,2 diacilglicerol (DAG), responsáveis pela ativação de proteína quinase C (PKC) e aumento de cálcio citoplasmático (CABRERA-VERA et al., 2003). Tanto as vias, AMPc quanto as PLC participam indiretamente da resposta motora dos neutrófilos através de seus produtos PKA e PKC (MAXFIELD, 1993; GUO; YANG, 2006;), assim a mobilização da fosfoinositol 3-cinase (PI3K) e a produção de PIP_3 (fosfatidilinositol-trifosfato) desempenham um papel chave na sinalização da motilidade dos neutrófilos, devido a sua relação com os filamentos de actina e proteínas tirosina cinases (JANETOPOULOS; FIRTEL 2008).

As MAPKs são serina-treonina cinase e medeiam sinais reguladores nas células, sendo elas p38, ERK e a JNK. A MAPK p38 é composta por quatro isoformas: p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ , sendo que a MAPK p38 α é a mais envolvida na resposta inflamatória (ONO; HAN 2000; MALEMUD, 2007). Diversos estudos mostram que a MAPK p38 é umas das principais vias de sinalização envolvida na quimiotaxia de neutrófilos (CARA et al., 2015; KIM et al., 2013; XU et al., 2013) promovendo sua mobilização para dentro do vaso, migração e direcionamento (GUO; YANG, 2006; XU et al., 2013). Além disso, a família MAPK p38 está envolvida na resposta inflamatória, desempenhando um importante papel na produção de citocinas: TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-7 e IL-8 (CUEDA; ROUSSEAU 2007; CARGNELLO; ROUX 2011) na indução de COX-2 (GUAN et al., 1998) e na regulação da proteína tensora PTEN (SHEN et al., 2006; XU et al., 2013; KIM et al., 2013). Ainda, as MAPKs são capazes de ativar o fator de transcrição nuclear kappa B (NF κ B), que regula a transcrição e síntese de várias proteínas envolvidas na dor e inflamação (GHOSH et al., 1998; GOEBELER et al., 2001).

Ao entrarem em contato com o agente agressor, os neutrófilos são capazes de eliminar diversos patógenos, restos de tecidos, por meio do processo de fagocitose, e consequente

liberação de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio além da produção e liberação de citocinas (FAURSCOU; BORREGAARD, 2003).

A fagocitose é um processo de internalização que é acompanhado de múltiplos mecanismos de sinalização que coordenam os rearranjos do citoesqueleto, a extensão da membrana citoplasmática e o envolvimento da partícula (ALLEN; ADEREM, 1996). O englobamento do patógeno pelo neutrófilo é geralmente acompanhado de sinalização inflamatória e ativação de mecanismos microbicidas, que pode ser mediado diretamente pelo reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) ou, indiretamente, através de opsoninas (IgG ou componentes do sistema complemento) (FLANNAGAN et al., 2009; DIACOVICH, 2010). A ativação do processo de fagocitose estimula nos neutrófilos uma explosão respiratória, referida como “burst” oxidativo, a qual é caracterizada pelo aumento do consumo de oxigênio, aumento da glicólise anaeróbica e geração de radicais livres, derivados do oxigênio (MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 1997). Esta explosão respiratória foi descrita pela primeira vez por BALDRIDGE; GERARD em 1933 e, anos mais tarde, foi constatado que a ativação da NADPH oxidase era responsável pelo “burst” respiratório nos neutrófilos (SERRA et al., 1988).

A NADPH oxidase é o complexo mais importante para a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) em fagócitos (ABO et al., 1994). Sua estrutura é relativamente complexa e quando não está estimulada, três dos seus componentes estão distribuídos no citoplasma (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}) e os outros dois (p22^{phox} e gp91^{phox}) fazem parte de proteínas integrais de membrana, que juntas formam o citocromo *b558*, caracterizado como o núcleo catalítico do complexo enzimático. Contudo, existem ainda as proteínas G (Rac 2 e Rap 1 A) que auxiliam na ativação da enzima (BABIOR, 1999; LAMBETH et al., 2007). Em resposta a estímulos apropriados, o complexo constituído pelas subunidades citosólicas migram do citosol para a membrana plasmática e associam-se ao citocromo *b558* (BABIOR, 1999; MINAKAM; SUMIMOTO, 2006).

Uma vez formado o complexo enzimático da NADPH, os elétrons são transferidos para o oxigênio molecular, resultando na geração de ânion superóxido (O_2^-) (YU et al., 1999). O ânion superóxido pode ser dismutado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), de forma espontânea ou pela superóxido dismutase (SOD), e pode ser convertido em água pela catalase ou, ainda, pode reagir com a mieloperoxidase (MPO), que em presença de íons haletos, formam o ácido hipocloroso (HOCL) (MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM 1997; BARDOEL et al., 2014). Ainda, o “burst” respiratório gera duas outras espécies reativas: o óxido nítrico (NO), que é um gás inorgânico e incolor, constitui um dos mais

importantes mediadores de processos intra e extracelular, desempenhando um papel importante na manutenção do tônus vascular, regulação da pressão sanguínea, prevenção da agregação plaquetária (DUSSE et al., 2003), e neurotransmissão (DOWNEN et al., 1999) e, o oxigênio “singlet” ($1 O_2$) que é formado na dismutação do ânion superóxido e possui um elétron fora do seu estado fundamental, tornando-o altamente reativo (MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 1997).

No entanto, as EROs podem ser formadas por mecanismos independentes de NADPH-oxidase, por meio da mitocôndria, no qual aproximadamente 1 a 2% dos elétrons conduzidos ao longo dos complexos enzimáticos, que integram a cadeia respiratória mitocondrial, escapam reduzindo o oxigênio a O_2^- , que é captado e convertido a H_2O_2 pela superóxido-dismutase (SOD) dependente de magnésio. A produção de O_2^- nas mitocôndrias ocorre predominantemente no complexo I (NADH desidrogenase) e no complexo III (do ubiquinol-citocromo c oxidoreductase) (RIBEIRO et al., 2005).

Concomitantemente ao processo de formação das EROs, ocorre a produção de citocinas, que desempenham um importante papel na interação celular, controlam a evolução da resposta inflamatória, recrutam células efectoras e possuem ação autócrina, endócrina, parácrina e pleotrópica (SHERWOOD; TOLIVER- KINSKY, 2004). Dentre as citocinas, a interleucina-1 (IL-1) é uma das mais importantes mediadoras da inflamação e, é primeiramente produzida por monócitos e macrófagos ativados (VAN DER MEER et al., 1994; ESTROV et al., 1995). Está envolvida na inflamação aguda e crônica e é essencial na resposta do hospedeiro à infecção (NETEA et al., 2015). Diversas atividades pro-inflamatórias tem sido atribuídas a IL-1, tais como aumento do fluxo sanguíneo no local da injúria, febre, produção de mediadores solúveis, aumento da expressão de moléculas de adesão (ROSENBERG e GALLIN 1999) e aumento da citotoxicidade de células fagocíticas frente à presença de bactérias ou vírus (FORTE, 2004). A IL-1 está associada à sepse, disfunções orgânicas (PUGIN, 2006), aterosclerose (GAWAZ et al., 2000) e está presente em modelos de injúria cerebral (THORNTON et al., 2006).

Outra citocina importante é a interleucina-6 (IL-6). Esta citocina também é produzida por linfócitos T, células endoteliais, monócitos e fibroblastos (ROSENBERG; GALLIN 1999) e, segundo Johnson et al., (1998) aumenta o potencial citotóxico dos neutrófilos, por induzir a liberação de elastase além de promover a diferenciação dos monócitos. A IL-6 está associada à hipertensão (CHAE et al., 2001), a lesões ateroscleróticas (AMAR et al., 2006) e promove a produção e liberação de proteína C reativa pelos hepatócitos (YAMAZAKI et al., 2005). Ainda, durante a reação inflamatória retarda a apoptose de neutrófilos e aumenta a capacidade

de produção de superóxido por essas células (BIFFL, 1996). Recentemente esta citocina foi associada à progressão do câncer, distúrbios metabólicos como a obesidade e diabetes *mellitus* tipo-2 (MAUER et al., 2015).

A interleucina-8 (IL-8) é uma citocina fundamental no recrutamento e ativação dos neutrófilos, produzida por monócitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e neutrófilos (CHALY et al., 2000). Durante a inflamação é capaz de atuar sobre os neutrófilos, estimulando a degranulação, a adesão às células endoteliais, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a quimiotaxia (HAMMOND et al., 1995). A IL-8 se liga ao neutrófilos através do receptor CXCR1 (SOZZANI et al., 1994).

O TNF- α foi descrito originalmente nos anos 70, como um mediador de necrose induzido por lipopolissacarídeo (CARSWELL et al., 1975). É uma citocina pró- inflamatória, que regula a proliferação celular, diferenciação, apoptose (MOURA et al., 2001) e induz a febre, assim como a IL-1 (ROSENBERG ; GALLIN 1999). Estudos *in vitro*, indicam que o TNF- α aumenta a expressão de moléculas de adesão CD11b/CD18 sobre neutrófilos, aumenta adesão ao endotélio (GAMBLE et al., 1985) e promove a degranulação e fagocitose (KLEBANOFF et al., 1986). Também apresenta um papel tumoricida e tumorestático *in vitro* e *in vivo* (CARSWELL et al., 1975). O TNF- α atua como o principal mediador da resposta imune do hospedeiro às bactérias gram-negativas (WARZOCHA et al., 1995) e está envolvido diretamente na patogênese da caquexia (DINARELLO, 1991) e, em pacientes com câncer, de diferentes etiologias, observam-se concentrações séricas elevadas de TNF- α (COSKUN et al., 2003). Segundo alguns autores, altas concentrações de TNF- α leva a perda de massa e força muscular por sua ação catabólica (ROUBENOFF, 2003; PENNIX et al., 2004).

Dentre os mediadores lipídicos da inflamação, as prostaglandinas possuem papel de destaque (FERREIRA et al., 1978). A prostaglandina E₂ (PGE₂) é um dos principais produtos encontrados nos locais de inflamação e atua no fluxo sanguíneo, edema e dor (GIULIANO; WARNER, 2002). É produzida por muitos tipos celulares tais como, fibroblasto, macrófagos e neutrófilos (HARRIS et al., 2002) e regula a infiltração celular para o local inflamado (DENISON et al., 1998; SCANDELLA et al., 2015), atuando no controle do fluxo sanguíneo e dilatação dos vasos, essenciais para que ocorra a firme adesão celular e diapedese (WILLIAMS et al., 1977). As prostaglandinas são mediadores lipídicos gerados à partir do metabolismo de ácidos graxos que possuem 20 átomos de carbono e três, quatro ou cinco duplas ligações (SMITH et al., 1996), fazem parte de um grupo denominado genericamente

de eicosanóides, que englobam também as tromboxanas e leucotrienos (LARSEN; HENSON 1983).

Durante a inflamação, as PGE₂ promovem vasodilatação, iniciam o aumento da permeabilidade vascular causado pela histamina e bradicinina e, estão envolvidas no fenômeno da dor (MILLS et al., 1993; PORTANOVA et al., 1996; GERRITSEN, 1996) por aumentar a excitabilidade nas vias neuronais de transmissão da dor através da despolarização de neurônios da medula espinhal (BABA et al., 2001).

A síntese de prostaglandinas é desencadeada por estímulos físicos, químicos ou biológicos e é regulada por enzimas denominadas de prostaglandina endoperóxido sintetase ou ciclooxigenase (COX), com pelo menos duas isoformas descritas, COX-1 e COX-2 (MORITA et al., 1995). Estas enzimas metabolizam o ácido araquidônico que é produto da clivagem de fosfolípidios de membranas celulares pela ação da fosfolipase A₂ (DURSTIN et al., 1994). A COX-1 é expressa de forma constitutiva nas células e é responsável pela formação dos prostanóides em condições fisiológicas, manutenção da perfusão renal e tem um papel na proteção da mucosa gástrica contra ulceração. Por outro lado, a COX-2 é induzida por citocinas e fatores séricos durante a inflamação (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998) e está envolvida na regulação da diferenciação e crescimento celular (APPLETON et al., 1996) além de contribuir para o desenvolvimento de lesões crônicas (VANE et al., 1998). A descoberta da COX-2, assim como o estabelecimento de sua estrutura permitiu o desenvolvimento de inibidores seletivos desta enzima, denominados de COXIBs, com ação anti-inflamatória, mas com reduzida toxicidade gastrointestinal e renal (WANG; DUBOIS, 2010). No entanto, o uso dessa droga é restrito e deve-se ter cautela na administração em para pacientes que já possuem histórico de doenças cardiovasculares (MCADAM et al., 1999; NUSSMEIER et al., 2005).

Assim como as prostaglandinas, os leucotrienos (LTs) são mediadores lipídicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico (AA). Uma vez liberado, o AA presente na membrana celular, sob a forma esterificada é clivado pelas PLA_{2s} e metabolizado rapidamente pela 5-lipoxigenase (5-LO), a qual migra do citosol para o envelope nuclear e interage com a proteína ativadora da 5-LO (FLAP). Assim, a 5-LO insere oxigênio na molécula do AA, levando a formação do ácido hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE) e, posteriormente, à formação de LTA₄, que pode ser hidrolisado pela enzima LTA₄ hidrolase, formando o LTB₄ (ZSCHALER; ARNHOLD 2016).

O LTB₄ atua como um potente quimioatraente para leucócitos no início da reação inflamatória (AFONSO et al., 2012), estimula a expressão da integrina CD11b/CD18 na superfície de neutrófilos (VAN PELT et al., 1997) e monócitos (VADDI; NEWTON, 1994).

Além disso, é responsável pelo aumento da capacidade microbicida, fagocítica e de degranulação (CHEN et al., 2006a) e, atua de forma parácrina (KANNAN, 2002), estimula a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, amplificando a resposta inflamatória (CHOU et al., 2010).

Adicionalmente, outra função de neutrófilos foi relatada na literatura. A formação das redes extracelular de neutrófilos (NETs), ou seja, teias compostas de cromatina e de proteínas dos grânulos, formadas quando o neutrófilo é ativado proporcionando ao local de injúria altas concentrações de moléculas microbidas (BRINKMANN et al., 2004; BRINKMANN & ZYCHLINSKY, 2007).

Estas teias servem como armadilhas para prender e confinar microrganismos tais como *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Eimeria bovis*, *Eimeria arloingi*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi*, *Leishmania donovani* e *Leishmania major* (BAKER et al., 2008; GABRIEL et al., 2010; BEHRENDT et al., 2010; ABI ABDALLAH et al., 2011; GUIMARAES-COSTA et al., 2012), e atuam como barreira física (MCCORMICK et al., 2010) evitando assim a disseminação do microrganismo pelo organismo do hospedeiro. A NETose é um processo ativo de liberação de cromatina nuclear (BRINKMANN et al., 2004). Durante a ativação dos neutrófilos ocorre a migração da elastase para o núcleo, degradando parcialmente as histonas promovendo a descondensação da cromatina auxiliada pela mieloperoxidase (MPO), fenômeno considerado fundamental para formação das NETs (VILLANUEVA et al., 2011).

Apesar do seu papel benéfico, a formação exagerada de NETs está implicada em patologias, como disfunção em diversos órgãos que pode ser acompanhada de sepse (VAN DEN BERG; REITSMA, 2011; SAFFARZADEH et al., 2012; VILLANUEVA et al., 2011) e, recentemente, a liberação de redes de neutrófilos foram associadas à metástase hepática (COOLS-LARTIGUE et al., 2013).

Atualmente não existe nenhum estudo mostrando o efeito da LAAO sobre a liberação de NETs por neutrófilos. Neste contexto, vale mencionar que os neutrófilos, devido às várias funções que desempenham, constituem importantes modelos experimentais para a investigação de ações pró-inflamatórias de toxinas de serpentes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi demonstrar o possível mecanismos de ação da L-aminoácido oxidase (LAAO) isolada do veneno da serpente *Calloselasma rhodostoma* sobre neutrófilos humanos por meio de ensaios *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro* e a participação da via de sinalização da p38 MAPK e PI3K,
2. Avaliar a liberação de espécies reativas do oxigênio,
3. Avaliar a capacidade fagocítica,
4. Avaliar a liberação de mieloperoxidase,
5. Avaliar a produção dos mediadores lipídicos PGE₂ e LTB₄,
6. Avaliar o perfil de citocinas liberadas (IL-6 e IL-8),
7. Avaliar a formação de NETs,
8. Avaliar a participação da phospho-p38 MAPK.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LAAO

A LAAO foi fornecida pelo Dr. Andreimar M. Soares do Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde (CEBio) da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ-Rondônia) e Universidade Federal de Rondônia (UNR). Até o momento de sua utilização a LAAO foi mantida a 4°C cujas autorizações para atividades com finalidade científica são: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio. Sistema de Autorização de Conservação da Biodiversidade- SISBIO IBAMA: 27131-2. CGEN nº 010627/2011-1.

3.2 ENSAIO DA ATIVIDADE DA L-AMINOÁCIDO OXIDASE

Este ensaio foi realizado, segundo Torii et al. (1997) com modificações, antes de cada experimento para verificação da atividade da enzima LAAO. Para tanto, foram utilizados 10 µg de toxina (0,01 mL) adicionados ao tampão de solução substrato, contendo: Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, L-leucina 5 mM, peroxidase (5 U/mL) e o- fenilenodiamina 2 mM. A reação foi interrompida utilizando uma solução de ácido cítrico a 10%. Em seguida, mediu-se a absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 490nm.

3.3 OBTENÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Os neutrófilos humanos foram obtidos pelo método de gradiente de densidade utilizando Hystopaque-1077[®] (PONTES et al., 2014). Para tanto, os neutrófilos humanos foram coletados de doadores sadios com idade entre 18 a 40 anos, excluídos os doadores que apresentavam qualquer tipo de infecção ou inflamação ou em processo de tratamento medicamentoso com antibióticos e anti-inflamatórios, segundo aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Medicina Tropical de Rondônia (CEP Número de protocolo 108/2010). Em seguida, foi realizada a assepsia local com algodão embebido em álcool 70% e o sangue coletado à vácuo em tubos heparinizados. Após a coleta, o sangue dos doadores foi diluído na proporção de 1/1(v/v) em tampão fosfato-salina (PBS, 14 mM; NaCl, 2 mM NaH₂PO₄H₂O 7mM) pH 7,4. Para a separação de leucócitos, adicionou-se Histopaque 1077[®] aos tubos e, logo após, o sangue diluído foi adicionado, cuidadosamente, sobre o

reagente. Após a centrifugação a 400xg por 30 minutos, os neutrófilos foram coletados da parte inferior do tubo, juntamente com as hemácias e transferidos para outro tubo. A lise de hemácia foi realizada com o tampão de lise (NH_4CL 0.15 M; KHCO_3 0,01 M; Na_2 EDTA 0.0001 M), homogeneizados e submetidos a uma temperatura de -8°C por 5 minutos, seguido de nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado e nova lise foi realizada e, o procedimento repetido por três vezes. Ao final, os neutrófilos foram lavados com PBS por três vezes. A seguir, uma alíquota de neutrófilos isolados foi usada para a determinação do número de neutrófilos totais em hemocitômetro de Neubauer, em microscópio de luz, após diluição (1:20, v/v) em líquido de Turk (cristal violeta 0,2% em ácido acético 30%). O grau de pureza dos neutrófilos ($> 95\%$) foi confirmado por características morfológicas e de coloração, em esfregaços celulares corados com kit de coloração Panótico (Newprov, BR) e por marcação com anticorpo anti-CD66b FITC para detecção por citometria de fluxo (MANNONI et al., 1982).

3.4 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR POR EXCLUSÃO DO AZUL DE TRIPAN

Os neutrófilos, obtidos como descrito no item 3.3, foram suspensos em meio de cultura RPMI, suplementado com gentamicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), L-glutamina (2mM) e 10% de soro fetal bovino, de modo a obter-se 2×10^5 células. A seguir, as células foram incubadas, em duplicata, com RPMI (controle negativo), Triton X100 (controle positivo), ou LAAO nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 12 horas, a 37°C , em atmosfera a 5% de CO_2 . Para o teste de viabilidade, 20 μL de solução de azul de Tripán (0,1%) foram adicionados a 100 μL de suspensão de neutrófilos. O índice de viabilidade foi determinado por contagem de células viáveis em hemocitômetro de Neubauer, ao microscópio de luz, num total de 100 células. Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao número total de células.

3.5 QUIMIOTAXIA EM PLACA *TRANSWELL*

A capacidade dos neutrófilos migrarem através de um filtro em resposta estímulos foi avaliada por meio da utilização de membrana de policarbonato (Transwell, Corning) com poro de 8 μm e diâmetro de 6,5 mm. Para isso, foram adicionados 200 μL contendo 1×10^6 neutrófilos na parte superior da membrana e, na parte inferior foram adicionados, RPMI (controle negativo) ou FMLP 500 ng/mL (controle positivo) (COOPER et al., 1995) ou

LAAO, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, na sua forma nativa e inativa. Após 3 horas, uma alíquota da parte inferior da placa foi utilizada para a determinação do número de neutrófilos em hemocítmetro de Neubauer, em microscópio de luz, após diluição (1:20, v/v) em líquido de Turk. O resultado foi expresso em números de células migradas/mL.

3.5.1 Modulação farmacológica da quimiotaxia

Para avaliar as diferentes vias de transdução de sinal envolvidos na quimiotaxia de neutrófilos, as células (1×10^6) foram tratadas com 500 nM de wortmanina, um inibidor da PI3K, durante 15 minutos (THELEN et al., 1994; CAPODICI et al., 1998;) ou, 15 µM de SB 202190, um inibidor da p38 MAK, durante 30 minutos (PUIGSERVER et al., 2001; LOKUTA; HUTTENLOCHER, 2005), antes da adição da LAAO em diferentes concentrações. As células do controle foram tratadas com a mesma concentração do veículo, no qual o inibidor foi diluído.

3.6 ATIVIDADE FAGOCÍTICA POR NEUTRÓFILOS HUMANOS

Para este ensaio, os neutrófilos foram isolados como descrito no item 3.3. Em seguida, as células foram suspensas em meio de cultura RPMI, de modo a obter-se (2×10^5) células. Posteriormente, os neutrófilos foram incubados com RPMI (controle negativo), LPS 1 µg/mL (controle positivo), PMA 500 ng/mL (controle positivo) ou LAAO, nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL, juntamente com partículas de zimosan (10 partículas por célula) por 3 horas, a 37°C, em atmosfera úmida a 5% de CO₂. Em seguida, os neutrófilos foram citocentrifugados e corados com panótico. Foram contados 100 células em cada lâmina e os neutrófilos que apresentaram duas ou mais partículas internalizados foram considerados positivos. Os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas para fagocitose.

3.7 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO POR NEUTRÓFILOS HUMANOS

Uma suspensão de neutrófilos (2×10^5) obtidas como descrito no item 3.3, e ressuspensas em solução de Hanks (CaCl₂ 1.26 mM; KCl 5.33 mM; KH₂PO₄ 0.44 mM; MgCl₂ 0.50 mM; MgSO₄ 0.41 mM; NaCl 138 mM; NaHCO₃ 4.0 mM; Na₂HPO₄ 0.30 mM; C₆H₁₂O₆ 5.60 mM, vermelho de fenol 0,03 mM) foram plaqueados em placas pretas

estéreis. Posteriormente, os neutrófilos foram incubados com Rotenona (10 μM), um inibidor de NADPH mitocondrial, por 90 minutos (HANDA et al., 2004). Após, foi adicionada a solução de Hanks (controle negativo), LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (controle positivo) ou LAAO, nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após 3 horas de incubação, 100 μL de uma solução contendo o fluoróforo DCFDA (10 μM), diluída em solução de Hanks, foi adicionado seguido de nova incubação por 30 minutos, a 37°C, ao abrigo da luz. A leitura foi realizada com excitação de 485 nm e emissão de 528 nm (NAKAJIMA et al., 2009).

3.8 LIBERAÇÃO DE MIELOPEROXIDASE

As células isoladas como descrito no item 3.3 foram suspensas em meio de cultura RPMI, de modo a obter-se 1×10^6 células. Posteriormente, os neutrófilos foram incubadas com RPMI (controle negativo), LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (controle positivo), PMA 500 ng/mL (controle positivo) ou LAAO, nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por 4 horas, a 37°C, em atmosfera úmida a 5% de CO_2 . Após esse período de incubação, a placa foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e a determinação dos níveis de mieloperoxidase foi realizado em microplaca, no qual 50 μL da amostra foi adicionado a 100 μL de TMB, que será oxidado na presença de mieloperoxidase (SUZUKI et al, 1983). A reação foi interrompida depois de 5 minutos com ácido sulfúrico 2 N e a absorbância foi determinada por espectrofotômetro 450 nm e, os resultados confrontados a uma curva padrão efetuados com a mieloperoxidase recombinante.

3.9 QUANTIFICAÇÃO DO MEDIADOR LIPÍDICO PGE_2 E LTB_4

A suspensão de neutrófilos humanos coletados como descrito no item 3.3, teve sua concentração ajustada para 2×10^5 células. Em seguida, os neutrófilos foram incubados com RPMI (controle negativo), PMA (controle positivo, 500 ng/mL) ou LAAO, nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por 1 hora. O sobrenadante dessas incubações foi analisado por ensaio imunoenzimático específico (EIA) para a determinação das concentrações de PGE_2 e de LTB_4 , utilizando Kit comercial (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Mi, USA). Em resumo, 100 μL das alíquotas de cada amostra foram incubadas com o eicosanóide conjugado a acetilcolinesterase e anti-soro específico de coelho, em placas de 96 poços, revestidas com anticorpos monoclonais de camundongos contra IgG de coelho. Após a adição do substrato, a

absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro (Biotek) a 420 nm e a concentração do eicosanóide foi estimado a partir de uma curva padrão específica e representada em pg/mL.

3.10 QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE INTERLEUCINA-8 (IL-8) E INTERLEUCINA -6 (IL-6)

A suspensão de neutrófilos humanos coletados como descrito no item 3.3 teve sua concentração ajustada para 2×10^5 células. Em seguida, os neutrófilos foram incubados em placas de 96 poços (2×10^5 células/50 μ L) com RPMI (controle negativo), PMA 500 ng/mL (controle positivo) ou LAAO, nas concentrações de 25, 50 e 100 μ g/mL, após 1 hora para IL-6 e, 3 horas para IL-8. Em seguida, a placa foi centrifugada a 600 g por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e a determinação dos níveis de IL-8 e IL-6 foram determinadas conforme descrito por Shumaker et al (1988). Em resumo, placas de 96 poços (NUNC-Maxisorp) foram sensibilizadas com 100 μ L de anticorpo de captura anti-IL-8 (4 μ g/mL) ou anti-IL-6 (2 μ g/mL), diluídos em PBS, e incubadas por 18 horas, a 37°C. Após esse período, a placa foi lavada com tampão de lavagem (0,05% de Tween 20 em PBS) e, os sítios livres, bloqueados com 200 μ L de tampão de bloqueio (0,05% de Tween 20 em PBS contendo 1% de BSA) por 1 hora. Após a incubação, a placa foi lavada e, as amostras e o padrão adicionados e incubados por 2 horas. Em seguida, a placa foi lavada e 100 μ L de anticorpo de detecção anti-IL-8 (20 ng/mL) ou IL-6 (200 ng/mL) adicionado e incubado a temperatura ambiente por 2 horas. Feita nova lavagem da placa e 100 μ L de estreptavidina conjugada a peroxidase foi adicionada seguida de incubação por 20 minutos, protegida da luz. Após esse período, a placa foi lavada e 100 μ L de substrato cromógeno TMB adicionado seguida de incubação por 20 minutos. Por fim, foi adicionado 50 μ L de ácido sulfúrico (2 N) para interromper a reação. A absorbância foi determinada por espectrofotômetro a 540 e 450 nm, subtraindo uma leitura da outra e os resultados confrontados a uma curva padrão efetuada com IL-8 recombinante (2000 a 31,25pg/mL) ou IL-6 recombinante (1000 a 15,62pg/mL), respectivamente. Os resultados foram expressos em picograms por mL.

3.11 QUANTIFICAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE NETs POR NEUTRÓFILOS HUMANOS

Para a determinação da liberação de NETs, os neutrófilos (2×10^5 células/100 μL) foram incubados com RPMI (controle negativo), PMA 500ng/mL (controle positivo) ou diferentes concentrações de LAAO (12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) por 1, 3 e 6 horas a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO_2 . Após a incubação, 50 μL amostra, 50 μL de tampão TE com EDTA e 100 μL de quanti-reagente (iodeto de propídio) foram adicionados em uma placa preta de 96 poços, específica para fluorescência, seguido de 15 minutos de incubação no escuro em temperatura ambiente. A fluorescência foi determinada em espectrofotômetro (excitação 528/20 nm e emissão 485/20 nm). A quantificação da liberação de NETs foi determinada através do kit picogreen dsDNA (Invitrogen). As concentrações de NETs foram calculadas utilizando-se DNA padrão. Os resultados foram expressos em ng/mL de DNA.

3.12 *IMUNOBLOTTING* PARA P38 MAP QUINASE

Os neutrófilos foram isolados como descrito no item 3.3. Posteriormente, foram suspensos em meio de cultura RPMI, de modo a obter-se 2×10^6 células. Em seguida, as células foram incubadas com RPMI (controle negativo), LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ (controle positivo), PMA 500 ng/mL (controle positivo) ou LAAO, nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, por 40 minutos, a 37°C, em atmosfera úmida a 5% de CO_2 . Após esse tempo, as células foram lisadas com tampão RIPA (30 μL) contendo inibidores de fosfatase e protease (Sigma Cocktail-1/100), homogeneizadas e congeladas. Os extratos celulares obtidos, conforme citado acima, foram submetidos à fervura a 100 °C com tampão de amostra (20 μL) por 10 minutos. As proteínas foram quantificadas pelo método do ácido bincinconínico (BCA), e as amostras 15 μL (20 μg), foram separadas em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE). Na corrida eletroforética uma corrente constante de 90 volts foi fixada e, entre 10-15°C, para evitar distorções das bandas, e, conseqüentemente, problemas de resolução. A fim de comparação, a cada corrida eletroforética foram colocados 5 μL do Padrão de Peso Molecular (10-230 kDa Biolabs). Foi utilizado o sistema de eletrotransferência que realiza a transferência das proteínas do gel de SDS-PAGE para a membrana adsorvente de PVDF, previamente hidratada em metanol 100%, por 2-3 segundos, seguido de água por 2-3 minutos e tampão de transferência por 5 minutos. Para a eletrotransferência, utilizou-se 100 volts de corrente por 90 minutos a 4° C. Após a transferência, as membranas foram submersas em solução bloqueadora (PBS Tween 0,1%, BSA 3%) por 2 horas e, posteriormente lavadas, com tampão de lavagem

(PBS-TWEEN 0,1%) por 4 vezes de 5 minutos cada. Para a detecção das proteínas p38 MAPK e phospho-p38 MAPK, as membranas foram incubadas com seus respectivos anticorpos primários (*Cell Signaling*) diluídos em tampão de bloqueio 1/1000 (v/v) por 18 horas, sob agitação branda. Antes de adicionar o anticorpo secundário (IgG de camundongo conjugado a peroxidase –Sigma), diluído em tampão de bloqueio 1/10.000, a membrana foi lavada 4 vezes de 5 minutos em (PBS-TWEEN 0,1%) e a membrana incubada por 2 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas novamente por 4 vezes de 5 minutos e, após essa etapa, foram submersas em 10 mL de solução contendo 3,3-diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio (*Fast Dab*). A reação foi interrompida com água destilada e secas em papel filtro.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

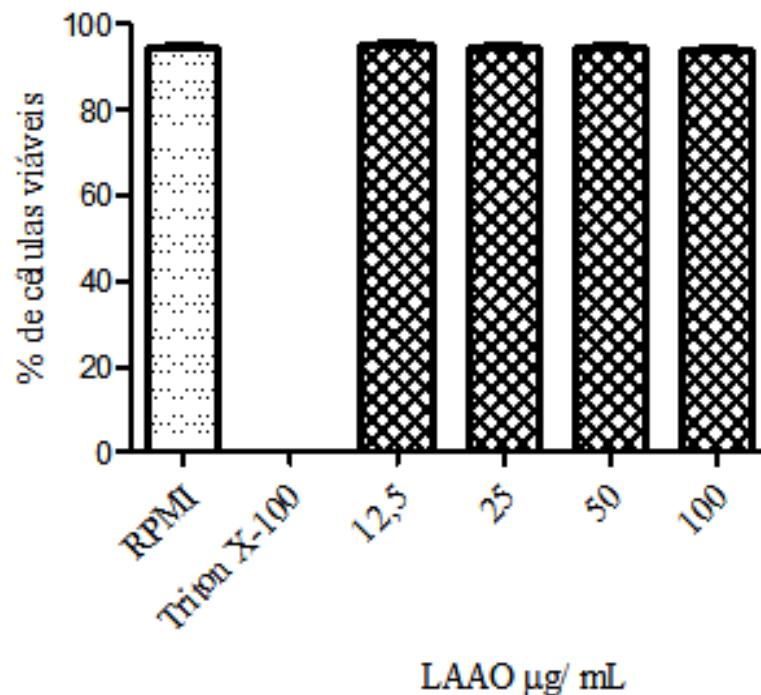
Os resultados obtidos foram expressos como média +/- erro padrão e analisados estatisticamente pelo teste “t” de Student ou Análise de variância (ANOVA), após teste de normalidade. Sendo considerados valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DA LAAO SOBRE A VIABILIDADE DE NEUTRÓFILOS HUMANOS.

A ação citotóxica da LAAO foi avaliada 12 horas após sua incubação com uma suspensão de neutrófilos humanos isolados. A figura 5 mostra que o Tritox X-100 (controle positivo) foi tóxico para os neutrófilos se comparado ao RPMI (controle negativo). Por outro lado, os neutrófilos quando foram incubados com a LAAO não apresentaram alteração da viabilidade celular no tempo e nas concentrações estudadas em relação ao RPMI (controle negativo), indicando uma baixa citotoxicidade da enzima sobre neutrófilos humanos.

Figura 5. Efeito da LAAO sobre a viabilidade de neutrófilos humanos.

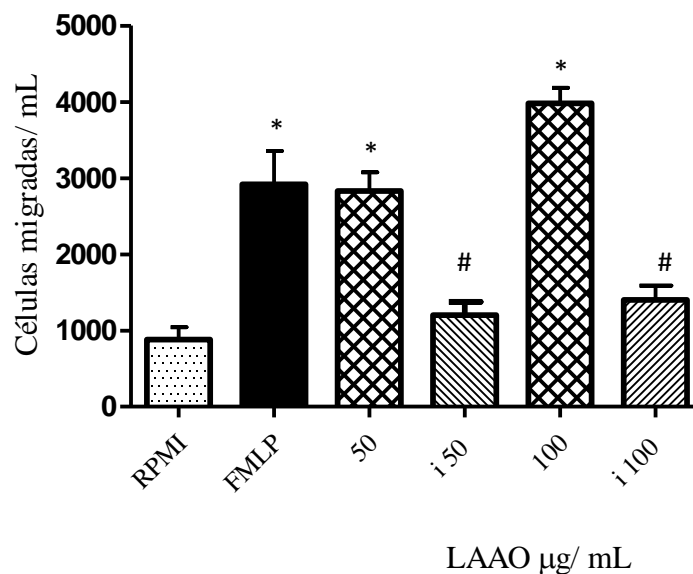


O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os neutrófilos isolados foram incubados com RPMI (controle), Triton X 100 (controle positivo) ou LAAO em diferentes concentrações, descritas acima, por um período de 12 horas. A viabilidade dos neutrófilos foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripan. Os dados representam a média \pm EPM de 4 voluntários independentes.

4.2 EFEITO DA LAAO SOBRE A QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS.

Para verificar a capacidade de migração dos neutrófilos humanos em placas *Transwell* de policarbonato (poros de 8 μm) foram realizados experimentos nos quais, no compartimento superior foram adicionados os neutrófilos e, no inferior, os estímulos: RPMI (controle negativo), fMLP 500 ng/mL (controle positivo) ou LAAO nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Como mostrado na figura 6, o número de células migradas para o compartimento inferior, após 3 horas de incubação, foi de 883.3 células/mL incubadas com RPMI, 2.919 células/mL incubadas com fMLP estatisticamente diferente das células incubadas com RPMI. O número de células migradas após o estímulo com a LAAO nativa foi de 2.833 células/mL e de 3.983 células/mL para as concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, estatisticamente diferentes dos neutrófilos incubados com LAAO na forma inativa. Os dados obtidos indicam que a LAAO estimula a quimiotaxia de neutrófilos humanos.

Figura 6: Efeito da LAAO sobre a quimiotaxia de neutrófilos humanos.



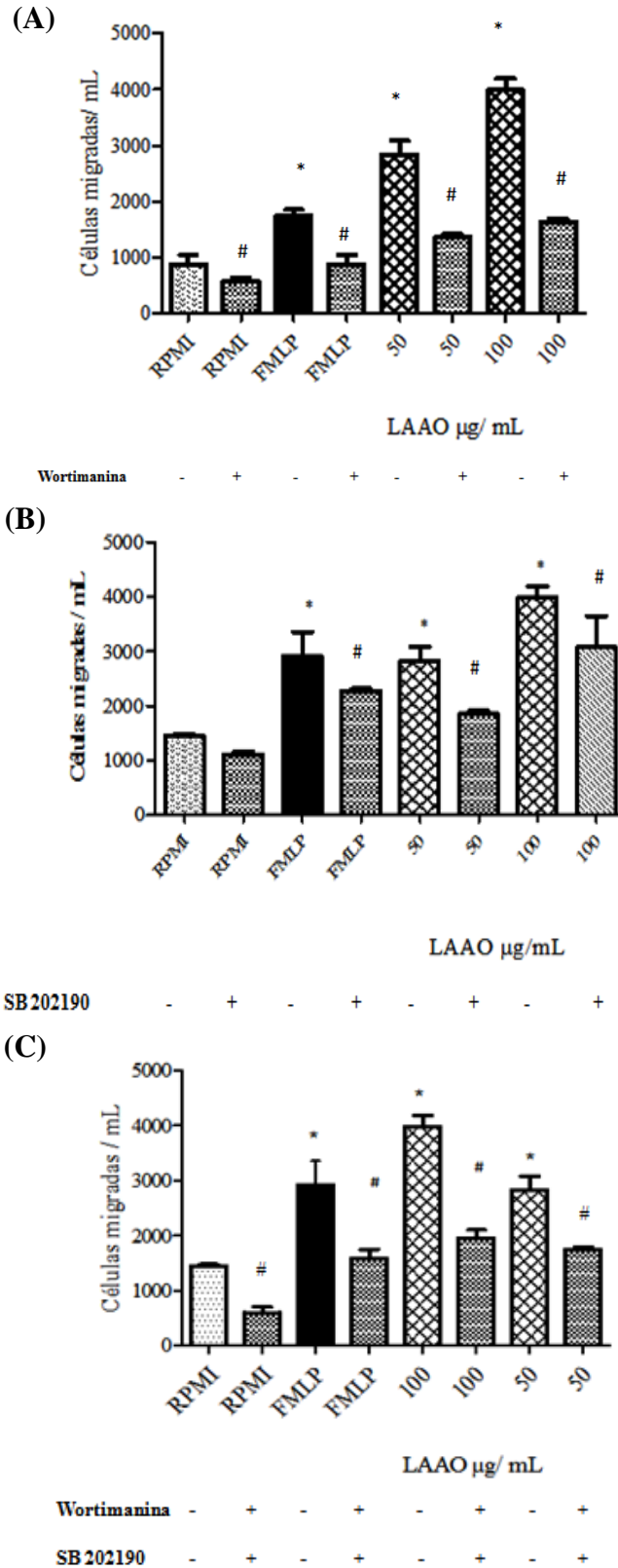
Os neutrófilos 1×10^6 , foram incubados com RPMI (controle negativo), fMLP 500 ng/mL (controle positivo) ou LAAO nativa e inativa (i) em diferentes concentrações (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) em placas *Transwell*. A quimiotaxia foi avaliada em câmara de Neubauer após 3 horas de incubação. Os dados representam a média + EPM de 5 voluntários independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle. # $p < 0,05$ em relação à LAAO nativa (ANOVA).

4.3 EFEITO DOS INIBIDORES WORTIMANINA E SB 202190 SOBRE A QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS INDUZIDAS PELA LAAO.

Para avaliar a participação da PI3K e da p38 MAPK na quimiotaxia, os neutrófilos foram previamente incubados com a Wortimanina ou SB 202190, inibidores específicos da PI3K e da p38 MAPK, respectivamente. As células foram mantidas por 15 minutos com Wortimanina e, por 30 minutos com SB 202190 e, posteriormente, estimulados com a LAAO por 3 horas. Paralelamente, foi realizado um co-tratamento com os mesmos inibidores. Conforme o gráfico abaixo 7 A a LAAO foi capaz de induzir a migração celular nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Adicionalmente, a Wortimanina (500 nM) utilizada para bloquear a via da PI3K mostrou efeito inibitório em todas as condições experimentais utilizadas, demonstrando assim seu papel fundamental na quimiotaxia induzida pela LAAO.

O SB 202190, inibidor da p38 MAPK, pode inibir todas as isoformas (α , β , γ e δ) de p38 MAPK tanto na forma constitutiva quanto fosforilada. Assim, após o tratamento farmacológico dos neutrófilos com o inibidor, constatou-se uma redução significativa na quimiotaxia dos neutrófilos em relação às células não tratadas. Isso demonstra que a LAAO é capaz de estimular a quimiotaxia dos neutrófilos mediada por esta via de sinalização.

Figura 7. Efeito dos inibidores de PI3K (Wortimanina) e p38 MAPK (SB 202190) sobre a quimiotaxia de neutrófilos.

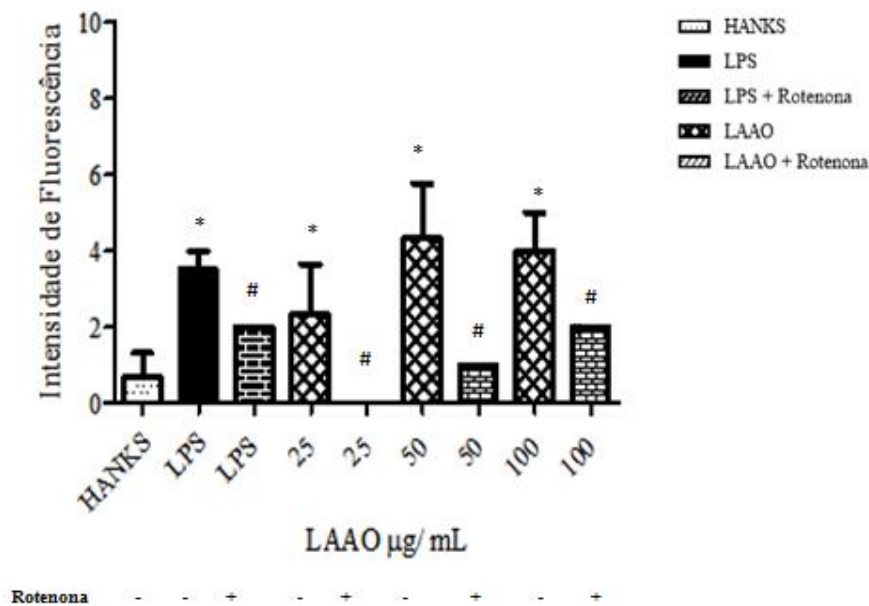


1×10^6 células foram pré incubadas por 15 minutos com Wortimanina (A) ou 30 minutos com SB 202190 (B) ou com o co-tratamento (C), seguido por 3 horas de incubação com a toxina nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, RPMI (controle) ou FMLP 500 ng/mL (controle positivo). A quimiotaxia foi avaliada em câmara de Neubauer. Os dados representam a média + EPM de 5 voluntários independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle. # $p < 0,05$ em relação aos neutrófilos incubados com o estímulo na ausência de inibidores (ANOVA).

4.4 EFEITO DA LAAO SOBRE A LIBERAÇÃO DE EROS

Para verificar a capacidade da LAAO em induzir, *in vitro*, a produção de EROS por neutrófilos humanos isolados, foram realizados experimentos com neutrófilos incubados com solução Hanks (controle negativo), LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (controle positivo) ou LAAO, em concentrações não citotóxicas. Ainda, avaliamos a via de produção de EROS por meio do tratamento farmacológico com um inibidor de NAPH mitocondrial, a qual bloqueia o complexo I da cadeia respiratória. Após tempo de incubação, com os estímulos, foi adicionado o corante DCF (H_2DCFDA não fluorescente), que é capaz de atravessar a célula e na presença de EROS é convertido a um corante fluorescente (H_2DCF) (SAUER et al., 2003). Como mostra a figura 8, a incubação dos neutrófilos, com Hanks, resultou na produção basal de EROS. Nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LAAO houve um aumento significativo da produção de EROS, indicando a capacidade da LAAO em induzir a formação de espécies reativas do oxigênio.

Figura 8. Efeito da LAAO sobre a produção de espécies reativas do oxigênio

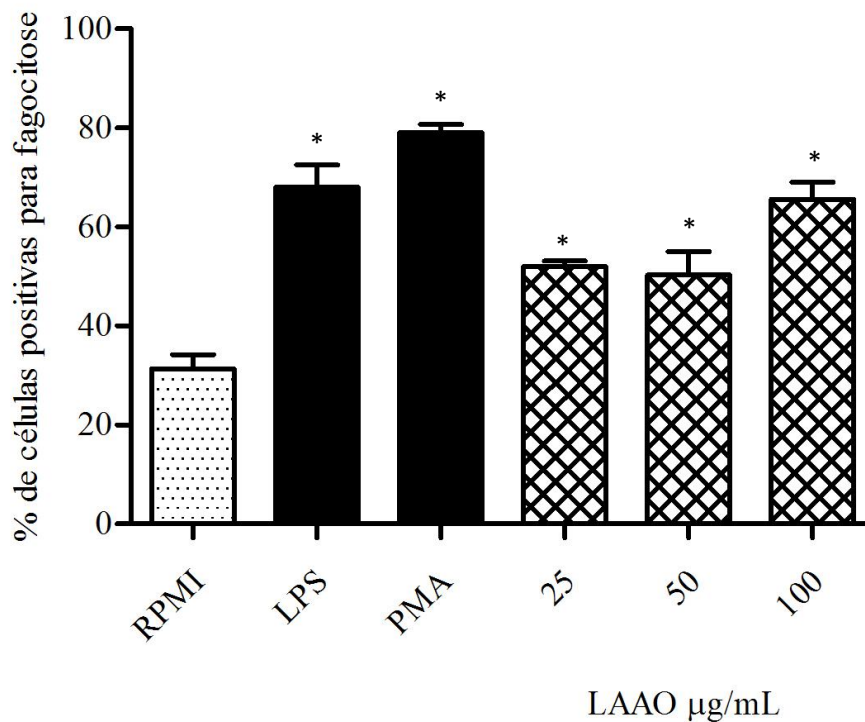


1×10^6 neutrófilos foram incubados com Rotenona 10 μM , por 90 minutos, seguido de incubação por 3 horas com Hanks (controle), LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (controle positivo) ou LAAO, em diferentes concentrações, a 37°C e 5% de CO_2 . A produção de EROS foi mensurada pela oxidação do fluoróforo DCF com excitação a 485nm e emissão a 528 nm. Os dados representam a média + EPM de 5 voluntários independentes. * $p < 0,05$ em relação ao HANKS e # $p < 0,05$ em relação os neutrófilos incubados com LAAO na ausência de Rotenona (ANOVA).

4.5 EFEITO DA LAAO SOBRE A FAGOCITOSE DE ZIMOSAN POR NEUTRÓFILOS HUMANOS.

Para avaliar a habilidade da LAAO sobre a capacidade fagocítica de partículas de zimosan por neutrófilos humanos isolados, 2×10^5 células foram incubadas com RPMI (controle negativo), LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (controle positivo), PMA 500 ng/mL (controle positivo) ou LAAO, em concentrações não citotóxicas. Como mostra a figura 9, a incubação dos neutrófilos, por 3 horas, com RPMI apresentou em média 31,6 % de fagocitose. Quando incubados com a LAAO, nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ houve um aumento significativo da fagocitose, quando comparado ao controle. Esses resultados indicam a capacidade da LAAO em acentuar a capacidade fagocítica dos neutrófilos humanos.

Figura 9. Efeito da LAAO sobre a fagocitose de zimosan por neutrófilos humanos.

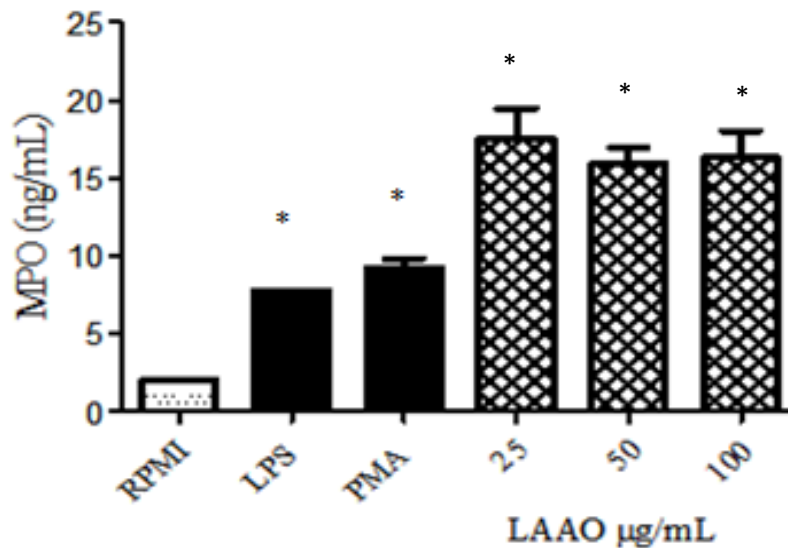


Os neutrófilos foram incubados com RPMI (controle negativo), LPS (controle positivo), PMA (controle positivo) ou concentrações não citotóxicas da LAAO, seguido de partículas de zimosan, a 37°C e 5% de CO_2 . Como mostra a figura 9, após 3 hora de incubação com a toxina, houve um aumento no índice de fagocitose, quando comparado ao controle. Os dados representam a média + EPM de 5n. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.6 EFEITO DA LAAO SOBRE A LIBERAÇÃO DE MIELOPEROXIDASE POR NEUTRÓFILOS HUMANOS.

Para avaliar a habilidade da LAAO em induzir a liberação de MPO, os neutrófilos foram incubados com RPMI (controle), LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (controle positivo), PMA 500 ng/mL (controle positivo) ou LAAO, em concentrações não citotóxicas. Como mostra a figura 10, a incubação dos neutrófilos, por 4 horas, com RPMI induziu uma discreta liberação de MPO, seguido de um aumento na liberação desta enzima quando incubados com PMA ou LPS. A incubação das células com LAAO induziu um marcante aumento de liberação de MPO no sobrenadante, estatisticamente diferente do controle negativo. Esses resultados evidenciam a habilidade da toxina em ativar os neutrófilos humanos a degranular e, conseqüentemente, a liberação de mieloperoxidase.

Figura 10. Efeito da LAAO sobre a liberação de MPO por neutrófilos humanos.

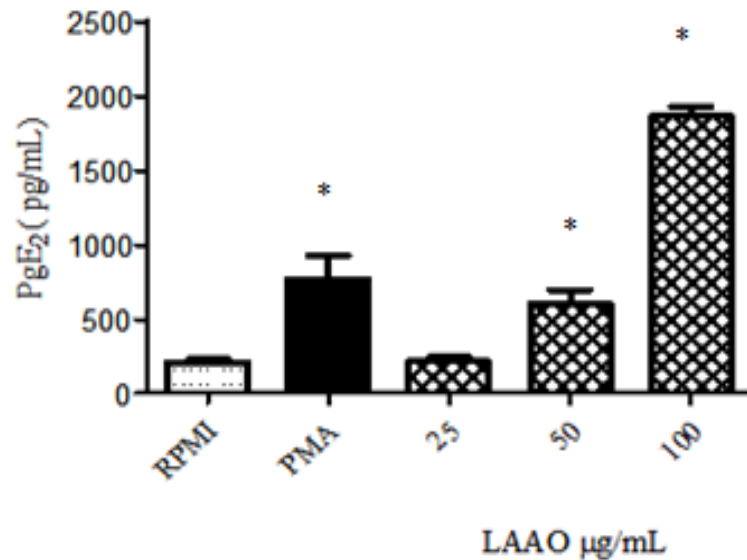


1×10^6 neutrófilos foram incubados por 4 horas com RPMI (controle), LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (controle positivo), PMA 500 ng/mL (controle positivo) ou LAAO, nas concentrações não tóxicas, a 37°C e 5% de CO_2 . A concentração de MPO foi obtida pela oxidação do peróxido dependente do TMB e determinado em espectrofotômetro a 450 nm. Os dados foram confrontados a uma curva padrão de MPO recombinante e representam a média \pm EPM de 5 voluntários independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.7 EFEITO DA LAAO SOBRE A PRODUÇÃO DE PGE₂ POR NEUTRÓFILOS HUMANOS.

Para avaliar a habilidade da LAAO em induzir a liberação de PGE₂ por neutrófilos humanos, foi mensurado a concentração desse mediador lipídico no sobrenadante de neutrófilos humanos incubados com RPMI (controle negativo), PMA 500 ng/mL (controle positivo) ou LAAO (25,50 e 100 µg/mL). A incubação das células com RPMI resultou na produção basal de 209,80 pg/mL de PGE₂. Quando as células foram incubadas com PMA, houve um aumento significativo na produção de PGE₂. Os neutrófilos incubados com a LAAO, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, por 1 hora, produziram níveis significantes de PGE₂ em comparação ao controle negativo, o RPMI. A figura 11 mostra que a PGE₂ tem um papel importante na ativação de neutrófilos induzida pela LAAO.

Figura 11. Efeito da LAAO sobre a produção de PGE₂ por neutrófilos humanos.

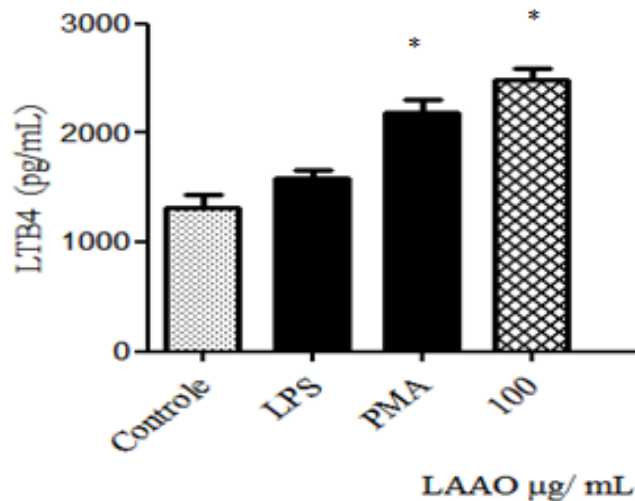


2x10⁵ neutrófilos foram incubados, por 1 hora, com RPMI (controle negativo), PMA 500 ng/mL (controle positivo) ou LAAO, em diferentes concentrações, a 37°C e 5% de CO₂. A concentração de PGE₂ foi determinada por ensaio imunoenzimático de competição. Os dados representam a média + EPM de 5 voluntários independentes. *p<0,05 em relação ao controle (ANOVA).

4.8 EFEITO DA LAAO SOBRE A PRODUÇÃO DE LTB₄ POR NEUTRÓFILOS HUMANOS

A capacidade da LAAO em induzir a produção de LTB₄ por neutrófilos humanos foi avaliada pela determinação da concentração desse mediador no sobrenadante de neutrófilos, incubados com a toxina na concentração de 100 µg/mL, RPMI (controle negativo), LPS (controle positivo) ou PMA (controle positivo). A figura 12 mostra que as células incubadas por 2 horas com a LAAO na concentração de 100 µg/mL induziu um aumento significativo desse mediador em comparação ao controle, sugerindo que o LTB₄ pode representar um importante mediador quimiotático para este mecanismo desencadeado pela ação da toxina sobre os neutrófilos.

Figura 12. Efeito da LAAO sobre a produção de LTB₄



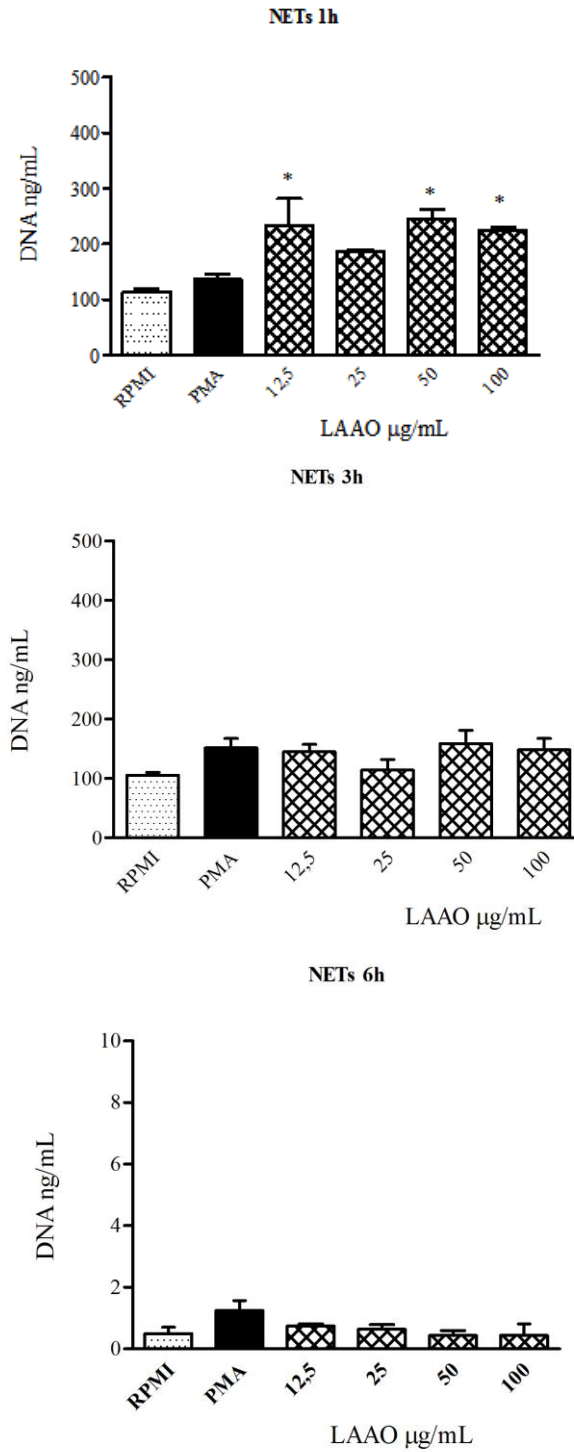
2×10^5 neutrófilos foram incubados, por 2 horas, com RPMI (controle negativo), LPS 1 µg/mL, PMA 500 ng/mL (controle positivo) ou LAAO, a 37°C e 5% de CO₂. A concentração de LTB₄ foi determinada por ensaio imunoenzimático de competição. Os dados representam a média + EPM de 5 voluntários independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.9 EFEITO DA LAAO SOBRE A LIBERAÇÃO DE NETs POR NEUTRÓFILOS HUMANOS.

Para avaliar a habilidade da LAAO em induzir a liberação de NETs, os neutrófilos foram incubados com RPMI (controle), PMA (controle positivo) ou concentrações não citotóxicas de LAAO. Como mostra a figura 13, após incubação por 1 hora com a toxina houve um aumento significativo da liberação de DNA, nas concentrações de 12,5, 50 e 100

$\mu\text{g/mL}$ comparada ao controle negativo e ao controle positivo. Esses resultados evidenciam a habilidade do LAAO em ativar os neutrófilos humanos e estimular a liberação de NETs.

Figura 13. Liberação de DNA por neutrófilos induzidos pela LAAO.

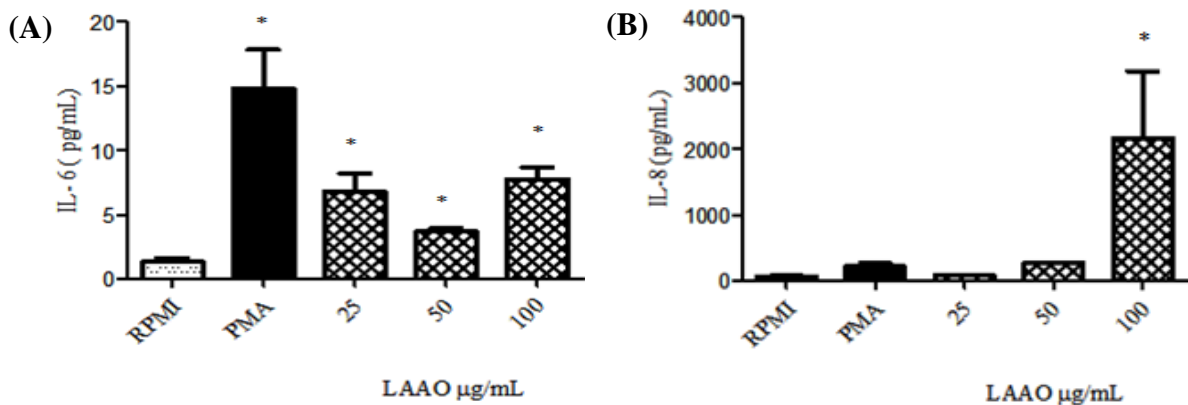


2×10^5 neutrófilos foram incubados com RPMI (controle), PMA (controle positivo) ou concentrações não citotóxicas da LAAO a 37°C e 5% de CO_2 . Após a incubação a liberação dos NETs foi determinada pelo Kit picogreen dsDNA. Os resultados foram confrontados a uma curva padrão de DNA. Os dados representam a média + EPM de 5 voluntários independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.10 EFEITO DA LAAO SOBRE A PRODUÇÃO DE INTERLEUCINA-8 (IL-8) E INTERLEUCINA -6 (IL-6) POR NEUTRÓFILOS HUMANOS.

Para avaliar a habilidade da LAAO em ativar neutrófilos e estimular a liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8, as células foram incubadas com RPMI (controle negativo), PMA 500 ng/mL (controle positivo) ou LAAO (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO_2 . A figura 14 A mostra que após 1 hora de incubação, os neutrófilos incubados com RPMI apresentaram uma média 1,3 pg/mL de IL-6. Quando as células foram incubadas com a LAAO nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ houve um aumento significativo desses níveis. A figura 14 “B” indica que na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de toxina houve aumento significante na liberação de IL-8 após 3 horas, por neutrófilos humanos quando comparados ao controle.

Figura 14. Efeito da LAAO sobre a produção de IL-6 e IL-8 por neutrófilos humanos.

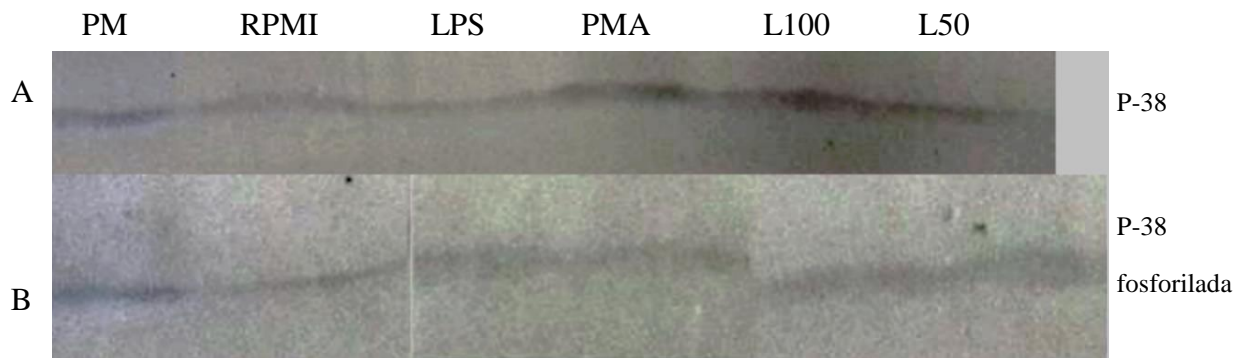


2×10^5 neutrófilos foram incubados por diferentes tempos com RPMI (controle), PMA 500 ng/mL (controle positivo) ou LAAO, nas concentrações 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, a 37°C e 5% de CO_2 . A concentração de IL-6 (A) e IL-8 (B) foram determinadas por ensaio imunoenzimático. Os dados representam a média + EPM de 5n. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.11 IMUNOBLOTTING PARA P38 MAP quinase

A capacidade da LAAO em ativar os neutrófilos, foi avaliada por *immunoblotting*. Para tanto, 2×10^6 células obtidas conforme descritas no item 3.3 foram incubadas com RPMI (controle negativo), PMA 500 ng/mL (controle positivo), LPS 1 μ g/mL (controle positivo) ou LAAO (50 e 100 μ g/mL), por 40 minutos. Como mostra a figura 15 A, as bandas imunorreativas mostram a expressão constitutiva de p38 MAPK em neutrófilos nas diferentes incubações. Na figura 15 B, as bandas imunorreativas mostram a expressão da forma fosforilada da p38 MAPK presente nos neutrófilos.

Figura 15. Immunoblotting para p38 MAPK constitutiva e fosforilada.



2×10^6 neutrófilos foram incubados por 40 minutos com RPMI (controle negativo), LPS 1 μ g/mL (controle positivo), PMA 500 ng/mL (controle positivo) ou LAAO, nas concentrações acima, a 37°C e 5% de CO₂. O extrato celular foi aplicado em gel de poliacrilamida 15% e, em seguida, eletrotransferido para uma membrana de PVDF. Após a interação das proteínas com seus respectivos anticorpos (p38 MAPK e phospho-p38 MAPK) a membrana foi revelada utilizando *Fast-DAB*.

5 DISCUSSÃO

As L-amino ácido oxidases são enzimas amplamente distribuídas em diferentes organismos, tais como bactérias (COUDERT, 1975; DUERRE; CHAKRABARTY, 1975), fungos (NIEDERMANN; LERCH 1990), algas verdes (VALLON et al., 1993), peixes (MURAKAWA et al., 2001), caracóis (OBARA et al., 1992), lesmas marinhas (BUTZKE et al., 2005; YANG et al., 2005), plantas (NISHIZAWA et al., 2005) e, nos venenos de uma variedade de serpentes (DU; CLEMETSON, 2002).

Estudos recentes realizados por Pontes et al. (2014) avaliaram a capacidade da LAAO, isolada de *Calloselasma rhodostoma*, em ativar neutrófilos humanos. Os autores evidenciaram que a LAAO, no ensaio de MTT, que analisa as desidrogenases mitocondriais de neutrófilos humanos, não afetou a viabilidade celular.

No presente estudo, avaliou-se a integridade de membrana celular do neutrófilo humano pelo ensaio de exclusão do corante azul de Tripán. Os resultados obtidos mostraram que a LAAO não afetou a viabilidade dos neutrófilos, corroborando os resultados anteriores. Nesse sentido, estudos realizados por IZIDORO et al. (2006) mostraram que a LAAO, isolada do veneno da serpente *Bothrops pirajai*, não é tóxica para macrófagos peritoneais murinos. Ainda, WEI et al. (2007) mostraram que a LAAO, isolada da serpente *Agkistrodon blomhoffii*, também não é tóxica para os monócitos e células T isoladas. Adicionalmente, VARGAS et al. (2013) mostraram que a LAAO, isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus cumanensis*, também não afetou a viabilidade celular da linhagem de mioblastos de camundongos (C₂C₁₂), na concentração de 40 µg/mL e, de mononucleares do sangue periférico (PBMC), até a concentração de 200 µg/mL.

No entanto diversos estudos mostram o efeito tóxico dessa enzima em bactérias, como descrito anteriormente por Skarnes et al. (1970) e, posteriormente por diversos autores Stiles et al. (1991); Stábeli et al. (2004); Izidoro et al. (2007); Vargas et al. (2013). Esse efeito parece estar relacionado ao peróxido de hidrogênio, produto secundário formado durante a reação química catalisada pelas LAAOs, pois a adição de catalase diminuiu significativamente o efeito bactericida (TAN ; FUNG, 2008).

Ainda, as LAAOs isoladas de venenos de serpentes têm demonstrado exercer um papel importante na toxicidade sobre diferentes linhagens de células tumorais. Diversos estudos apontam o seu papel citotóxico frente a diversas células cancerígenas, as quais apresentam um perfil apoptótico após a incubação com a toxina, efeito esse parcialmente atribuído ao H₂O₂, gerado durante a reação enzimática (ANDE et al., 2006; SAMEL et al.,

2008; VIEIRA SANTOS et al., 2008; PAIVA et al., 2011). Adicionalmente, estudos realizados por Suhr e Kim (1996) mostraram, claramente, a ligação direta da LAAO, marcada com FITC, na superfície de células de leucemia linfocítica de camundongo (L1210) e, posteriormente, a morte celular. A literatura mostra que os motivos glicanos presentes nas LAAOs, são capazes de interagir com as células, levando a uma possível ativação ou morte celular (KOMMOJU et al., 2007; HUGHES 2010). Além disso, o fato de a LAAO não demonstrar ser tóxica para os neutrófilos humanos, pode ser atribuído a mecanismo anti-oxidantes próprios das células de defesa, como superóxido dismutase e catalase (CHESON et al., 1976).

É conhecido que os neutrófilos desempenham um papel central no processo inflamatório. Após a migração, por entre as células endoteliais, os neutrófilos são atraídos por meio de um gradiente de mediadores quimiotáticos (KOLACZKOWSKA 2010;) tais como, compostos formilados (fMLP), fatores derivados da parede bacteriana (LPS), fragmentos do sistema complemento (C5a) e citocinas (BOKOCH, 1995), que são capazes de conduzir o movimento destas células através de um gradiente de concentração (DITTMAR et al., 2000). A movimentação nos tecidos é atribuída à extensão de pseudópodo que impulsiona o neutrófilo em direção ao gradiente de quimiotraente. O pseudópodo é constituído por uma rede ramificada de actina e miosina, que se associam e dissociam em um mecanismo rápido, com a finalidade de expandir e contrair o pseudópodo (SULLIVAN; MANDELL 1983).

Com base nesse conhecimento, foi avaliada a capacidade da LAAO em induzir a migração dos neutrófilos humanos por meio de um filtro de polycarbonato. Dentre os mediadores quimiotáticos, o fMLP atua via receptor para fMLP, ativando proteínas Gq e induzindo a migração (EBRAHIMZADEH et al., 2000), em um processo regulado por duas MAP kinases; ERK e p38 (LIU et al., 2012). Os resultados mostraram que a LAAO, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, se comparada aos controles (negativo, RPMI e positivo, fMLP) foi capaz de estimular a quimiotaxia de neutrófilos humanos para o compartimento inferior da placa *transwell*, no período de 3 horas. Uma vez que a LAAO de *Calloselasma rhodostoma* estimula os neutrófilos a liberar citocinas pró inflamatórias como TNF- α (PONTES et al., 2014) e, esta citocina regula positivamente a expressão de moléculas de adesão, principalmente CD11b na superfície de neutrófilos via p38 MAPK (LOKUTA; HUTTENLOCHER, 2005), pode-se inferir que a LAAO exerça um papel indireto na quimiotaxia celular. No entanto, não há dados na literatura que mostrem o papel da LAAO na quimiotaxia de neutrófilos ou na migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de animais de experimentação, sendo esta a primeira descrição.

Sabendo que a LAAO possui atividade intrínseca de produção de peróxido de hidrogênio e este é permeável a membrana celular, podemos sugerir que de alguma forma o peróxido de hidrogênio atue ativando os neutrófilos, regulando a extensão dos pseudópodos, bem como o direcionamento e a orientação celular (HATTORI et al., 2010). Nesse sentido, evidências recentes apontam que o peróxido de hidrogênio controla a migração direcionada mediando o recrutamento dos leucócitos para o sítio inflamatório (NIETHAMMER et al., 2009), muito embora KLYUBIN e colaboradores (1996) fossem os primeiros a propor que o peróxido de hidrogênio atue como quimioatraente nos leucócitos.

Para avaliar a via envolvida na quimiotaxia dos neutrófilos, foram utilizados os inibidores de PI3K (Wortimanina) e de p38 MAPK (SB202190). A Wortimanina é um metabólito fúngico, permeável a célula, descoberto em 1987 e, tem sido muito utilizada para o estudo da via de PI3K em diversos processos (CAPODICI et al., 1998). Os resultados obtidos mostraram que houve uma redução significativa no número de células migradas na presença de Wortimanina, indicando a participação desta quinase na cascata de sinalização desencadeada pela toxina. A p38 MAPK está envolvida na sinalização celular durante os processos inflamatórios, bem como na indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8, assim como no recrutamento de neutrófilos para o local inflamatório (XU et al., 2013). De acordo com nossos resultados, a p38 MAPK está envolvida na quimiotaxia dos neutrófilos induzida pela LAAO, uma vez que o tratamento com SB 202190, um inibidor de p38 MAPK, reduziu significativamente a quimiotaxia. Posteriormente, foi realizado o co-tratamento com os inibidores, no intuito de averiguar um sinergismo das duas vias. Os resultados obtidos apontam para uma significativa redução na migração de neutrófilos na vigência do co-tratamento.

As EROS podem ser derivados de duas fontes, tais como via metabolismo mitocondrial (MURPHY, 2011) ou via ativação da NADPH oxidase (BEDARD; KRAUSE, 2007). O peróxido de hidrogênio, uma das EROS liberada por neutrófilos, é particularmente estável, possui uma meia vida de 20 segundos (BARNARD; MATALON, 1992) difundindo-se rapidamente (BIENERT et al., 2006).

Pontes e colaboradores (2014) mostraram, inicialmente, que a LAAO, *per se*, nas concentrações de 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$, não produziu peróxido de hidrogênio dentro dos padrões estabelecidos pela curva de peróxido de hidrogênio, na ausência de neutrófilos. Por outro lado, quando foi incubada na presença das células, neutrófilos humanos isolados, ocorreu uma grande produção de peróxido de hidrogênio, indicando que a LAAO é capaz de estimular os

neutrófilos a produzir peróxido de hidrogênio. O mecanismo pelo qual a LAAO estimula a produção de peróxido de hidrogênio não foi esclarecido.

Assim, foram conduzidos experimentos no intuito de se verificar se a LAAO induz a geração de EROs por um mecanismo independente da NADPH oxidase, através da mitocôndria (STARKOV; FISKUM, 2003), uma vez que a avaliação da produção da EROSs pela via mitocondrial é importante pelo fato dessa organela está envolvida nos processos de sobrevivência e morte celular, bem como nos danos teciduais por isquemia e reperfusão, sendo também a principal organela responsável pela formação de espécies reativas de oxigênio intracelular (SZEWCZYK ; WOJTCZAK, 2002) Nesse sentido foi utilizada Rotenona, inibidor que atua via NADH mitocondrial, e inibe a transferência de elétrons do complexo I da cadeia respiratória (BEAL, 2001). Os resultados mostraram que a LAAO, em todas as concentrações estudadas, foi capaz de estimular os neutrófilos a produzir espécies reativas do oxigênio e, na presença do inibidor, houve um declínio parcial na produção do mesmo, indicando uma possível participação de outra via de oxidação, a NADPH oxidase. Estudos adicionais estão em andamento para caracterizar melhor a via de produção do peróxido de hidrogênio.

Os neutrófilos atuam através da fagocitose para a eliminação de um agente lesivo, e para isso, essas células são dotadas de capacidade de reconhecer, internalizar e eliminar os patógenos (ALLEN; ADEREM, 1996). Além dos microorganismos, a retirada de células apoptóticas ocorre por fagocitose, sendo este um mecanismo importante para a resolução da inflamação e manutenção da homeostase (WITKO-SARSAT et al., 2000). A geração e liberação de EROS durante a fagocitose é um mecanismo crucial para a destruição dos agentes patológicos invasores (DALE et al., 2008). Para que a fagocitose ocorra, é necessário que o neutrófilo reconheça o seu ligante e, em seguida, mude sua conformação celular, para uma forma mais achatada, aumentando sua área de contato com a partícula. Assim, no presente estudo avaliou-se a capacidade da LAAO em estimular a fagocitose de zimosan por neutrófilos humanos. Os resultados demonstram que a LAAO nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL foi capaz de acentuar a capacidade fagocítica dos neutrófilos. Não há dados na literatura que suportem estes achados, sendo esta a primeira descrição.

A mieloperoxidase (MPO) é uma hemoproteína muito abundante em neutrófilos e é liberada no meio extracelular após a ativação celular (WITKO-SARSAT et al., 2000). Na presença de H₂O₂, a MPO catalisa a oxidação do íon cloreto a ácido hipocloroso (HOCl), é responsável pela alcalinização do vacúolo fagocítico durante o “burst” respiratório (BORREGAARD, 1988), essencial na atividade microbicida (SEGAL et al., 1982). Dados

recentes mostraram que a LAAO, isolada de *Calloselasma rhodostoma*, induziu a liberação de IL-8, bem como a produção de ROS (PONTES et al., 2014) e, a literatura documenta que citocinas e ROS estimulam a liberação de MPO (ARIMURA et al., 1993) assim, avaliou-se a presença de MPO no sobrenadante da cultura de neutrófilos humanos isolados e incubados com a LAAO. Os resultados mostraram que a LAAO induziu a liberação de MPO em todas as concentrações utilizadas sugerindo que esta enzima induz a degranulação dos neutrófilos humanos. Não há dados na literatura que suportem estes achados, sendo também a primeira descrição.

A MPO, assim como, os ROS são requeridos para a formação de NETs (VILLANUEVA et al., 2011; PARKER et al., 2012), estruturas compostas de histonas, grânulos citoplasmáticos, que formam uma extensa rede, podendo dessa forma, imobilizar microorganismos invasores (VILLANUEVA et al., 2011). Além desses mediadores inflamatórios, a IL-8, o LPS e o PMA também podem desencadear a liberação de NETs (SAFFARZADEH et al., 2012). Nesse sentido, para complementar os estudos da ação da LAAO sobre a funcionalidade de neutrófilos avaliou-se a capacidade desta enzima em estimular a liberação de NETs. Os resultados mostraram que após 1 hora de incubação, a LAAO foi capaz de estimular os neutrófilos humanos a liberar DNA.

Essas redes de neutrófilos, NETs, também referidas como armadilhas extracelulares dos neutrófilos, constituem alvo importante de estudos atualmente. Em uma recente revisão, os autores descrevem que a liberação de NETs representa um mecanismo de defesa do hospedeiro fisiológico específico e ativo ou simplesmente uma consequência da ruptura celular devido a toxinas ou trauma. Ainda, os autores relatam dois tipos diferentes de mecanismo pelos quais os NETs podem ser formados, um mecanismo de morte lítica chamado de NETosis suicida que ocorre após estímulo com PMA, ativando a proteína quianse C (PKC) e a via da MAPK, especialmente ERK, com contribuição da NADPH oxidase e MPO. O outro mecanismo, no qual as células se encontram viáveis, é referido como NETosis vital. Neste, o processo está associado ao reconhecimento dos padrões moleculares de patógenos, em particular o LPS, por receptores de reconhecimento de padrões, o qual não envolve a lise do neutrófilo e envolve o TLR4 (YIPP; KUBES, 2013). No caso do presente estudo, até o momento, não há dados na literatura que mostrem o efeito de venenos de serpentes ou de toxinas isoladas, como é o caso da LAAO, na formação de redes de neutrófilos, NETs, sendo esta a primeira abordagem. Porém, correlacionando os dados da literatura e os dados presentemente obtidos, podemos sugerir os NETs formados na presença

de LAAO não são provenientes de morte celular, uma vez que as células encontram-se viáveis, na presença da enzima, até 12 horas de incubação.

As citocinas são mediadores importantes da resposta inflamatória, dentre elas, podemos citar: as interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) medeiam importantes eventos inflamatórios. A IL-6 é secretada por neutrófilos humanos (PROOST et al., 1996) e apresenta ações pró- e anti-inflamatórias (JOHNSON et al., 1998). Dentre as ações da IL-6 podemos destacar seu envolvimento no início e manutenção da inflamação facilitando o tráfico dos neutrófilos para o sítio inflamatório e consequente estímulo para produção de mediadores inflamatórios como citocinas, prostaglandinas, espécies reativas do oxigênio e proteases (FIELDING et al., 2008; WOODFIN et al., 2010).

Desse modo, a participação da IL-6 na ação da LAAO sobre a funcionalidade de neutrófilos foi avaliada. Os resultados obtidos mostraram que a LAAO, isolada de *Calloselasma rhodostoma*, foi capaz de induzir a produção de IL-6, na concentração de 100 µg/mL, 1 hora após sua incubação. Os dados obtidos corroboram os resultados de Wei et al. (2007), na qual a LAAO de *Agkistrodon blomhoffii* induziu a liberação de IL-6 por monócitos humanos isolados. No desempenho de suas funções, os neutrófilos são capazes de produzir e liberar citocinas pró-inflamatórias, como IL-8, IL-1, IL-6 e TNF- α , as quais são capazes de conduzir a resposta inflamatória, no sentido de orientar e direcionar células para áreas de inflamação. O acúmulo de células inflamatórias em determinados tecidos ou organismos é uma característica importante, sendo relatada em diversas patologias, como: aterosclerose, doenças pulmonares, renais e infarto agudo do miocárdio (ALVAREZ et al., 2001). Ainda, os neutrófilos podem secretar outras citocinas como a MIP-1 α e MIP-1 β , que são potentes quimiotáticos para monócitos e células T (KASAMA et al., 1993), e atuarem em conjunto com outras células inflamatórias no sentido de ampliar a resposta celular.

Outra citocina importante e que está envolvida em processos inflamatórios é a IL-8. Esta citocina medeia a quimiotaxia de neutrófilos, pois induz a polarização dos neutrófilos na direção do sítio inflamatório por meio de um gradiente de quimioatrativos (HENKELS et al., 2011). Assim, com o intuito de compreender o mecanismo pelo qual a LAAO induz a quimiotaxia de neutrófilos e a formação de NETs, os neutrófilos foram incubados com a LAAO e a concentração de IL-8 foi determinada. Os resultados obtidos mostraram que a LAAO, foi capaz de induzir a produção de IL-8, na concentração de 100 µg/mL, 3 horas após sua incubação. Corroborando os dados obtidos, estão os de PONTES et al. (2014), na qual a LAAO de *Calloselasma rhodostoma* induziu a liberação de IL-8 por neutrófilos humanos isolados, 12 horas após a incubação. É importante salientar que uma vez que a LAAO induziu

a liberação de IL-8 assim como a produção de EROS e a literatura documenta que tanto as citocinas como as EROS induzem a quimiotaxia e a liberação de NETs é possível sugerir que a IL-8 e as EROS, encontradas no presente estudo, contribuam para o fenômeno da quimiotaxia dos neutrófilos assim como para a liberação de NETs pela LAAO.

Durante o processo inflamatório, a via de produção de mediadores lipídicos é ativada por cálcio e dependente de citocinas pró-inflamatórias (KOROTKOVA; JAKOBSSON, 2014). Estudos apontam que a expressão de PGE-1m é induzida por IL-1 β e TNF- α (KOJIMA et al., 2005), e atualmente, SCANDELLA et al. 2015), demonstraram que a PGE₂ atua na migração de células dendríticas, por induzir a expressão de receptores CCR7 na superfície de sua membrana. Por outro lado, estudos *in vivo*, mostram que fármacos inibidores de ciclooxigenase-2 (COX-2), diminuem o recrutamento de leucócitos (MENEZES et al., 2005). Essa enzima, a COX-2, é expressa em resposta a estímulos inflamatórios e mitogênicos, e assim contribui para a formação das prostaglandinas associadas à resposta inflamatória (GRANGEIRO et al., 2008). A COX-2 é responsável pelo processo de oxigenação e ciclização do ácido araquidônico em um intermediário endoperóxido instável, denominado prostaglandina G₂ (PGG₂). A seguir, a PGG₂ sofre uma redução pela COX em PGH₂ e, esta é reduzida a diversas prostaglandinas (PGE₂, PGD₂, PGF₂) ou tromboxano A₂ (TXA₂) (MONCADA et al., 1987). A isomerização do endoperóxido PGH₂ em PGE₂ é catalisada por três diferentes PGE sintetase: a PGE sintetase citossólica (PGESc) e duas PGE sintetases ligadas à membrana (PGES-1m e PGES-2m) (JAKOBSSON et al., 1999; PETTERSSON et al., 2005).

Uma vez que a literatura mostra que a IL-1 e a IL-8 induzem o aumento da expressão de COX-2 (DORSAM ; GUTKIND 2007; MALONEY et al., 1998; SMITH et al., 1996) e LAAO induz a liberação de IL-8 (PONTES et al., 2014) é possível sugerir que essa quimiocina, possa contribuir com o processo de sinalização para induzir a expressão da COX-2 estimulando a liberação PGE₂. Desse modo, foram realizados experimentos para verificar o efeito da LAAO na produção de PGE₂ por neutrófilos humanos. Após 1 hora de incubação, a toxina estimulou significativamente os neutrófilos a produzir PGE₂ em comparação ao controle negativo e ao controle positivo. Esse resultado sugere que a LAAO é capaz de estimular a expressão de COX-2. Não há dados na literatura, até o momento que mostrem o efeito da LAAO sobre a produção de PGE₂, por neutrófilos humanos isolados, sendo esta também a primeira descrição.

É importante mencionar que durante estímulos patológicos e/ou fisiológicos, o ácido araquidônico (AA) das membranas celulares é clivado pelas fosfolipases A₂ (PLA₂). Esse AA

é metabolizado pelas cicloxigenases, que dependendo do estímulo, a ação pode ser realizada pela ciclooxigenase 1 (COX-1, constitutivamente ativa) ciclooxigenase 2 (COX-2, induzida) ou 5-lipoxigenase (5-LO) (YU et al., 2008). As ciclooxigenases levam a conversão do AA em PGE₂, que possui ação pró- e antiinflamatória, e também regulam múltiplas funções de diferentes células do sistema imunológico (KALINSKI, 2012).

O produto da 5-LO, o leucotrieno B₄ (LTB₄), é um potente mediador lipídico que desempenha um papel fundamental no início da reação inflamatória, uma vez que o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório é dependente de 5-LO (CHEN et al., 2006a). Nesse sentido, com o intuito de caracterizar o mecanismo pelo qual a LAAO induz quimiotaxia de neutrófilos, avaliou-se a liberação desse mediador. A LAAO induziu significativamente a liberação do LTB₄, sugerindo que este mediador está envolvido na quimiotaxia de neutrófilos induzida por essa toxina.

Uma vez que a literatura mostra que o LTB₄ estimula o aumento da capacidade microbicida, fagocítica e de degranulação de neutrófilos (CHEN et al., 2006a) é possível inferir que este mediador esteja envolvida no aumento da fagocitose de partículas de zimosan por neutrófilos induzido pelo Cr-LAAO e, na degranulação de neutrófilos, liberando MPO. Além disso, é conhecido que o LTB₄ estimula a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, amplificando a resposta inflamatória (CHOU et al., 2010). Diante disso, uma vez que a LAAO induz a liberação de IL-8 (PONTES et al., 2014) e de IL-6 é possível sugerir que esse mediador, possa contribuir com o processo de sinalização para induzir a liberação dessas citocinas.

A fosforilação de proteínas representa um papel fundamental na sinalização intracelular. As MAPK constituem uma via de sinalização importante para os eventos de ativação celular. E, a p38 MAPK, um dos constituintes desta via de ativação, um papel importante na quimiotaxia celular (CARA et al., 2015) Nesse sentido foi realizado um estudo de *immunoblotting* da p38 MAPK, no intuito de avaliar a capacidade da LAAO em induzir a fosforilação dessa proteína quinase. Os resultados mostraram que a LAAO induziu a fosforilação da p38 MAPK sugerindo que esta via de sinalização é importante para transdução de sinal para a quimiotaxia de neutrófilos. Ainda, é importante salientar que a fosforilação da p38 MAPK é desencadeada por produtos do estresse oxidativo (GUO; YANG, 2006) e por citocinas pró-inflamatórias como, TNF- α , IL-8 e IL-1 (XU et al., 2013) que atuam como uma intrincada rede de mediadores, regulando a liberação de outros mediadores, como a IL-6, bem como na sinalização intracelular, que favorece a resposta inflamatória no intuito de eliminar o agente lesivo (NICK et al., 2000).

Uma característica peculiar das LAAOs isoladas de venenos de serpentes é a glicosilação, a qual é responsável pela orientação desta enzima na superfície de diferentes tipos celulares (SUHR; KIM 1996). Li et al. (2008) relatam que a LAAO isolada do veneno da serpente *Naja atra*, na concentração de 15 µg/mL, é capaz de se ligar a plaquetas humanas e causar sua agregação. Contudo, ao utilizar H₂O₂ exógeno, esse efeito não foi observado. Adicionalmente, os resultados obtidos por Ande et al. (2006) mostraram que a LAAO de *Calloselasma rhodostoma* causa apoptose em células Jurkat, no entanto, a deglicosilação da LAAO, reduziu significativamente a sua citotoxicidade sobre este tipo celular.

Em conclusão, os dados alcançados mostraram a capacidade da LAAO de *Calloselasma rhodostoma* em estimular a funcionalidade dos neutrófilos humanos. A LAAO induziu em neutrófilos a liberação de EROS e a de mediadores inflamatórios tais como IL-6, IL-8, PGE₂, LTB₄, MPO. Aumento da fagocitose, além de estimular a quimiotaxia de neutrófilos humanos isolados, liberação de NETs e fosforilação da p38 MAPK. Este estudo permitiu uma melhor compreensão do mecanismo de ação da LAAO sobre neutrófilos, possibilitando novas perspectivas para sua utilização como modelo molecular no estudo de processos fisiopatológicos e/ou para o desenvolvimento de novos fármacos com aplicações terapêuticas.

6 CONCLUSÕES

- A LAAO não afeta a viabilidade dos neutrófilos em todas as concentrações estudadas durante o período de 12 horas.
- A LAAO estimula a migração dos neutrófilos nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, durante o tempo de 3 horas.
- A migração induzida pela LAAO é reduzida na presença dos inibidores de p38 MAPK (SB 202190) e PI3K (Wortimanina).
- A LAAO estimula a fagocitose de zymosan.
- A LAAO estimula a produção de espécies reativas do oxigênio por neutrófilos humanos.
- A LAAO de *Calloselasma rhodostoma* exerce uma ação sobre neutrófilos humanos induzindo a liberação de IL-6, IL-8, PGE₂, MPO e mediadores lipídicos: LTB₄ e PGE₂.
- A LAAO estimula a liberação de NETS, no período de 1 hora.
- A LAAO é capaz de induzir a fosforilação da p38 MAPK em neutrófilos humanos.

REFERÊNCIAS

- ABI ABDALLAH, D. S.; LIN C.; BALL, C. J.; KING, M. R.; DUHAMEL, G. E.; DENKERS, E. Y. *Toxoplasma gondii* triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. **Infect Immun.**, v. 80, p. 768–777, 2011.
- ABO, A.; WEBB, M.R.; GROGAN, A.; SEGAL, A.W. Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. **Biochem J.**, v. 298, p. 585–591, 1994.
- AFONSO, P.V.; JUNTILA, M.J.; LEE, Y.J.; McCANN, C.P.; OLIVER, C.M.; AAMER, K.A.; LOSERT, W.; CICERONE, M.T.; PARENT, C.A. LTB₄ Is a Signal-Relay Molecule during Neutrophil Chemotaxis. **Developmental Cell.**, v. 22, p. 1079-1091, 2012.
- AHN, M.Y.; LEE, B.M.; KIM, Y.S. Characterization and Cytotoxicity of L-Amino Acid Oxidase from the Venom of King Cobra (*Ophiophagus hannah*) **Int J Biochem Cell Bid.**, v. 29, p. 911-919, 1997.
- ALI, S.A.; STOEVA, S.; ABBASI, A.; ALAM, J.M.; KAYED, R.; FAIGLE, M.; NEUMEISTER, B.; VOELTER, W. Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. **Arc Biochem Biophys.**, v. 384, p. 216–226, 2000.
- ALLEN, L.A.; ADEREM, A. Mechanisms of phagocytosis. **Current Opinion Immunology.**, v.8, p. 36-40, 1996.
- ALVAREZ, A.; PIQUERAS, L.; BELLO, R.; CANET, A.; MORENO, L.; KUBES, P.; SANZ, M.J. Angiotensin II is involved in nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase inhibition-induced leukocyte–endothelial cell interactions in vivo. **Br J Pharmacol.**, v. 132, p. 677–684, 2001.
- ALVES, R.M.; ANTONUCCI, G.A.; PAIVA, H.H.; CINTRA, A.C.O.; FRANCO, J.J.; MENDONÇA-FRANQUEIRO, E.P.; DORTA, D.J.; GIGLIO, J.R.; ROSA, J.C.; FULY, A.L.; DIAS-BARUFFI, M.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A.**, v. 151, p. 542–550, 2008.
- AMAR, J.; FAUVEL, J.; DROUET, L.; RUIDAVETS, J.B. Interleukin 6 is associated with subclinical atherosclerosis: a link with soluble intercellular adhesion molecule 1. **Journal of Hypertension.**, 2006.
- 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.**, v. 11, p. 1439–1451, 2006.
- APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; WILLOUGHBY, D.A. Induction of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. **Adv Pharmacol.**, v. 35, p. 27-79, 1996.

ARIMURA, Y.; MINOSHIMA, S.; KAMIYA, Y.; TANAKA, U.; NAKABAYASHI, K.; KITAMOTO, K.; NAGASAWA, T.; SASAKI, T.; SUZUKI, K. Serum myeloperoxidase and serum cytokines in anti-myeloperoxidase antibody-associated glomerulonephritis. **Europe Pubmed Central.**, 1993.

BABA, H.; KOHNO, T.; MOORE, K.A.; Direct activation of rat spinal dorsal horn neurons by prostaglandin E₂. **J Neurosci.**, v. 21, n.5, 2001.

BABIOR, B. M. NADPH Oxidase: an update. **Blood.**, v. 93, p. 1464-76, 1999.

BAKER, V. S.; IMADE, G. E.; MOLTA, N. B.; TAWDE, P.; PAM, S. D.; OBADOFIN, M. O.; SAGAY, S.A., EGAH, D.Z.; IYA, D.; AFOLABI, B.B.; BAKER, M.; FORD, K.; FORD, R. ROUX, K.H.; KELLER, T.C. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. **Malar. J.**, v. 7, p. 41, 2008.

BALDRIDGE, C.W.; GERARD, R.W. The extra respiration of phagocytosis. **Am J Physiol.**, v. 103, p. 235–236, 1933.

BARDOEL, B, W.; KENNY, E.F.; SOLLBERGER, G.; ZYCHLINSKY, A. The Balancing Act of Neutrophils. **Cell Host & Microbe.**, v. 15, 2014.

BARNARD, M.L.; MATALON, S. Mechanisms of extracellular reactive oxygen species injury to the pulmonary microvasculature. **Journal of Applied Physiology Published.**, v. 72, p. 1724-1729, 1992.

BEAL, M.F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nature reviews neuroscience.**, v. 2, p. 325-332, 2001.

BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. **Physiol Rev.**, 87: 245–313, 2007.

BEHRENDT, J. H.; RUIZ, A.; ZAHNER, H.; TAUBERT, A.; HERMOSILLA, C. Neutrophil extracellular trap formation as innate immune reactions against the apicomplexan parasite *Eimeria bovis*. **Vet Immunol Immunopathol.**, v. 133, p. 1–8, 2010.

BELISARIO, M.A.; TAFURI, S.; DI DOMENICO, C.; SQUILLACIOTI, C.; DELLA MORTE, R.; LUCISANO, A.; STAIANO, N. H₂O₂ activity on platelet adhesion to fibrinogen and protein tyrosine phosphorylation. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1495, p. 183–193, 2000.

BIENERT, G.P.; SCHJOERRING, J.K.; JAHN, T.P. Membrane transport of hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1758, p. 994–1003, 2006.

BIFFL, W.L.; MOORE, E.E.; MOORE, F.A.; BARNETT, C.C.; CARL, V.S.; PETERSON, V.M. Interleukin-6 Delays Neutrophil Apoptosis. **Arch Surg.**, v. 131, p. 24-30, 1996.

BOKOCH, G. M. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. **Blood.**, v. 86, p. 1649-1660, 1995.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity.**, v. 33, 2010.

- BORREGAARD, N. The human neutrophil. Function and dysfunction. **Eur J Haematol.**, v. 41, p. 401-413, 1988.
- BORREGAARD, N.; LOLLIIKE, K.; KJELDTSEN, L.; SENGELOV, H.; BASTHOLM, L.; NIELSEN, MH. Human neutrophil granules e secretory vesicles. **European Journal of Haematology.**, v. 4, p. 187-98, 1993.
- BORREGAARD, N.; SORENSEN, O.E.; THEILGAARD-MONCH, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends in immunology.**, Oxford. v. 8, p. 340-45, 2007.
- BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science.** v. 303 p. 1532-1535, 2004.
- BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Beneficial suicide: Why neutrophils die to make NETs. **Nat Rev Microbiol.**, v. 5, p. 577–582, 2007.
- BURIN, S.M.; GHISLA, S.; OUCHIDA, A.T.; AISSA, A.F.; COELHO, M.G.B.; COSTA, T.R.; MARSOLA, A.P.Z.C.; SIMÕES, B.P.; ANTUNES, L.M.G.; CURTI, C.; SAMPAIO, S.V.; CASTRO, F.A. CR-LAAO antileukemic effect against Bcr-Abl⁺ cells is mediated by apoptosis and hydrogen peroxide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 309-320, 2016.
- BUTZKE, D.; HURWITZ, R.; THIEDE, B.; GOEDERT, S.; RUDEL T. Cloning and biochemical characterization of APIT, a new l-amino acid oxidase from *Aplysia punctata*. **Toxicon**, **46: 479-89, 2005.**
- CABRERA-VERA, T. M.; VANHAUWE, J.; THOMAS, T.O.; MEDKOVA, M.; PREININGER, A.; MAZZONI, M. R.; HAMM, H.E. Insights into G Protein Structure, Function, and Regulation. **Endocrine Reviews.**, v. 24, p. 765–781, 2003.
- CAPODICI, C.; HANFT,S.; FEOKTISTOV, M.; PILLINGER, M.H. Phosphatidylinositol 3 – Kinase Mediates Chemoattractant-Stimulated, CD11b/CD18- Dependent Cell-Cell Adhesion of Human Neutrophils: Evidence for an ERK-Independent Pathway. **J immunol.**, v. 160, p. 1901-1909, 1998.
- CARA, D. C.; KAUR, J.; FORSTER, M.; McCAFFERTY, D.; KUBES, P. Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Chemokine-Induced Emigration and Chemotaxis *In Vivo*. **The Journal of Immunology.**, v. 167, p. 6552–6558, 2015.
- CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR.**, v. 75, p. 50-83, 2011.
- CARLO, D.I.; FORNI, G.; LOLLINI, P.; COLOMBO, M. P.; MODESTI, A.; MUSIANI, P. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. **Blood**, p. 2- 97, 2001.
- CARSWELL, E.A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 72, p. 3666–3670, 1975.

CARVALHO, W.A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos. **Rev Bras Anesthesiol.**, v. 48, p. 137–158, 1998.

CASSATELLA, M.A. The neutrophil – An emerging regulator of inflammatory and immune response. **Kager.**, 2003.

CHAE, C.U.; LEE, R.T.; RIFAI, N.; RIDKER, P.M. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. **Hypertension** - Am Heart Assoc., 2001.

CHALY, Y.V.; SELVAN, R.S.; FEGEDING, K.V.; KOLESNIKOVA, T.S.; VOITENOK, N.N. Expression of IL-8 Gene in Human Monocytes and Lymphocytes: Differential Regulation By TNF and IL-1, **Cytokine.**, v. 12, p. 636 -646, 2000.

CHEN, M.; LAM, B.K.; KANAOKA, Y.; NIGROVIC, P.A.; AUDOLY, L.P.; AUSTEN, K.F.; LEE, D.M. Neutrophil-derived leukotriene B₄ is required for inflammatory arthritis. **J. Exp. Med.**, 837-842, 2006a.

CHEN, X.; LI, P.; LIU, J.; XU, K. Apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell (HepG2) induced by cardiotoxin III through S-phase arrest. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 61, p. 307–315, 2009.

CHESON, B.D.; CHRISTENSEN, R.L.; SPERLING, R.; KOHLER, B.E.; BABIOR, B.M. The origin of the chemiluminescence of phagocytosing granulocytes. **The Journal of Clinical Investigation.** 1976.

CHIPPAUX, J.P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bulletin of the World Health Organization.** v. 76, p. 515-524. 1998.

CHOU, R.C.; KIM, N.D.; SADIK, C.D.; SEUNG, E.; LAN, Y.; BYRNE, M.H.; HARIBABU, B.; IWAKURA, Y.; LUSTER, A.D. Lipid-cytokine-chemokine cascade drive neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis. **Immunity.**, 33,266-278, 2010.

CISCOTTO, P.; MACHADO DE AVILA, R.A.; COELHO, E.A.; OLIVEIRA, J.; DINIZ, C.G.; FARIAS, L.M.; DE CARVALHO, M.A.; MARIA, W.S.; SANCHEZ, E.F.; BORGES, A.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon.**, 53, 330–341, 2009.

COOLS-LARTIGUE, J.; SPICER, J.; MCDONALD, B.; GOWING, S.; B.; CHOW, G.; GIANNIAS, B.; BOURDEAU, F.; KUBES, P.; LORENZO FERRI, L. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. **J Clin Invest.** v. 123, p. 3446–3458, 2013.

COOPER, D.; LINDBERG, F.P.; GAMBLE, J.R.; BROWN, E.J.; VADAS, M.A. Transendothelial migration of neutrophils involves integrin-associated protein (CD47). **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 92, 3978-3982, 1995.

- COSKUN, U.; GUNEL, N.; ONUK, E.; YILMAZ, E.; BAYRAM, O.; YAMAC, D.; CIHAN, A.; UCAN, B.; YILDIRIM, Y.; CELENKOGLU, G.; OZKAN, S. Effect of different neoadjuvant chemotherapy regimens on locally advanced breast cancer. **Neoplasma.**, v. 50, p. 210–216, 2003.
- COSTA, T.A.F.; DANTAS, R.T.; TOYAMA, M.H.; DIZ FILHO, E.; ZARA, F.J.; RODRIGUES DE QUEIROZ, M.G.; PINTO NOGUEIRA, N.A.; OLIVEIRA, R. M.; TOYAMA, O.D.; MONTEIRO, H.S.; MARTINS, A.M. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. **Toxicon.**, 55, 795-804, 2010.
- COSTA, T.R.; BURIN, S.M.; MENALDO, D.L.; DE CASTRO, F.A.; SAMPAIO S.V. SAMPAIO. Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects, **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v. 20, p. 23, 2014.
- COUDERT, M. Characterization and physiological function of a soluble L-amino acid oxidase in *Corynebacterium*. **Archives of Microbiology.**, v. 102, p. 151-3, 1975.
- CUENDA, A.; ROUSSEAU, S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. **Biochim Biophys Acta**, 1773(8):1358-75, 2007.
- CURTI, B.; RONCHI, S.; SIMONETTA, M. P. Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes. **Muller, F., Ed.** V. 3, p 69–94, 1992.
- DALE, D.C.; BOXER, L.; LILES, W.C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood.** 112, 2008.
- DAMIANO, V.V.; KUCICH, U.; MURER, E.; LAUDENSLAGER, N.; WEINBAUM, G. Ultrastructural quantitation of peroxidase-elastase containing in human neutrophils. **The American Journal of Pathology.** v. 13, p. 235-45, 1998.
- DE KOK, A.; RAWITCH, A. B. Studies on L-amino acid oxidase. II. Dissociation and characterization of its subunits. **Biochemistry.** v. 8, p. 1405–1411, 1969.
- DELCLAUX, C.; DELACOURT, C.; D'ORTHO, M. P. ; BOYER, V.; LAFUMA, C.; HARF, A.; LAFUMA, C.; HARF, A. Role of Gelatinase B and Elastase in Human Polymorphonuclear Neutrophil Migration across Basement Membrane. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** v. 14, 1996.
- DENISON, F.C.; CALDER, A.A.; KELLY, R.W. The action of prostaglandin E₂ on the human cervix: Stimulation of interleukin 8 and inhibition of secretory leukocyte protease inhibitor. **Am J Obstet Gynecol** 3, v.180, 1998.
- DEVALARAJA, M. N.; RICHMOND, A. Multiple chemotactic factors: Fine control or redundancy? **TRENDS PHARMACOL. SCI.**, 20, P. 151–156, 1999.
- DIACOVICH, L.; GOVEL, P.; Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. **Elsevier.**, 8, 2010.
- DINARELLO, C.A. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. **J. Infect. Dis.**, v. 163, p. 1177-84, 1991.

DIPIETRANTONIO, A.M.; HSIEH, T.; WU, J.M. Activation of caspase 3 in HL-60 cells exposed to hydrogen peroxide. **Biochemical and Biophysical Research Communications.**, v. 255, p. 477-482, 1999.

DITTMAR, T.; BRANDT, B.H.; LANG, K.; ZAENKER, K.S.; ENTSCHLADEN, F. Lessons from tumor and immunocompetent cells the quantitative engagement of ligand-receptor interactions modulates stop-and-go behaviour as well as proliferation. **Medicina.**, 2000.

DORSAM, R.T.; GUTKIND, J.S. G-protein-coupled receptors and cancer. **Nat Rev Cancer.** 7:79–94, 2007.

DOWNEN, M.; ZHAO, M.L.; LEE, P.; WEIDENHEIN, K.M.; DICKSON, D.W.; LEE, S.C. Neuronal nitric oxide synthase expression in developing and adult human CNS. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 58, p. 12-21, 1999

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

DUERRE, J. A. ; CHAKRABARTY, S. L-amino acid oxidases of *Proteus rettgeri*, **J Bacteriol** 121, 656-63, 1975.

DURSTIN, M.; DURSTIN, S.; MOLSKI, T.F.; BECKER, E.L.; SHA'AFI, R.I. Cytoplasmic phospholipase A2 translocates to membrane fraction in human neutrophils activated by stimuli that phosphorylate mitogen-activated protein kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 91:3142–3146; 1994.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.**, Rio de Janeiro, v.39, p.343-350, 2003.

EBRAHIMZADEH, P.R.; HOGFORS, C.; BRAIDE. Neutrophil chemotaxis in moving gradients of fMLP. **Journal of Leukocyte Biology.** 67 no. 5 651-661, 2000.

ESTROV, Z.; KURZROCK, R.; TALPAZ, M. Interleukin-1 and its inhibitors: Implications for disease biology and therapy. **Cancer Treatment and Research** 80, pp 51-82, 1995.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection.**, 5 , 1317–1327, 2003.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M.; CASTRO, M.S.A. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E₂. **Prostaglandins.** 16, 31-37, 1978.

FIELDING, C.A.; MCLOUGHLIN, R.M.; MCLEOD, L, CHANTAL, S.C.; NAJDOVSKA, M.; GRAIL, D.; MATTHIAS, E.; JONES, S.A.; TOPLEY, N.; JENKINS, B. IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. **J Immunol.**, 2008.

FINDRIK, Z.; GEUEKE, B.; HUMMEL, W.; VASIC- RACKI, D. Modelling of l-DOPA enzymatic oxidation catalyzed by l-amino acid oxidases from *Crotalus adamanteus* and *Rhodococcus opacus*. **Biochemical Engineering Journal.**, 27 (2006) 275–286, 2006.

FLANNAGAN, R. S.; COSÍO, G.; GRINSTEIN, S.; Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. **Nature Reviews**, v.7, 2009.

FORTE, W.N. *Imunologia Básica e Aplicada. Artmed.*, 2004.

FOURET, P.; DU BOIS, R.M.; BERNAUDIN, J.F.; TAKAHASHI, H.; FERRANS, V.J.; CRYSTAL, R.G. Expression of the neutrophil elastase gene during human bone marrow cell differentiation. **J Exp Med.**, 169:833-845, 1989.

FRANÇA, S.C., KASHIMA, S., ROBERTO, P.G., MARINS, M., TICLI, F.K., PEREIRA, J.O., ASTOLFI-FILHO, S., STÁBELI, R.G., MAGRO, A.J., FONTES, M.R., SAMPAIO, S.V., SOARES, A.M. Molecular approaches for structural characterization of *Bothrops moojeni* L-amino acid oxidase with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. **Biochem. Biophys. Res. Commun** 355, 302-306, 2007.

FUTOSI, K.; FODOR, S.; MÓCSAI, A. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. **International Immunopharmacology.**, 17 1185–1197, 2013.

GABRIEL, W.C.; MCMASTER, R.; GIRARD, D.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania donovani* Promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. **J Immunol.**, 2010.

GAMBARDELLA, L.; VERMEREN, S. Molecular players in neutrophil chemotaxis—focus on PI3K and small GTPases. **Journal of Leukocyte Biolog.**, 2013.

GAMBLE, J.R. ; HARLAN, J.M.; KLEBANOFF, S.J.; VADAS, M.A. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. **PROC NATL. ACAD. SCI. USA.**, 82 :8667, 1985.

GAWAZ, M.; BRAND, K.; DICKFELD, T.; POGATSA-MURRAY, G.; PAGE, S. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. **Atherosclerosis.**, 2000.

GERRITSEN, M.E. Physiological and Pathophysiological roles of eicosanoids in microcirculation. **Cardiov. Res.**, 32, 720-723, 1996

GEYER, A.; FITZPATRICK, T.B.; PAWELEK, P.D.; KITZING, K.; VRIELINK, A.; GHISLA, S.; MACHEROUX, P. Structure and characterization of the glycan moiety of L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **Eur J Biochem.**, 268:4044-53, 2001.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annu Rev Immunol.**, v. 16, n., p. 225- 260, 1998.

GIULIANO, F.; WARNER, T.D. Origins of prostaglandin E2: involvements of cyclooxygenase COX-1 and COX-2 in human and rat systems. **J. pharmacol. Exp. Ther.**, 303, 1001-1006, 2002.

GLOYD, H.K.; CONANT, R. Snakes of the Agkistrodon Complex: A monographic review. **Society for the study of reptiles and amphibians.** 1990.

GOEBELER, M.; GILLITZER, R., KILIAN, K.; UTZEL, K.; BRÖCKER, E.V.; RAPP, U.R.; LUDWIG, S. Multiple signaling pathways regulate nf- κ b-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells. **Blood.**, v. 97, n. 1, p. 46-55, 2001.

GRANGEIRO ,N.M.G.C.; CHAVES, H.V.; SILVA, A.A.R.; GRAÇA, J.R.V.; LIMA, V.; BEZERRA, M.M: Cyclooxygenase 1 and 2 enzymes: inflammation, gastric and cardio protection. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica.**, 3, 14–18, 2008.

GUILLARD, C.; CHRETIEN ,S.; PELUS, A.S.; PORTEU, F.; MULLER, O.; MAYEUX, P.; DUPREZ, V. Activation of the Mitogen-activated Protein Kinases Erk1/2 by Erythropoietin Receptor via a Gi Protein -Subunit-initiated Pathway. **JBC Papers in Press.**, 21, 2003.

GUAN, Z.; BUCKMAN, S.Y.; MILLER, B.W.; SPRINGER, L.D.; MORRISON, A.R. Interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH2-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells. **J Biol Chem.**, Oct 30;273(44):28670-6, 1998.

GUIMARAES-COSTA, A.B.; NASCIMENTO, M.T.C.; WARDINI, A.B.; PINTO DA-SILVA, L.H.; SARAIVA, E.M. ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. **Review Article. J Parasitol Res.**, 2012.

GUO, C.; LIU, S.; YAO, Y.; ZHANG,Q.; SUN, M. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. **Toxicon.**, 60, 302–311, 2012.

GUO, C.; LIU, S; DONG, P.; ZHAO, D.; WANG, C.; TAO, Z.; SUN, M.Z.; Akbu-LAAO exhibits potent anti-tumor activity to HepG2 cells partially through produced H₂O₂ via TGF- β signal pathway. **Sci Rep.**, 5. 18215, 2015.

GUO, Y.L.; YANG, B. Altered Cell Adhesion and Cell Viability in a p38 α Mitogen-Activated Protein Kinase-Deficient Mouse Embryonic Stem Cell Line. **Stem cells and development.**, 15:655–664 2006.

HAGER, M.; COWLAND, J.B.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules in health and disease. **Journal of internal medicine.**, 268(1)p,25-34, 2010.

HAMMOND,M.E.; LAPOINTE,G.R.; FEUCHT, P.H.; HILT, S.; GALLEGOS, C.A.; GORDON, C.A.; GIEDLIN, M.A .; MULLENBACH,G.; TEKAMP-OLSON, P. IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. **J Immunol.**, 1995.

HANDA, O.; NAITO,Y.; TAKAGI,T.; SHIMOZAWA,M.; KOKURA,S.; YOSHIDA,N.; M, HIROFUMI.; H,MATSUI.; C, GEDIMINAS.; KVIETYS,P.R AND YOSHIKAWA, T. Tumor Necrosis Factor- Induced Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant-1 (CINC-1) Production by Rat Gastric Epithelial Cells: Role of Reactive Oxygen Species and Nuclear Factor-B. **The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics.**, 2004.

HARRIS, S.G.; PADILLA,J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R.P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends immunol.**, 3, 144-150, 2002.

HATTORI, H.; SUBRAMANIAN, K. K.; SAKAI, J.; LUO, H.R. Reactive oxygen species as signaling molecules in neutrophil chemotaxis. **Communicative & Integrative Biology**, 33, 278-281. 2010.

HAYNES, C.L.; KIM, D. Neutrophil Chemotaxis within a Competing Gradient of Chemoattractants. **Analytical Chemistry**, 2012.

HENKELS, K. M.; FRONDORF, K. GONZALEZ-MEJIA, M.E.; DOSEFF, A.L; GOMEZ-CAMBRONERO, J. IL-8-induced neutrophil chemotaxis is mediated by Janus kinase 3 (JAK3). **Febs Letters**, 2011.

HUGHES, A.L. Origin and diversification of the L-amino acid oxidase Family in innate immune defense of animals. **Immunogenetics**, 62, 753-759, 2010.

IZIDORO, L. F.M.; SOBRINHO, J.C.; MENDES, M. M.; COSTA, T.R.; GRABNER, A. N.; RODRIGUES, V.M.; 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.

IZIDORO, L.F.M.; RIBEIRO, M.C.; SOUZA G.R.L.; SANT'ANA, C.D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GOULART, L.R.; BELEBONI, R.O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorg Med Chem**, 14: 7034-7043, 2006.

JAIN, D.; KUMAR, S. Snake Venom: A Potent Anticancer Agent. **Asian Pacific J Cancer Prev**, 13 (10), 4855-4860, 2012.

JAKOBSSON, P.J.; THOREN, S.; MORGENSTERN, R.; SAMUELSSON, B. Identification of human prostaglandin synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 96, 7220-7225, 1999.

JANETOPOULOSA, C.; FIRTEL, R. A. Directional sensing during chemotaxis, **FEBS Letters**, 582. 2008.

JIN, Y.; LEE, W.H.; ZENG, L.; ZHANG, Y. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from King Cobra venom. **Toxicon**, 50, 479-489, 2007.

JOHNSON, J.L.; MOORE, E.E.; DOUGLAS Y. TAMURA, D.Y.; ZALLEN, G.; BIFFL, W.L.; SILLIMAN, C.C. Interleukin-6 Augments Neutrophil Cytotoxic Potential via Selective Enhancement of Elastase Release. **Journal of Surgical Research**, 91-94, 1998.

JOHNSON, K.J.; VARANI, J.; SMOLEN, J.E. Neutrophil activation and function in health and disease. **Immunology series**, New York, v 57:1, p.46, 1992.

JOHNSTON, B.; BURNS, A.R.; SUEMATSU, M.; ISSEKUTZ, T.B.; WOODMAN, R.C.; KUBES, P. Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1. **J Clin Invest**, 103:1269-76, 1999.

KALINSKI, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E₂. **The Journal of Immunology.**, 2012.

KANNAN, S. Amplification of extracellular nucleotide-induced leukocyte(s) degranulation by contingent autocrine and paracrine mode of leukotriene-mediated chemokine receptor activation. **Med Hypotheses.**, 59(3):261-5, 2002.

KASAMA, T.; STRIETER, R.M.; STANDIFORD, T.J.; BURDICK, M.D.; KUNKEL, S.L. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. **J. Exp. Med.**, v. 178, 1993.

KAUFMANN, I.; HOELZL, A.; SCHLIEPHAKE, F.; HUMMEL, T.; CHOUKER, A.; PETER, K.; THIEL, M. Polymorphonuclear leucocyte dysfunction syndrome in patients with increasing sepsis severity. **Shock.**, v. 26, n. 3, p. 254-261, 2006.

KIM, D.; HAYNES, C. L. The role of p38 MAPK in neutrophil functions: single cell chemotaxis and surface marker expression. **The Analyst.**, 138(22):6826-33, 2013.

KING, G.F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. **Expert Opin. Biol. Ther.** 11:1469-1484, 2011.

KLEBANOFF, S.J.; VADAS, M.A.; HARLAN, J.M. ; SPARKS, L.H.; GAMBLE, J.R.; AGOSTI, J.M.; WALTERSDORPH, A.M. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. **J. IMMUNOL.**, 136:4220, 1986.

KLYUBIN, I.V.; KIRPICHNIKOVA, K.M.; GAMALEY, I.A. Hydrogen peroxide-induced chemotaxis of mouse peritoneal neutrophils. **European Journal of Cell Biology.**, 70(4):347-351, 1996.

KOJIMAA, F.; KATOA, S.; KAWAIA, S. Prostaglandin E synthase in the pathophysiology of arthritis. **Fundamental & Clinical Pharmacology.**, 19 , 255–261, 2005.

KOLACZKOWSKA, E. Resident Tissue Leukocytes: Underappreciated Guards of the Body. **Open Journal of Hematology.**, 1, 2010.

KOMMOJU, P.R.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S. Molecular cloning, expression and purification of L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma* **Protein Expr. Purif.** 52, 89-95, 2007.

KOROTKOVA, M.; JAKOBSSON, P. J. Characterization of Microsomal Prostaglandin E Synthase 1 Inhibitors. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.**, 114, 64–69, 2014.

KUIJPERS, T.W. Neutrophils. Encyclopedia of life sciences. **Nature publishing group.**, 2001.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **International Immunopharmacology.**, 2010.

KUNALAN, S.; VEJAVAN, J.; NAVARATMAN, P. Purification and determination of antibacterial constituent, L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodostoma* and *Ophiophagus Hannah*. **Toxicon.**, 60, 95-248, 2012.

LAGRANHA, C. J.; LEVADA-PIRES, A. C.; SELLITTI, D. F.; PROCOPPIO, J.; CURI, R.; T. C. PITHON-CURI, T. C. The effect of glutamine supplementation and physical exercise on neutrophil function. **Amino Acids.**, 34: 337–346, 2008.

LAMBETH, J. D.; T. KAWAHARA. ; B. DIEBOLD. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. **Free Radic Biol Med.**, 43(3): p. 319-31, 2007.

LARSEN, G.L.; HENSON, P.M. Mediator of inflammation. **Annu. Rev. Immunol.**, v.1, p 335-359, 1983.

LEE, M.L.; FUNG, S.Y.; CHUNG, I.; PAILOOR, J.; CHEAH, S.H.; TAN, N.H. King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase induces apoptosis in PC-3 cells and suppresses PC-3 solid tumor growth in a tumor xenograft mouse model. **Int J Med Sci.** 8, 593-601, 2014.

LEE, H.; WHITFIELD, P.L.; MACKAY, C.R. Receptors for complement C5a. The importance of C5aR and the enigmatic role of C5L2. **Immunol Cell Biol** 86:153–60, 2008.

LEE, M.L.; TAN, N.H.; FUNG, S.Y.; SEKARAN, S.D. Antibacterial action of heat-stable form of L-amino acid oxidase from King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** 153, 237-242, 2011.

LEE, S. R.; YANG, K. S.; KWON, J.; LEE, C.; JEONG, W.; RHEE, S. G. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. **The Journal of Biological Chemistry.**, 277(23), 20336–20342, 2002.

LEHRER, R.I.; GANZ, T.; SELSTED, M.E.; BABIOR, B.M.; CURNUTTE, J.T. Neutrophils and host defense. **Ann. Inter. Med.**, 109, 127-142, 1998.

LI, R.; ZHU, S.; WU, J.; WANG, W.; LU, Q.; CLEMETSON, K.J. L-amino acid oxidase from *Naja atra* venom activates and binds to human platelets. **Acta Biochim Biophys Sin.**, 40, 2008.

LI, Z.Y.; YU, T.F.; ERIC, C.Y.L. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus Hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. **Toxicon** 32, 1349–1358, 1994.

LIU, J.W.; CHAI, M.Q.; DU, X.Y.; SONG, J.G.; ZHOU, Y.C. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys pallas* venom. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, 305–310, 2002.

LIU, X.; MA, B.; MALIK, A. B.; TANG, H.; YANG, T.; SUN, B.; WANG, G.; MINSHALL, R.D.; LI, Y.; ZHAO, Y.; YE, R.D.; XU, J. Bidirectional regulation of neutrophil migration by mitogen-activated protein kinases. **Nature immunology.**, 13, 2012.

LOKUTA, M.A.; HUTTENLOCHER, A. TNF- α promotes a stop signal that inhibits neutrophil polarization and migration via a p38 MAPK pathway. **Journal of Leukocyte Biology.**, 78. 2005.

MACHEROUX, P.; SETH, O.; BOLLSCHWEILER, C.; SCHWARZ, M.; KURFUÈ, M.; LO-CHUN, A.; GHISLA, S. L-Amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **Eur. J. Biochem.**, 268, 1679±1686, 2001.

- MALEMUD, C. J. Inhibitors of stress-activated protein/mitogen-activated protein kinase pathways. **Curr Opin Pharmacol.**, 7 (3):339-43. Epub 2007 Mar 29, 2007.
- MALONEY, C.G.; KUTCHERA, W.A.; ALBERTINE, K.H.; MCINTYRE, T.M.; PRESCOTT, S.M.; ZIMMERMAN, G.A. Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. **J. Immunol.**, v.160, p.1402-1410, 1998.
- MANNONI, P.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.; TURNER, A.R.; MCGANN, L.; TURC, J.M. Monoclonal Antibodies Against Human Granulocytes and Myeloid Differentiation Antigens. **Human Immunology** 5, 309-323, 1982.
- MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Clearance de imunocomplexo: Papel do complemento e dos Neutrófilos Polimorfonucleares. **Medicina, Ribeirão Preto.**, 30: 234-242, 1997.
- MAUER, J.; DENSON, J. L.; BRUNING, J.C. Versatile functions for IL-6 in metabolism and câncer. **Trends in Immunology.**, vol. 36, no. 2, 2015.
- MAXFIELD, F. R. Regulation of leukocyte locomotion by Ca²⁺. **Trends Cell Biol.** 3, 386-391, 1993.
- MCADAM, B. F.; CATELLA-LAWSON, F.; MARDINI, I. A.; KAPOOR, S.; LAWSON, J. A.; FITZGERALD, G. A. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: The human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, pp. 272–277, 1999.
- MCCORMICK, A. HEESEMANN, L.; WAGENER, J.; MARCOS, V.; HARTL, D.; LOEFFLER, J.; HEESEMANN, J.; EBEL, F. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. **Microbes and Infection.**, v. 12, p. 928-936, 2010.
- MENEZES, G. B., REIS, W.G.P., SANTOS, J.M.M., DUARTE, I .D.G., FRANCISCHI, J.N. Inhibition of prostaglandin F2 α by selective cyclooxygenase 2 inhibitors accounts for reduced rat leukocyte migration. **Inflammation.**, v. 29, p. 163–169. 2005.
- MIGEOTTE, I.; COMMUNI, D.; PARMENTIER, M. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 17, p. 501–19, 2006.
- MILLS, P. C.; SEAWRIGHT, A. A.; AUERT, D. Vascular leakage induced by histamine, bradykinin, serotonin and prostaglandin E₂ in Greyhounds. **Australian VeteriMry Journal.**, 70, 1993.
- MINAKAMI, R.; SUMIMOTOA, H. Phagocytosis-Coupled Activation of the Superoxide-Producing Phagocyte Oxidase, a Member of the NADPH Oxidase (Nox) Family. **Int J Hematol.**, v. 84, p. 193-198, 2006.
- MONCADA, S.; FERREIRA, S.H.; VANE, J .R. Bioassay of prostaglandins and biologically substances derived from arachidonic acid. **Adv Prost Thromb Res.**, v. 5, p. 211-36, 1987.

- MONCH, K. T. The transcriptional program of terminal granulocytic differentiation. **Phagocytes.**, 2005.
- MOREIRA, M. E.; DEL PORTILLO, H. A.; Milder, R.V.; BALANCO, J. M.; BARCINSKI, M. A.; Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organismo *Leishmania amazonenses*. **J. Cell. Physiol.**, v. 167, p. 305-313,1996.
- MORITA, I.; SCHINDLER, M.; REGIER, M. K.; OTTO, J. C.; HORI, T.; DEWITT, D. L.; SMITH, W.L. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and 2. **Biol. Chem.**, 270, 10902-10908, 1995.
- MOSER, B. E.; WILLIMANN, K. Chemokines: role in inflammation and imune surveillance. **Ann Rheum Dis**, v. 63, p. ii84-ii89, 2004.
- MOURA, H .V.; POMERANTZEFF, P. M. A.; GOMES, W. J - Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. **REV BRAS CIR CARDIOVAS.** 16(4): 376-87, 2001.
- MOURA, P. R.; VIDAL, F. A. P. Signal transduction: a review about G protein. **Scientia Medica.**, v 21, número 1, p. 31-36, 2011.
- MUKHERJEE, A. K.; SAVIOLA, A, J.; BURNS, P.D.; MACKESSY, S.P. Apoptosis induction in human breast cancer (MCF-7) cells by a novel venom L-amino acid oxidase (Rusvinoxidase) is independent of its enzymatic activity and is accompanied by caspase-7 activation and reactive oxygen species production. **Apoptosis.**, v 20, 1358-1372, 2015.
- MURAKAWA, M.; JUNG, S. K.; IJIMA, K.; YONEHARA, S. Apoptosis inducing protein, AIP, from parasite-infected fish induces apoptosis in mammalian cells by two different molecular mechanisms, **Cell Death Differ.**, 8, 298-307,2001.
- MURPHY, A. J.; WOOLLARD, K, J.; SUHARTOYO, A.; STIRZAKER, R. A.; SHAW, J.; SVIRIDOV, D.; CHIN-DUSTING, J. P. F. Neutrophil Activation Is Attenuated by High-Density Lipoprotein and Apolipoprotein A-I in In Vitro and *In Vivo* Models of Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.**, 31: 1333-1341, 2011.
- NAKAJIMA, Y.; TSURUMA, K.; SHIMAZAWA, M.; MISHIMA, S.; HARA, H. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 9(4), 2009.
- NATHAN, I.; DVILANSKY, A.; YIRMIYAHU, T.; AHARON, M.; LIVNE, A. Impairment of platelet aggregation by *Echis colorata* venom mediated by L-amino acid oxidase or H₂O₂. **Europe Pubmed Central.**, 48(3):277-282, 1982.
- NETEA, M. G.; VEERDONK, F. L.; MEER, J. W. N.; DINARELLO, C. A.; JOOSTEN, L.A.B. Inflammasome-Independent Regulation of IL-1 Family Cytokines. Annual **Review of Immunology.**, 2015.
- NICK, J. A.; YOUNG, S.K.; BROWN, K.K.; AVDI, N.J.; ARNDT, P.G.; SURATT, B.T.; JANES, M,S.; HENSON, P.M.; WORTHEN, G.S. Role of p38 mitogenactivated protein kinase in a murine model of pulmonary inflammation. **J. Immunol.**, 164:2151, 2000.

- NIEDERMANN, D. M.; AND K. LERCH. Regulation of biosynthesis of L-amino acid oxidase by *Neurospora crassa*. **FEMS Microbiol Lett.**, 63:309-13, 1990.
- NIETHAMMER, P.; GRABHER, C.; LOOK, A. T.; MITCHISON, T. J. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. **Nature.**, 459, 2009.
- NISHIZAWA, T.; ALDRICH, C. C.; SHERMAN, D. H. Molecular analysis of the rebeccamycin L-amino acid oxidase from *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243. **J Bacteriol.** 187:2084-92, 2005.
- NUSSMEIER, N. A.; WHELTON, A. A.; BROWN, M. T.; LANGFORD, R.M.; HOEFT, A.; PARLOW, J.L.; BOYCE, S. W. ; VERBURG, K.M. Complications of the COX-2 Inhibitors Parecoxib and Valdecoxib after Cardiac Surgery. **The new england journal of medicine.**, 352;11, 2005.
- OBARA, K.; OTSUKA-FUCHINO, H.; SATTAYASAI, N.; NONOMURA, Y.; TSUCHIYA, T.; TAMIYA, T. Molecular cloning of the antibacterial protein of the giant African snail, *Achatina fulica* Ferussac, **Eur J Biochem.** 209, 1, 1992.
- OKA, Y.; SARAIVA, L. R.; KWAN, Y. Y.; KORSCHING, S. The fifth class of G proteins. **PNA.**, 3, 2009 vol. 106 no. 5, 2009.
- ONO, K.; HAN, J. The p38 signal transduction pathway Activation and function. **Cellular Signalling.**, 12 , 1–13, 2000.
- PAIVA, R.M.A.; FIGUEIREDO, R.F.; ANTONUCCI, G.A.; PAIVA, H.H.; BIANCHI, M.L.P.; RODRIGUES, K.C.; LUCARINI, R.; CAETANO, R.C. PIETRO, R.C.L.R.; MARTINS, C.H.G.; ALBUQUERQUE S.; SAMPAIO, S.V. Cell cycle arrest evidence, parasitocidal and bactericidal properties induced by L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochimie.**, 93 , 941- 947, 2011.
- PARKER, H.; DRAGUNOW, M.; HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. **J Leukoc Biol.**, 92(4):841–849, 2012.
- PAWELEK, P.D.; CHEAH, J.; COULOMBE, R.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; VRIELINK, A. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. **Embo J.**, 19, 4204–4215. 2000.
- PENNIX, B. W. J. H. et al. Inflammatory markers and incident mobility limitation in the elderly. **Journal of the American Geriatrics Society.**, v. 52, n. 7, p. 1105- 1113, 2004.
- PETTERSSON, P. L.; THOREN, S.; JAKOBSSON, P. J. Human microsomal prostaglandin synthase 1: a member of the MAPEG protein superfamily. **Meth. Enzymol.**, 401, 147-161, 2005.
- PHAM, C.T. Neutrophil serine protease: specific regulators of inflammation. **Nat Rev Immunol.**, 6 (7):541-50, 2006.

- PIGNATELLI, P.; PULCINELLI, F. M.; LENTI, L.; GAZZANIGA, P. P.; VIOLI, F. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. **Blood.**, 91, 484–490, 1998.
- PILLAY, J.; BRABER, I. D.; VRISEKOP, N.; KWAST, L. M.; BOER, R. J.; BORGHANS, J. A. M.; TESSELAAR, K.; KOENDERMAN, L. In vivo labeling with H₂O₂ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. **Blood.**, 116 (4), 2010.
- PONNUDURAI, G.; CHUNG, M.C.; TAN, N.H. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. **Arch Biochem Biophys.**, 313(2):373-8, 1994.
- PONTES, A. S.; SETÚBAL, S. S.; XAVIER, C. V.; LACOUTH-SILVA, F.; KAYANO, A. M.; PIRES, W. L.; NERY, N. M.; CASTRO, O. B.; SILVA, S. D.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M.; ZULIANI, J. P. Effect of L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodostoma* snake venom on human neutrophils. **Toxicon.**, 27-27, 2014.
- PORTANOVA, J. P.; ZHANG, Y.; ANDERSON, G. D.; HAUSER, S. D.; MASFERRER, J. L.; SEIBERT, K.; GREGORY, S. A.; ISAKSON, P. Selective Neutralization of Prostaglandin E₂ Blocks Inflammation, Hyperalgesia, and Interleukin 6 Production *In Vivo*. **J. Exp. Med.**, 184, 1996.
- PREMACK, B. A.; SCHALL, T. J. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. **Nat Med.**, v. 2, n. 11, p. 1174-1178, 1996.
- PROOST, P.; WUYTS, A. AND VAN DAMME, J. The role of chemokines in inflammation. **Int.J. Clin.Lab.Res** 26,211-223, 1996.
- PUGIN, J. Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. **Novartis Foundation Symposium**, v. 280, p. 21-27, 2006.
- PUIGSERVER, P.; RHEE, J.; LIN, J.; WU, Z.; YOON, J. C.; YU, Z. C.; KRAUSS, S.; MOOTHA, V. K.; LOWELL, B. B.; SPIEGELMAN, B. M. Cytokine Stimulation of Energy Expenditure through p38 MAP Kinase Activation of PPAR γ Coactivator-1. **Molecular Cell.**, 8. 971–982, 2001.
- RABIER, M.J.; HUET, E.; BOULAY, F. The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: An overview. **Biochimie.**, 89. 1089 e 1106, 2007.
- RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; PELÚZO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. The formation and the effects of the reactive oxygen species in biological media. **Biosci. J.**, 21, 133-149, 2005.
- RODRIGUES, L.C. Avaliação do impacto biológico da Galectina-1, endógena e exógena, sobre funções de neutrófilos. **Tese de Doutorado.**, Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2012.

RODRIGUES, R. S.; DA SILVA, J. F.; BOLDRINI FRANCA, J.; FONSECA, F. P.; OTAVIANO, A. R.; HENRIQUE SILVA, F.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A.S.; DOS SANTOS, J. I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FONTES, M. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Structural and functional properties of BpLAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie.**, 91, 490–501,2009.

ROSENBERG, H. F.; GALLIN, J.; Inflammation. Fundamental Immunology. **Lippincott-Raven Publishers.**, 32, 1999.

ROUBENOFF, R. Catabolism of aging: is it an inflammatory process? Current Opinion in **Clinical Nutrition and Metabolic Care.**, v. 6, n. 3, p. 295-299, 2003.

SAFFARZADEH, M.; JUENEMANN, C.; QUEISSER, M. A.; LOCHNIT, G.; BARRETO, G.; GALUSKA, S. P.; LOHMEYER, J.; PREISSNER, K. T. Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones. **Plos One.**, 7(2), 2012.

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.**, 39, 1827-1833, 2001.

SEGAL, A. W; HARPER, A. M.; GARCIA, R.C.; MERZBACH, D. The action of cells from patients with chronic granulomatous disease on *Staphylococcus aureus*. **J Med Microbiol.**, Nov;15(4):441-9, 1983

SAMEL, M.; TONISMAGI, K.; RONNHOLM, G.; VIJA, H.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.;SIIGUR, E. L-Amino acid oxidase from *Naja naja oxiana* venom. **Comp. Biochem. Physiol. B.**,149, 572–580, 2008.

SAUER, H.; WEFER, K.; VETRUGNO, V.; POCCHIARI, M.; GISSEL, C.; SACHINIDIS, A.; HESCHELER, J.; WARTENBERG, M. Regulation of intrinsic prion protein by growth factors and TNF-alpha: the role of intracellular reactive oxygen species. **Free Radic Biol Med.**, 35, 586-594, 2003.

SAWAI, Y. An Epidemiological study on snakebites in the Asian areas. **International soc. of toxinology.**, 1972.

SCANDELLA, E.; MEN, Y.; GILLESSEN, S.; FORSTER, R.; GROETTRUP, M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. **Blood.**, v, 100, n.4, 2015.

SCHUMAKER, J. H.; O GARRA, A.; SCHRADER, B.; VAN KIMMEENADE, A.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. . The characterization of four monoclonal antibodies specific for mouse IL-5 and development of mouse and human IL-5 ELISA. **J. Immunol.**, v. 141, p. 1576-81, 1988.

- SERRA, M. C.; BAZZONI, F.; DELLA BIANCA, V.; GRESKOWIAK, M.; ROSSI, F. Activation of human neutrophils by substance P. Effect on oxidative metabolism, exocytosis, cytosolic Ca^{2+} concentration and inositol phospholipid formation. **The Journal of Immunology.**, 15, 62118-2124, 1988.
- SHEN, Y. H.; ZHANG, L.; GAN, Y.; WANG, X.; WANG, J.; LEMAIRE, S. A.; COSELLI, J. S.; WANG, X. L. Up-regulation of PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome Ten) Mediates p38 MAPK Stress Signal-induced Inhibition of Insulin Signaling a cross-talk between stress signaling and insulin signaling in resistin-treated human endothelial cells. **The journal of biological chemistry.**, v. 281, NO. 12, pp. 7727–7736, 2006
- SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol.**, v.18, n.3, p. 385-405, 2004.
- SKARNES, R.C. L-amino-acid oxidase, a bactericidal system. **Nature.**, 225:1072-3, 1970.
- SMITH, W.L.; GAVAVITO, R. M.; DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. **J. Biol. Chem.**, 271:33157-33160, 1996.
- SOLIS, C.; ESCOBAR, E.; YARLEQUE, E.; GUTIERREZ, S. Purificación caracterización de La L-amino oxidasa del veneno de La serpiente *Bothrops brazili* 'jergon shushupe'. **Rev. Peru. Biol.**, 6, 75–84.1999.
- SOZZANI, S.; AGWU, D.E.; ELLENBURG, M. D.; LOCATI, M.; RIEPPI, M.; ROJAS, A.; MANTOVANI, A. AND MCPHAIL, L.C. Activation of phospholipase D by interleukin-8 BY in human neutrophils. **Blood.**, 84, 3895-3901, 1994.
- STÁBELI, R. G.; SANT'ANA, C. D.; RIBEIRO, P. H.; COSTA, T. R.; TICLI, F. K.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; ALBUQUERQUE, S.; MALTA-NETO, N. R.; MARINS, M.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: Biochemical and functional characterization. **Int. J. Biol. Macromol.** 41: 132–140, 2007.
- STÁBELI, R. G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B.; PIETRO, R. C.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; OLIVEIRA, E. B.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorg. Méd. Chem.**, 12, 2881-2886, 2004.
- STARKOV, A. A.; FISKUM, G. Regulation of brain mitochondrial H_2O_2 production by membrane potential and NAD(P)H redox state. **J Neurochem.**, 83: 220-8. 2003.
- STILES, B. G.; SEXTON, F. W.; WEINSTEIN, S. A. Antibactericidal effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon.**, 29, 1129- 1141, 1991.
- SUHARA, T.; FUKUO, K.; SUGIMOTO, T. Hydrogen peroxide induces upregulation of Fas in human endothelial cells. **J. Immunol.**, 160, 4042–4047, 1998.
- SUHR, S. M.; KIM, D. S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 224, 134-139, 1996.

SULLIVAN, J. A., MANDELL, G. L. Motility of human polymorphonuclear neutrophils: microscopic analysis of substrate adhesion and distribution of F-actin. **Cell Motil.**, v. 3, p. 31-46, 1983.

SUZUKI, K.; OTA, H.; SASAGAWA, S.; SAKATANI, T.; FUJIKUR, T. Assay Method for Myeloperoxidase in Human Polymorphonuclear Leukocytes. **Analytical biochemistry.**, 132, 345-352, 1983.

SZEWCZK, A.; WOJTCZAK, L. Mitochondria as a pharmacological target. **Pharmacol Rev** 54, 101-127, 2002.

TAKATSUKA, H.; SAKURAI, Y.; YOSHIOKA, A.; KOKUBO, T.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; MATSUI, T.; TITANI, K.; YAGI, H.; MATSUMOTO, M.; FUJIMURA, Y. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. **Biochim Biophys Acta.**, 1544: 267-277, 2001.

TAN, N. H.; FUNG, S. Y. Snake venom L-Amino Acid Oxidases and their potential biomedical applications. **Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology.**, 2008.

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. **Biochem Biophys Res Comm.**, 280: 620-624, 2001.

THELEN, M.; WYMANN, M. P.; LANGEN, H. Wortmannin binds specifically to 1-phosphatidylinositol 3-kinase while inhibiting guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor signaling in neutrophil leucocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 91, 1994.

THORNTON, P.; PINTEAUX, E.; GIBSON, R.M.; ALLAN, S.M.; ROTHWELL, N.J. Interleukin-1-induced neurotoxicity is mediated by glia and requires caspase activation and free radical release. **F. Neurochem.** 2006.

TONISMAGI, K.; SAMEL, M.; TRUMMAL, K.; RONNHOLM, G.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, E. L-amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: isolation, characterization, effects on platelets and bacteria. **Toxicon.**, 48, 227-237, 2006.

TORII, S.; YAMANE, K.; MASHIMA, T.; HAGA, N.; YAMAMOTO, K.; FOX, J.W.; MIKIHICO, NAITO, M.; TSURUO, T. Molecular Cloning and Functional Analysis of Apoxin I, a Snake Venom-Derived Apoptosis-Inducing Factor with L-Amino Acid Oxidase Activity. **Biochemistry.**, 39, 3197-3205, 2000.

TORII, S.; NAITO, M.; TSURUO, T. Apoxin I, a Novel Apoptosis-inducing Factor with L-Amino Acid Oxidase Activity Purified from Western Diamondback Rattlesnake Venom. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, No. 14, pp. 9539-9542, 1997.

TORRES, A.F.C.; DANTAS, R.T.; TOYAMA, M.H.; FILHO, E.D.; ZARA, F.J.; QUEIROZ, M.G.R.; NOGUEIRA, N.A.P.; OLIVEIRA, M.R.; TOYAMA, D.O.; MONTEIRO, H.S.A.; MARTINS, A.M.C. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. **Toxicon.**, 55, 795-804, 2010.

TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; TOMOKANE, T. Y.; FONSECA, F. V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O.; MARTINS, M.A.; MONTEIRO, H.S.; FONTELES, M.C. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicol.**, 47, 47–57, 2006.

VADDI, K.; NEWTON, R. C. Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. **J Immunol.**, 15;153(10):4721-32, 1994.

VALLON, O.; BULTE, L.; KURAS, R.; OLIVE, J.; WOLLMAN, F.A. Extensive accumulation of an extracellular L-amino-acid oxidase during gametogenesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Eur J Biochem.**, 215:351-60, 1993.

VAN DEN BERG, Y.W.; REITSMA, P.H. Not exclusively tissue factor: neutrophil extracellular traps provide another link between chemotherapy and thrombosis. **J Thromb Haemost.** 9(11). 2011.

VAN DER MEER, J.W.; VOGELS, M.T.; KULBERG, B.J. Interleukin- 1 and related proinflammatory cytokines in the treatment of bacterial infections in neutropenic and non neutropenic animals. **Biotherapy.**, 7: 161-1967, 1994.

VAN PELT, J. P.; DE JONG, E. M.; VAN ERP, P. E.; MITCHELL, M. I.; MARDER, P.; SPAETHE, S. M.; VAN HOOIJDONK, C. A.; KUIJPERS, A. L.; VAN DE KERKHOF, P. C. The regulation of CD11b integrin levels on human blood leukocytes and leukotriene B4-stimulated skin by a specific leukotriene B4 receptor antagonist (LY293111). **Biochem Pharmacol.**, 4;53(7):1005-12, 1997.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. CYCLOOXYGENASES 1 AND 2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 38:97–120, 1998.

VARGAS, I. J.; QUINTANA, J. C.; PEREAÑEZ, J. A.; NÚÑEZ, V.; SANZ, L.; CALVETE, J. Cloning and characterization of an antibacterial L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cumanensis* venom. **Toxicol.**, 64, 1-11, 2013.

VIEIRA SANTOS, M. M.; SANT'ANA, C.; GIGLIO, J. R.; SILVA, R. J.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; FECCHI, D. Antitumoral Effect of na L-amino Acid Oxidase from Bothrops jararaca Snake Venom. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.**, 2008.

VILLANUEVA, E.; YALAVARTHI, S.; BERTHIER, C. C.; HODGIN, J. B.; KHANDPUR, R.; LIN, A. M.; RUBIN, C. J.; ZHAO, W.; OLSEN, S. H.; KLINKER, M.; SHEALY, D.; DENNY, M. F.; PLUMAS, J.; CHAPEROT, L.; KRETZLER, M.; BRUCE, A.T.; KAPLAN, M. Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus. **J Immunol Methods.**, v. 187, p. 538-552, 2011.

WANG, D.; DuBOIS, R.N. The role os COX-2 in intestinal inflammation and colorectal câncer. **Oncogene.**, 29, 781–788, 2010.

WARZOCHA, K.; BIENVENU, J.; COIFFIER, B.; SALLES, G. Mechanisms of action of the tumor necrosis factor and lymphotoxin ligand-receptor system. **Eur Cytokine Netw.**, 1995.

- WARRELL, D. A.; LOOAREESUWAN, S.; THEAKSTON R, D.; PHILLIPS, R. E.; CHANTHAVANICH, P.; VIRAVAN, C.; SUPANARANOND, W.; KARBWANG, J.; HO, M.; HUTTON, R. A. Randomized comparative trial of three monospecific antivenoms for bites by the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) in southern Thailand: clinical and laboratory correlations. **Am J Trop Med Hyg.**, 35(6):1235-47, 1986.
- WEI, J. F.; WEI, Q.; LU, Q. M.; TAI, H.; JIN, Y.; WANG, W. Y.; XIONG, Y. L. Purification, characterization and biological activity of an L-aminoacid oxidase from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **Acta Biochem. Biophys. Sin.**, 35, 219–224, 2003.
- WEI, X. L., WEI, J. F., LI, T., QIAO, L. Y., LIU, Y. L., HUANG, T., HE, S. H. Purification, characterization and potent lung lesion activity of an L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii* ussurensis snake venom. **Toxicon.**, 50, 1126–1139, 2007.
- WILLIAMS, T. J.; PECK, M. J. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. **Nature.**, 270, 530-532, 1997.
- WITKO-SARSAT, V.; PHILIPPE, R.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P.; HALBWACHS –MECARELLI, L. Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. **Biology of Disease.**, v. 80, No. 5, p. 617, 2000.
- WOODFIN, A.; VOISIN, M. B.; NOURSHARGH, S. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. **Curr Opin Hematol.**, 17: 9–17, 2010.
- XU, N.; HOSSAIN, M.; LIU, LIXIN. Pharmacological Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinases Affects KC/CXCL1-Induced Intraluminal Crawling, Transendothelial Migration, and Chemotaxis of Neutrophils *In Vivo*. **Mediators of Inflammation.**, 2013.
- YAMAZAKI ,K.; HONDA, T.; ODA, T.; UEKI-MARUYAMA, K.; NAKAJIMA, T.; YOSHIE, H.; SEYMOUR, G. J. Effect of periodontal treatment on the C-reactive protein and proinflammatory cytokine levels in Japanese periodontitis patients. **J Periodont Res.**, 2005.
- YANG, H.; JOHNSON, P. M.; KO, K. C.; KAMIO, M.; GERMANN, M. W.; DERBY, C. D.; TAI, P. C. Cloning, characterization and expression of escapin, a broadly antimicrobial FAD-containing L-amino acid oxidase from ink of the sea hare *Aplysia californica*, **J Exp Biol.**, 208, 3609-22, 2005.
- YIPP, B.G.; KUBES, P. NETo1s: how vital is it? **Blood.**, 16, 122, 2013.
- YOKOMIZO, T.; IZUMI, T.; CHANG, K.; TAKUWA, Y.; SHIMIZU, T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. **Nature.**, v. 387, n. 6633, p. 620-624, 1997.
- YU, L.; CROSS, A. R.; ZHEN, L.; DINAUER, M. C. Functional Analysis of NADPH Oxidase in Granulocytic Cells Expressing a D488-497 gp91phox Deletion Mutant. **Blood.**, v. 94, 1999.
- YU, L.; WU, W.K.; LI, Z.J.; WONG, H.P.; TAI, E.K.; LI, H.T. A series of prostaglandin receptor 2 –mediated activation of extracellular signal-regulated Kinase/activator protein- 1 signaling is required for the mitogenic action of prostaglandin E2 in esophageal squamous-cell carcinoma. **J Pharmacol Exp Ther.**, 258-67, 2008.

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

ZHONG, S.R.; JIN, Y.; WU, J. B.; JIA, Y. H.; XU, G. I.; WANG, G. C.; XIONG, Y. L.; LU, Q.M. Purification and characterization of a new L-amino acid oxidase from *Daboia russellii siamensis* venom. **Toxicon.**, v. 54, p. 763-771, 2009.

ZSCHALER, J.; ARNHOLD, J. Impact of simultaneous stimulation of 5- lipoxygenase and myeloperoxidase in human neutrophils. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.**, v. 107, p. 12-21, 2016.

ZULIANI, J. P.; KAYANO, A. M.; ZAQUEO, K. D.; NETO, A. C.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; STÁBELI, R. G. Snake venom L-amino acid oxidases: some consideration about their functional characterization. **Protein Pept Lett.**, v. 16, p. 908-12, 2009.

ANEXOS

Drogas e reagentes:

Acetato de forbol miristato - PMA (Sigma Chemical Company, EUA), Ácido acético glacial (Merck Germany), , DMSO (Biotec, Brasil), Gentamicina (Hipolabor), (Newprov, Brasil), Glicerol (Merck, Germany), Hepes (Sigma Chemical Company, EUA), TMB – Tetrametilbenzidina. L-glutamina (Sigma Chemical Company, EUA), RPMI 1640 (Sigma Chemical Company, EUA), Soro Fetal Bovino (Cultilab), O- fenilenodiamina –OPD (Sigma Chemical Company EUA), Hidróxido de potássio - KOH , Horseradish Peroxidase – HRP – (Pierce), , Ácido cítrico (Merck),Histopaque 1077 (Sigma Chemical Company EUA), FMLP (Sigma Chemical Company, EUA), DCF (Millipore) , Rotenona (Calbiochem).



p38 MAPK is involved in human neutrophil chemotaxis induced by L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodosthoma*



Adriana S. Pontes^a, Sulamita da S. Setúbal^a, Neriane Monteiro Nery^a, Francisquinha Souza da Silva^{a, b}, Silvana D. da Silva^{b, c}, Carla F.C. Fernandes^{c, d}, Rodrigo G. Stábeli^c, Andreimar M. Soares^{b, c}, Juliana P. Zuliani^{a, c, *}

^a Laboratório de Imunologia Celular Aplicada à Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil

^b Faculdade São Lucas, Porto Velho, RO, Brazil

^c Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde (CEBio), Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ Rondônia e Departamento de Medicina, Universidade Federal de Rondônia, UNIR, Porto Velho, RO, Brazil

^d Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, Porto Velho, RO, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 February 2016

Received in revised form

11 April 2016

Accepted 26 May 2016

Available online 27 May 2016

Keywords:

Snake venom

LAAO

Neutrophils

Chemotaxis

Mediators

Signaling

ABSTRACT

The action of LAAO, an L-amino acid oxidase isolated from *Calloselasma rhodosthoma* snake venom, on isolated human neutrophil function was investigated. Cr-LAAO showed no toxicity on neutrophils. Cr-LAAO in its native form induced the neutrophil chemotaxis, suggesting that its primary structure is essential for stimulation of the cell. p38 MAPK and PI3K have a role as signaling pathways of Cr-LAAO induced chemotaxis. This toxin also induced the production of hydrogen peroxide and stimulated phagocytosis in neutrophils. Furthermore, Cr-LAAO was able to stimulate neutrophils to release IL-6, IL-8, MPO, LTB₄ and PGE₂. Together, the data showed that the Cr-LAAO triggers relevant proinflammatory events.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

L-amino acid oxidases (LAAOs, EC 1.4.3.2) are flavoenzymes able to catalyze the stereospecific oxidative deamination of L-amino acids to the corresponding α -ketoacid, with the production of hydrogen peroxide and ammonia via an imino acid intermediate (Curti et al., 1992). These enzymes exhibit a conspicuous affinity for hydrophobic amino acids, including phenylalanine, tryptophan, tyrosine and leucine.

LAAOs are widely distributed in diverse organisms (Du and Clemetson, 2002; Zuliani et al., 2009; Guo et al., 2012; Izidoro et al., 2014) and, in most snake venoms, are present in significantly high concentrations. Called as snake venom-LAAOs (SV-

LAAOs), these toxins may represent up to 9% of the total protein. The yellow color of snake venoms rich in SV-LAAOs is related to the presence of riboflavin pigment as the prosthetic group, which facilitates its purification (Du and Clemetson, 2002; Zuliani et al., 2009; Guo et al., 2012; Izidoro et al., 2014).

In a recent review published by our group, the authors highlighted the biological functions of LAAOs (Izidoro et al., 2014; Costa et al., 2014). Among them are antimicrobial and antitumoral activities, induction of apoptosis, and inhibition of platelet aggregation and anti-HIV activity which, are mainly associated with the production of hydrogen peroxide, since catalase activation, a H₂O₂ scavenger, inhibits the biological effects of both LAAOs and H₂O₂ (Du and Clemetson, 2002; Zuliani et al., 2009; Guo et al., 2012; Izidoro et al., 2014; Costa et al., 2014, 2015).

Pontes et al. (2014) published that LAAO from *Calloselasma rhodosthoma* (a Malayan pit viper) activates isolated human neutrophils which produce ROS (superoxide anion and hydrogen peroxide) as well as cytokines (IL-8 and TNF- α) and induces the liberation of neutrophil extracellular traps (NETs). In addition, the

* Corresponding author. Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Rondônia), Laboratório de Imunologia Celular Aplicada à Saúde, Rua da Beira, 7671 BR364, Km 3.5, CEP 76812-245 Porto Velho, RO, Brazil.

E-mail addresses: zuliani.juliana@gmail.com, zuliani@fiocruz.br, juliana.zuliani@unir.br, jzuliani@pq.cnpq.br, jzuliani@ipepatro.org.br (J.P. Zuliani).

authors examined the contribution of intrinsic LAAO activity on hydrogen peroxide production by neutrophils.

Neutrophils, a type of polymorphonuclear leukocyte, constitute the most abundant white blood cells and the major cellular component during acute inflammation. They are the first cell type to be recruited to an inflammatory site. The recruitment includes the following steps: tethering, rolling, adhesion, crawling and, finally, transmigration (Kolaczowska and Kubes, 2013).

Emigrated neutrophils must follow a chemoattractant gradient in order to respond to such guidance signals called chemotaxis. This directed process of cell migration in chemical gradients is a vital process not only in normal physiology and trafficking of immune cells, but also in the regenerative processes such as wound healing and tissue architecture maintenance, or in the pathogenesis of many diseases and inflammation. Chemotactic cells display motility, directional sensing and polarity to chemoattractant factors such as bacterial products (for example, *N*-formyl-methionine-leucine-phenylalanine (fMLP)), complement fractions (C5a) and chemokines (IL-8) (Kolaczowska and Kubes, 2013).

Once in the tissue, neutrophils at inflammatory loci become active, degranulate and induce the formation of a spectrum of oxidants. The heme protein myeloperoxidase (MPO) found in these cells, produces oxidants that are secreted along with superoxide anion (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2), both intracellularly inside forming phagosomes and extracellularly in the neutrophil environment (Hampton et al., 1998).

The present study was therefore designed to evaluate the action of isolated LAAO from *Calloselasma rhodostoma* (a Malayan pit viper) on human neutrophils especially on chemotaxis and the signaling mediating this event, phagocytosis, superoxide anion production and cytokines (IL-6 and IL-8), MPO, LTB_4 and PGE_2 liberation by these cells.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Crystallized *Calloselasma (Agkistrodon) rhodostoma* venom was purchased from Sigma Chem. Co. (MO, USA). Trypan blue, RPMI-1640, L-glutamine, gentamicin, phorbol myristate acetate (PMA), fMLP, Histopaque 1077, DMSO, OPD (*o*-1,2-phenylenediamine dihydrochloride), SB202190, Wortmanin, zymosan, TMB, DAB Kit and horseradish peroxidase were purchased from Sigma (Missouri, USA). Rotenone and recombinant MPO were purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany). 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) was purchased from Molecular Probes (Oregon, USA). OptEIA™ Set Human IL-6 and OptEIA™ Set Human IL-8 were purchased from BD Biosciences (San Diego, USA). LTB_4 and PGE_2 specific enzymatic immunoassay (EIA) were purchased from Cayman Chemicals (Michigan, USA). p38 MAPK and phosphor-p38 MAPK were purchased from Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Cultilab (São Paulo, Brazil). All salts and reagents used obtained from Merck (Darmstadt, Germany) with low endotoxin or endotoxin-free grades.

2.2. Isolation and biochemical characterization of Cr-LAAO

Cr-LAAO was isolated according to Pontes et al. (2014). In brief, *Calloselasma rhodostoma* venom (30 mg) was dissolved in 1.0 mL of 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, centrifuged at 755g for 10 min at room temperature and the clear supernatant applied on a 70 cm × 0.9 cm Superdex G-75 column, which was previously equilibrated and then eluted with the same buffer. The fraction I showing LAAO activity was lyophilized, diluted with 0.02 M Tris-

HCl buffer, pH 8.0 and then applied on a 4.0 × 0.6 cm Q-Sepharose Fast Flow column (GE Healthcare), previously equilibrated with the same buffer, using a crescent concentration NaCl gradient (0–100%). For the inactivation of the enzyme, Cr-LAAO was submitted to a temperature of 80 °C for 30 min.

2.3. Neutrophil isolation

Peripheral blood neutrophils were obtained from self-reportedly healthy donors (18–40 years old). Informed consents were obtained at the time of the blood draw. All participants gave informed consent prior to their inclusion in the study, and the Brazilian IRB (Institutional Review Board) of the Center of Tropical Medicine Research (CEPEM, Rondônia, Brazil - approval number 108/2010) approved it. In brief, blood was collected in vacuum tubes containing heparin and diluted in phosphate buffered saline (PBS, 14 mM NaCl, 2 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 7mM $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), pH 7.4, after local asepsis. For the separation of leukocytes, Histopaque 1077 was added to the tubes and then the diluted blood was carefully added over the reagent. After centrifugation at 400g for 30 min, neutrophils were collected from the bottom of the tube, along with the erythrocytes and were transferred to another tube, according to Pontes et al. (2014). Lysis of red blood cells was performed using lysis buffer (0.15 M NH_4Cl ; 0.01 M $KHCO_3$; 0.0001 M $Na_2 EDTA$), homogenized and subjected to a temperature of –8 °C for 5 min, and then centrifuged. Neutrophils were washed with PBS and an aliquot of isolated neutrophils was used for determining the total number of neutrophils in a Neubauer's chamber after cell staining (1:20, v/v) with Turk solution (violet crystal 0.2% in acetic acid 30%). The purity of the isolated cell population was determined by Panotic staining of cytospin preparations and by flow cytometry analysis (FACScan). The average purity achieved by our isolation technique was 99% of the neutrophils (Pontes et al., 2014).

2.4. Cytotoxic assay

Cell viability was measured by Trypan blue exclusion test. In brief, 2×10^5 isolated human neutrophils were resuspended in 1 mL of RPMI assay medium [RPMI-1640 medium supplemented with 100 µg/mL of gentamicin, 2 mM of L-glutamine and 10% of fetal bovine serum (FBS)] and were then incubated with 20 µL of RPMI (negative control), 1% of Triton X100 (positive control) or different concentrations of Cr-LAAO (12.5, 25, 50 e 100 µg/mL) diluted in the assay medium for 12 h at 37 °C in a humidified atmosphere (5% CO_2). Then, 20 µL of 0.1% of Trypan blue was added to a 100 µL suspension of isolated human neutrophils. Viable cell index was determined in a Neubauer's chamber by counting a total number of 100 cells. Results were expressed as percentage of viable cells.

2.5. Chemotaxis assay

Chemotaxis was carried out using the Transwell polycarbonate plate with a permeable membrane (Corning-Costar, USA) based on the classic transwell filter diffusion assay (Boyden, 1962). In this assay, 200 µL of 1×10^6 neutrophil suspensions were loaded into the top well (insert) of a 24-well chemotactic chamber equipped with an 8-µm pore size filter. In the bottom well, RPMI (negative control), formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP; 500 ng/mL, positive control) (Sigma) (Naccache et al., 1985) or different concentrations of Cr-LAAO (50 and 100 µg/mL) were added as chemoattractants. The chemotaxis assay with isolated human neutrophils was incubated for 3 h at 37 °C and 5% CO_2 . Migrated human neutrophils were counted using a Neubauer chamber. Results were expressed as number of migrated cells/mL. In a set of

experiments the cells were incubated with Cr-LAAO at 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$, in the native form and inactive form, for 3 h at 37 °C and 5% CO_2 .

2.6. Pharmacologic modulation of chemotaxis

To assess the different signal transduction pathways involved in neutrophil chemotaxis, the cells were treated with 500 nM Wortmanin, a PI 3 kinase inhibitor for 15 min (Capodici et al., 1998) or 15 μM SB202190, a p38 MAP kinase inhibitor for 30 min (Lokuta and Huttenlocher, 2005) or before adding the Cr-LAAO or RPMI alone with the vehicle used for the inhibitor. The inhibitor concentration used did not have adverse effect on cell viability, during the course of the assays and was based on comparison with concentrations used elsewhere in the literature. Control cells were treated with the same concentration of the carrier in which the inhibitor has been dissolved.

2.7. Measurement of intracellular ROS levels

A peroxide-sensitive fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) was used to measure intracellular levels of ROS. DCFDA is converted by intracellular esterases to 2',7'-dichlorodihydrofluorescein, which is then oxidized by H_2O_2 to the highly fluorescent 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF). For this assay, 2×10^5 neutrophil suspensions were resuspended in Hank's solution and were plated in black plates. Neutrophils were incubated in the presence or absence of Rotenone (10 μM), a mitochondria complex I inhibitor, for 90 min (Handa et al., 2004). Then, Hank's solution (negative control), LPS (1 $\mu\text{g/mL}$; positive control) or different concentrations of Cr-LAAO (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) were added. After 3 h of incubation, 100 μL of DCFDA (10 μM) diluted in Hank's solution was added and incubated for 30 min at 37 °C, under constant dark conditions. DCF fluorescence was measured with the Bio-Tek Synergy HT Multi-Detection (Winooski, VT) at excitation and emission wavelengths of 485 and 528 nm, respectively (Nakajima et al., 2009).

2.8. Neutrophil phagocytosis

For the phagocytosis assay, 2×10^5 neutrophils were resuspended in RPMI culture medium, plated and incubated with RPMI (negative control), LPS (1 $\mu\text{g/mL}$; positive control), PMA (500 ng/mL; positive control) or different concentrations of Cr-LAAO (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), in the presence of non-opsonized zymosan particles for 3 h at 37 °C, in a humidified atmosphere (5% CO_2). After neutrophils cytochrome preparations and Panotic staining, phagocytosis was observed by counting at least 100 neutrophils that internalized two or more non-opsonized zymosan particles. Results were presented as the percentage of positive cells for phagocytosis.

To prepare non-opsonized zymosan, zymosan particles-obtained from yeast cell walls-were suspended in PBS with a particle concentration of 5.7 $\mu\text{g/mL}$.

2.9. Myeloperoxidase assay

For this, 1×10^6 neutrophils were resuspended in RPMI culture medium, plated and incubated with RPMI (negative control), LPS (1 $\mu\text{g/mL}$; positive control), PMA (500 ng/mL; positive control) or different concentrations of Cr-LAAO (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), for 4 h at 37 °C, in a humidified atmosphere (5% CO_2). Then, the plate was centrifuged at 400g for 5 min and the supernatant was collected for MPO level determination. For this purpose, 50 μL of each sample was added to 100 μL of TMB (Suzuki et al., 1983). After 5 min, the reaction was interrupted with 2N sulfuric acid. MPO levels were

measured with the Bio-Tek Synergy HT Multi-Detection (Winooski, VT) at absorbance wavelengths of 450 nm. Results were estimated through a standard curve prepared with recombinant MPO and expressed by ng/mL of MPO.

2.10. Prostaglandin E_2 (PGE_2) and leukotriene B_4 (LTB_4) assay

PGE_2 and LTB_4 concentrations were measured in the supernatant of neutrophils (2×10^5 cells/mL) suspended in assay medium. Briefly, neutrophils were incubated with assay medium (negative control), PMA (500 ng/mL; positive control) or different concentrations of Cr-LAAO (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) diluted in assay medium for 1 h at 37 °C in a humidified atmosphere (5% CO_2). PGE_2 and LTB_4 concentrations in the supernatant were determined by a specific enzymatic immunoassay (EIA) previously described by Pradelles et al. (1985), using a commercial kit (Cayman Chemicals, MI, USA).

2.11. Interleukin-6 (IL-6) and Interleukin-8 (IL-8) quantifications

For this assay, 2×10^5 neutrophil suspensions resuspended in assay medium were plated and incubated with RPMI (negative control), PMA (500 ng/mL; positive control) or different concentrations of Cr-LAAO (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), at 37 °C, in a humidified atmosphere (5% CO_2) for 1 h to quantify IL-6 and for 3 h to quantify IL-8. After centrifugation, the supernatant was used for quantification of IL-6 and IL-8 levels by specific EIA, according to Pontes et al. (2014). The results were expressed in pg/mL of each cytokine.

2.12. Immunoblotting

For this assay, 2×10^6 neutrophil suspensions resuspended in assay medium were plated and incubated with RPMI (negative control), PMA (500 ng/mL; positive control) or different concentrations of Cr-LAAO (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), at 37 °C, in a humidified atmosphere (5% CO_2) for 40 min. After, neutrophils were lysed with RIPA buffer containing phosphatase and protease inhibitors (1/100, Sigma) and homogenized. For p38 MAPK phosphorylation determination, total protein extracts (20 μg) were prepared, resolved by 15% SDS/PAGE and transferred onto a PVDF membrane (Hybond, Amersham Pharmacia Biotech). Immunoblotting was performed using monoclonal antibodies against phosphor-p38 and total p38. Blots were developed with 3,3'-Diaminobenzidine tablets and hydrogen peroxide (Sigma-Fast).

2.13. Statistical analysis

The means and S.E.M. of all data were obtained and compared by one-way ANOVA, followed by Tukey test with significance probability levels less than 0.05.

3. Results

3.1. Effect of Cr-LAAO on human neutrophils viability

To further investigate Cr-LAAO's effect on neutrophils function, we isolated these cells by density gradient, according to Pontes et al. (2014). To test the toxicity of several concentrations of Cr-LAAO in isolated human neutrophils, we used Trypan blue assay. For this purpose, the effect of 12 h of Cr-LAAO incubation was investigated. As shown in Fig. 1, the incubation of neutrophils with RPMI (negative control) did not affect neutrophil viability. On the other hand, the incubation of neutrophil with Triton X-100, a positive control, significantly reduced neutrophil viability. The incubation of neutrophils with Cr-LAAO at concentrations from 6 to 100 $\mu\text{g/mL}$ did not affect human neutrophils viability in comparison

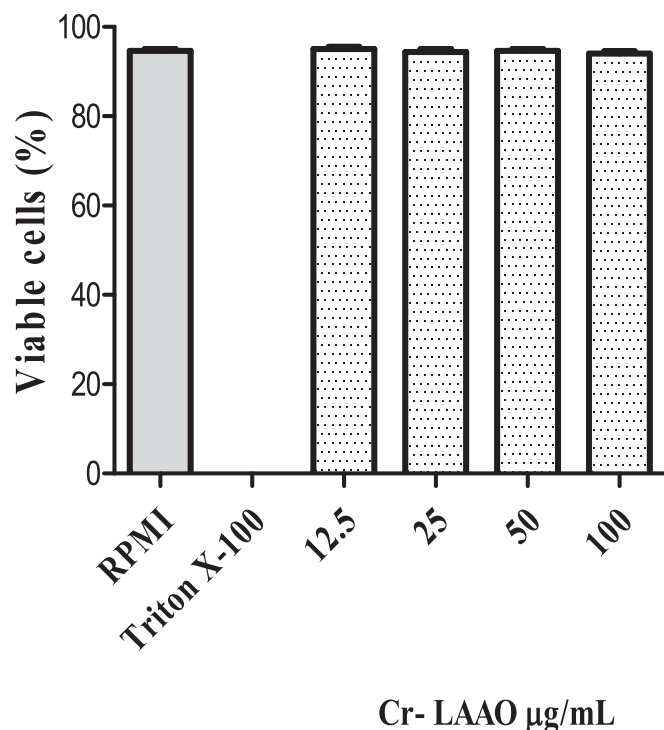


Fig. 1. Effect of Cr-LAAO on neutrophils viability. Human neutrophils were isolated from buffy coats of healthy adult blood donors through a density gradient method. 2×10^5 cells were incubated with RPMI (control) or different concentrations of Cr-LAAO for 12 h at 37 °C in humidified atmosphere of 5% CO₂. After cell viability was assessed by Trypan blue exclusion test. Values from 4 to 5 donors represent the percentage of viable cells with the mean S.E.M.

with control cells incubated with assay medium alone. This finding evidenced that Cr-LAAO in this period of time and at these concentrations is not toxic to human neutrophils.

3.2. Human neutrophil chemotaxis induced by Cr-LAAO

We investigated the effect of Cr-LAAO on neutrophil directional migration using a transwell migration system. Cells were plated on transwell filters and induced to migrate in response to a chemoattractant added to the wells beneath the filters. The migration of neutrophils to these lower wells requires 2D chemotaxis on the top of the filter (towards the holes), followed by their migration through the holes into the bottom well where the chemoattractant is. The number of cells in the bottom well was then used to calculate the cells migrated per mL. As shown in Fig. 2, fMLP (a bacterially derived chemoattractant) significantly increased neutrophil chemotaxis after 3 h of incubation in comparison to the negative control, RPMI. The chemotaxis observed using Cr-LAAO in native form, at concentrations of 50 and 100 µg/mL, was greater than that observed in the positive control, fMLP, suggesting that Cr-LAAO has a role as a chemotactic factor. Moreover, when cells were incubated with Cr-LAAO in inactive form, the stimulatory effect of the toxin was abrogated. These findings evidenced the ability of Cr-LAAO to stimulate human neutrophils chemotaxis, which is related to enzymatic activity of this protein.

In order to verify the signal transduction of Cr-LAAO to induce neutrophils chemotaxis, the cells were incubated with RPMI (negative control) or fMLP (positive control) or Cr-LAAO in the presence or absence of Wortmanin or SB202190 or co-treatment of each inhibitor. As shown in Fig. 3A and B incubation of neutrophils at concentrations of 50 and 100 µg/mL of Cr-LAAO resulted in a

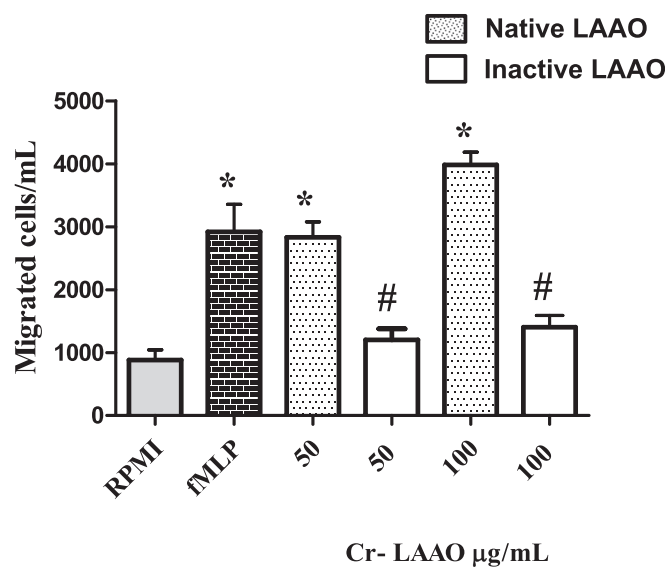


Fig. 2. Effect of Cr-LAAO on neutrophils chemotaxis. Neutrophils (1×10^6) were incubated for 3 h with RPMI (negative control), fMLP (500 ng/mL) (positive control) and Cr-LAAO (50 and 100 µg/mL) in native and inactive form at 37 °C and 5% CO₂. Migrated human neutrophils were counted using a Neubauer chamber. Values are mean S.E.M. from 4 to 5 donors. * $P < 0.05$ compared to negative control, # $P < 0.05$ compared to corresponding concentration of Cr-LAAO in native form (ANOVA).

significant increase in neutrophil chemotaxis, which was affected by Wortmanin and by SB202190, respectively. In Fig. 3C, the combination of those inhibitors significantly inhibited Cr-LAAO-induced neutrophil chemotaxis. Moreover, we also analyzed the p38 MAPK phosphorylation by immunoblotting. Neutrophils were incubated with RPMI (negative control) or LPS or PMA (positive controls) or Cr-LAAO. As shown in Fig. 3D incubation of neutrophils with Cr-LAAO induced an increase in p38 MAPK phosphorylation. This was consistent with our pharmacological results with p38 MAPK inhibitor, SB202190.

3.3. Reactive oxygen species (ROS) production by human neutrophils stimulated by LAAO

A growing body of evidence indicates that reactive oxygen species (ROS) play a role as key regulators of neutrophil chemotactic migration (Hattori et al., 2010a,b). Pontes et al. (2014) showed that Cr-LAAO was able to induce H₂O₂ using the technique described by Pick and Keisari (1980), adapted for microassay by Pick and Mizel (1981), with modifications proposed by Russo et al. (1989). Here, an oxidation-sensitive fluorescent probe dichlorofluorescein (DCF) was used to measure ROS. In this assay, upon oxidation by ROS, the nonfluorescent H₂DCFDA is converted to the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). Thus, the ability of Cr-LAAO to induce the ROS production by human neutrophils and the contribution of mitochondrial oxygen consumption, using rotenone, a standard blocker of complex I, was verified. The results in Fig. 4 show that the incubation of neutrophils with Hank's solution (negative control) resulted in a basal production of ROS. The incubation of neutrophils at concentrations between 25 and 100 µg/mL resulted in a significant increase of ROS production. On the other hand, the presence of rotenone inhibited ROS production in all concentrations used of Cr-LAAO, which suggests the ability of Cr-LAAO to stimulate human neutrophils for ROS production.

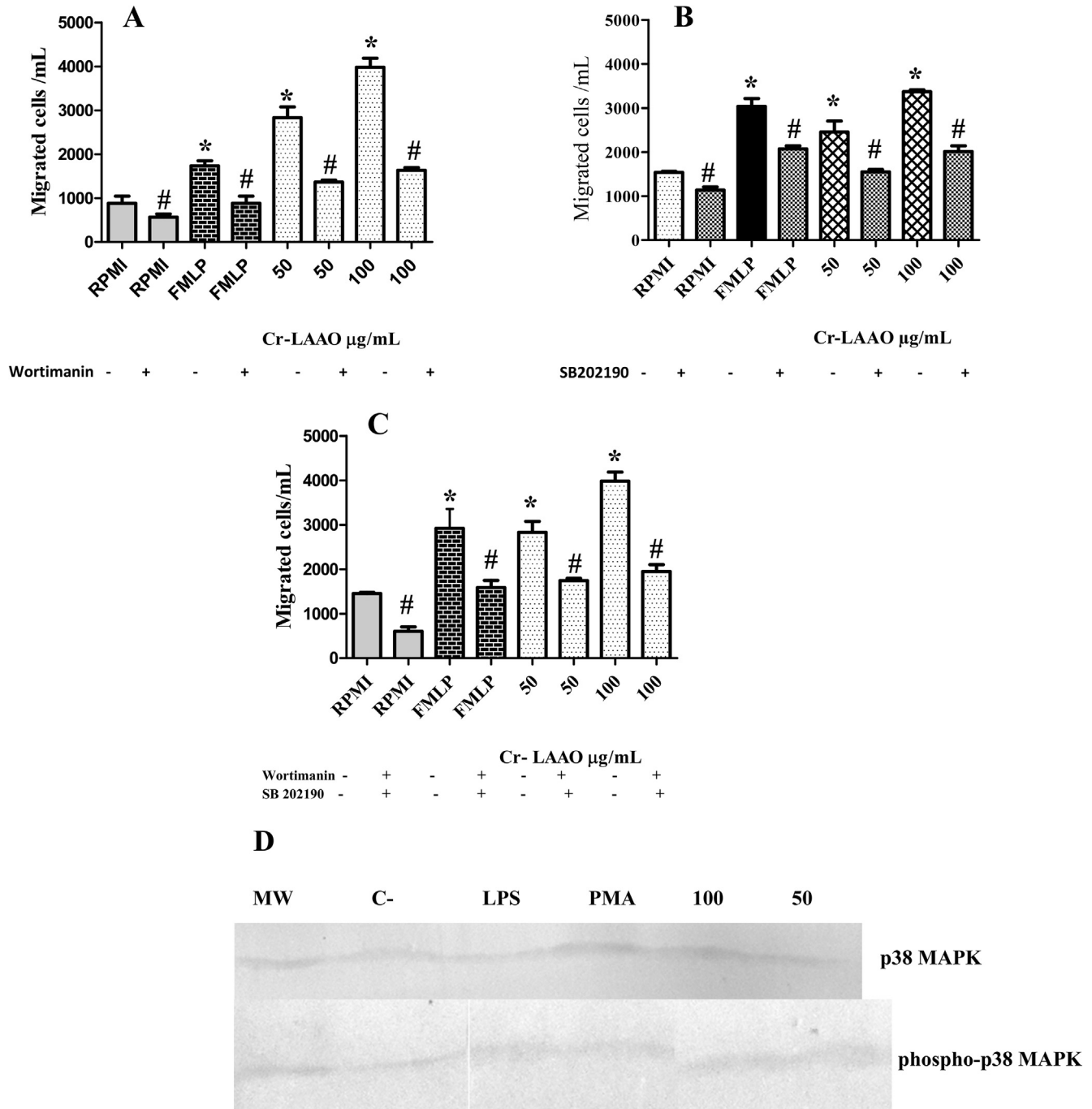


Fig. 3. Participation of PI3K and p38MAPK on Cr-LAAO induced neutrophils chemotaxis. Neutrophils (1×10^6) were treated with 500 nM Wortmanin (A), a PI3K inhibitor, for 15 min or 15 μM SB202180 (B), a p38MAPK inhibitor, for 30 min or combination of those inhibitors (C) before adding the Cr-LAAO or RPMI alone with the vehicle used for the inhibitor. After that neutrophils were incubated for 3 h with RPMI (negative control), fMLP (500 ng/mL) (positive control) or Cr-LAAO (50 and 100 $\mu\text{g/mL}$) at 37 °C and 5% CO_2 . Migrated human neutrophils were counted using a Neubauer chamber. Neutrophils (2×10^6) were incubated for 40 min with RPMI (negative control), LPS or PMA (positive control) or Cr-LAAO (50 and 100 $\mu\text{g/mL}$) at 37 °C and 5% CO_2 . Total protein was analyzed by immunoblot (D) with specific antibodies against the phosphorylated p38 MAPK and total p38 MAPK (control). Values are mean S.E.M. from 4 to 5 donors. * $P < 0.05$ compared to negative control, # $P < 0.05$ compared to corresponding treatment (ANOVA).

3.4. Non-opsonized zymosan phagocytosis by neutrophils stimulated by Cr-LAAO

In order to assess Cr-LAAO's phagocytosis-stimulating ability, the uptake of non-opsonized zymosan particles was determined in isolated human neutrophils. As shown in Fig. 5, neutrophils incubated with RPMI showed an average phagocytosis of non-opsonized zymosan particles of 31.6%. The incubation of

neutrophils with LPS or PMA (positive controls) induced a significant increase in neutrophil phagocytosis of non-opsonized zymosan particles compared to neutrophils incubated with RPMI (negative control). The incubation of neutrophils with Cr-LAAO at different concentrations resulted in a significant increase in the neutrophil phagocytosis of non-opsonized zymosan particles, suggesting that Cr-LAAO stimulates neutrophils to phagocytosis.

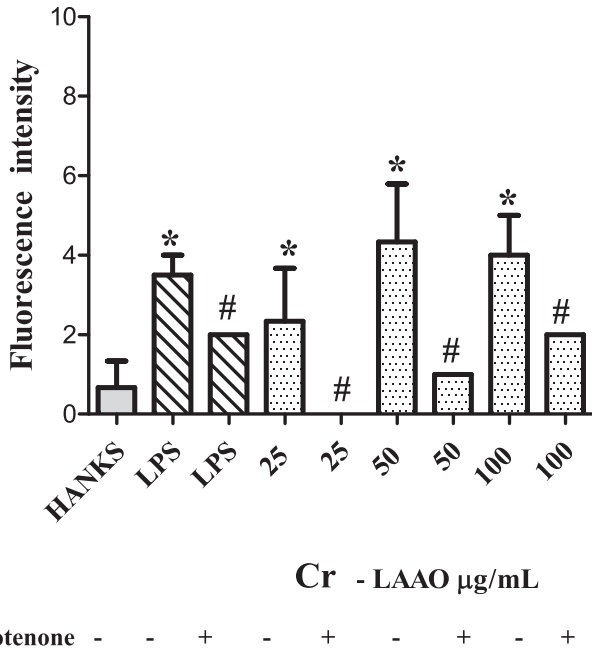


Fig. 4. Effect of Cr-LAAO on intracellular ROS levels. Neutrophils (2×10^5) were incubated for 3 h with Hank's solution (negative control), LPS (1 μg/mL; positive control) or different concentrations of Cr-LAAO (25, 50 e 100 μg/mL) in the presence or absence of Rotenone (10 μM). After addition of DCFDA (10 μM), DCF fluorescence was determined at excitation and emission wavelengths of 485 and 528 nm, respectively in a spectrophotometer. Data were expressed as fluorescence intensity. Values are mean S.E.M. from 4 to 5 donors. * $P < 0,05$ compared with control, # $p < 0,05$ compared to corresponding treatment (ANOVA).

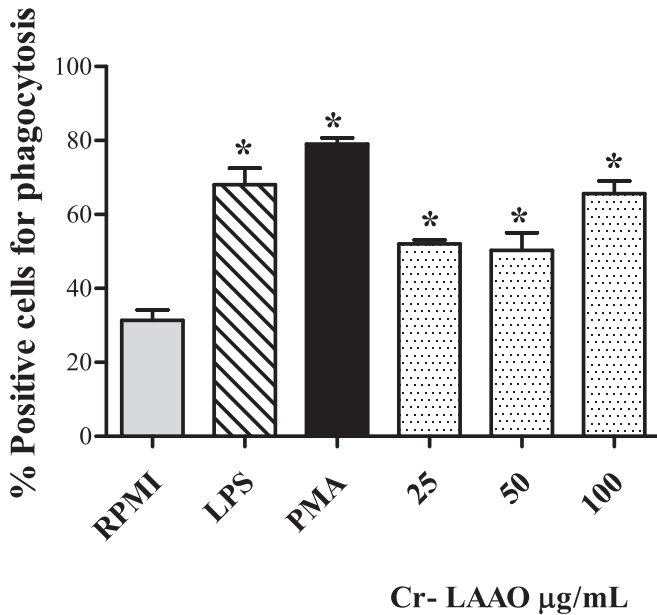


Fig. 5. Effect of Cr-LAAO on neutrophil phagocytosis. Neutrophils (2×10^5) were incubated with RPMI (negative control) or LPS (1 μg/mL; positive control) or PMA (500 ng/mL, positive control) or non-cytotoxic concentrations of Cr-LAAO for 3 h at 37 °C in a humid atmosphere (5% CO₂) before addition of non-opsonized zymosan particles. The results were expressed as % of positive cell for phagocytosis and represent the mean ± SEM of f4-5 donors. * $p < 0,05$ compared to control (ANOVA).

3.5. Myeloperoxidase liberation induced by human neutrophils stimulated by Cr-LAAO

In order to verify neutrophil activation, MPO liberation induced by Cr-LAAO was quantified. As shown in Fig. 6, incubation of neutrophil with all concentrations of Cr-LAAO induced a significant release of MPO by human neutrophils compared to both controls, LPS and PMA. These findings suggest the ability of Cr-LAAO to stimulate human neutrophils to release MPO.

3.6. Release of cytokines (IL-6 and IL-8) by human neutrophils induced by Cr-LAAO

To assess the ability of Cr-LAAO to activate human neutrophils and stimulate pro-inflammatory cytokines release, such as IL-6 and IL-8, the cells were incubated with RPMI (negative control), PMA (positive control) or non-cytotoxic concentrations of Cr-LAAO. As shown in Fig. 7A, all concentrations of Cr-LAAO induced a significant release of IL-6 by human neutrophils compared to both controls. Fig. 7B shows that 3 h of incubation of neutrophils with 100 μg/mL of Cr-LAAO induced a significant release of IL-8 by human neutrophils. Our results revealed that Cr-LAAO had activated human neutrophils and induced the release of IL-6 and IL-8.

3.7. Release of PGE₂ and LTB₄ by human neutrophils induced by Cr-LAAO

In order to investigate the ability of Cr-LAAO to induce the release of PGE₂ and LTB₄ by human neutrophils, the cells were incubated with RPMI (negative control), LPS (positive control), PMA (positive control) or non-cytotoxic concentrations of Cr-LAAO. As shown in Fig. 8A, 1 h of incubation of human neutrophils with different non-cytotoxic concentrations of Cr-LAAO induced an increase in PGE₂ release compared to the negative control (RPMI) and the positive control (PMA). Fig. 8B shows that 2 h of incubation of neutrophils with 100 μg/mL of Cr-LAAO induced a significant

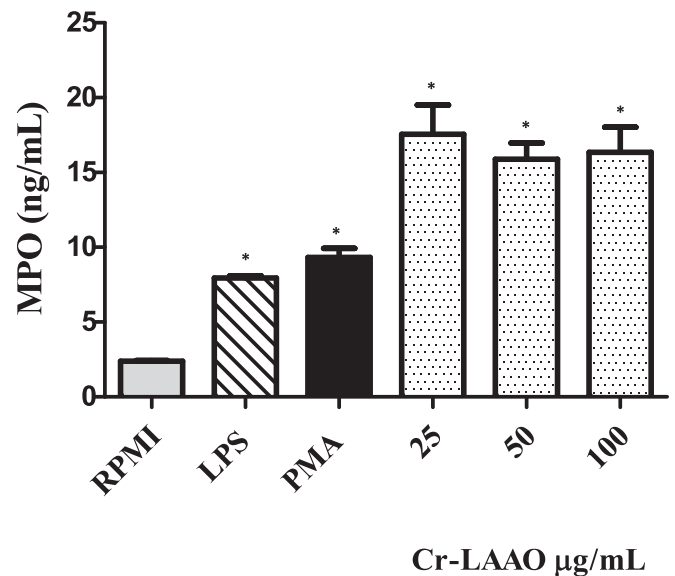


Fig. 6. Release of MPO by neutrophils induced by Cr-LAAO. Neutrophils (1×10^6) were incubated with RPMI (negative control) or PMA (500 ng/mL, positive control) or non-cytotoxic concentrations of Cr-LAAO for 4 h at 37 °C in a humid atmosphere (5% CO₂). The MPO concentrations in the supernatant were quantified in a spectrophotometer. The results were expressed as ng/mL of MPO and represent the mean ± SEM of four donors. * $p < 0,05$ compared to control. # $p < 0,05$ compared to PMA (positive control) (ANOVA).

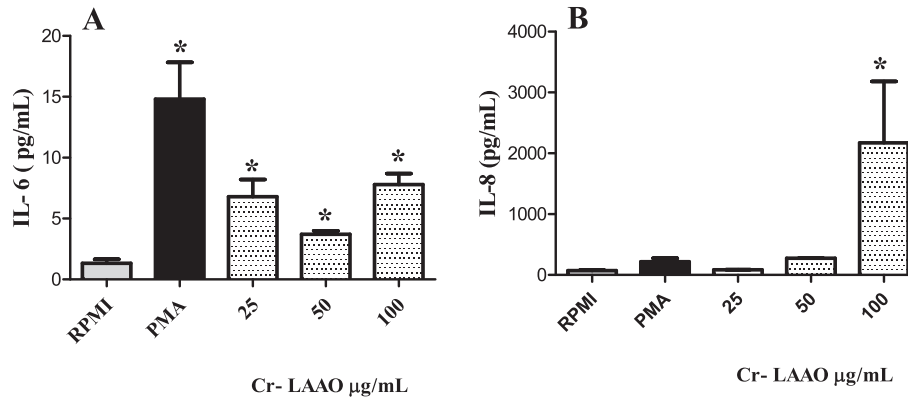


Fig. 7. Release of IL-6 and IL-8 by neutrophils induced by Cr-LAAO. Neutrophils (2×10^5) were incubated with RPMI (negative control) or PMA (500 ng/mL, positive control) or non-cytotoxic concentrations of Cr-LAAO for 1 h for IL-6 (A) and 3 h for IL-8 (B) at 37 °C in a humid atmosphere (5% CO₂). The concentrations of IL-6 (A) and IL-8 (B) in the supernatant were quantified by specific EIA. The results were expressed as pg/mL of IL-6 or IL-8 and represent the mean \pm SEM of four donors. * $p < 0.05$ compared to control (ANOVA).

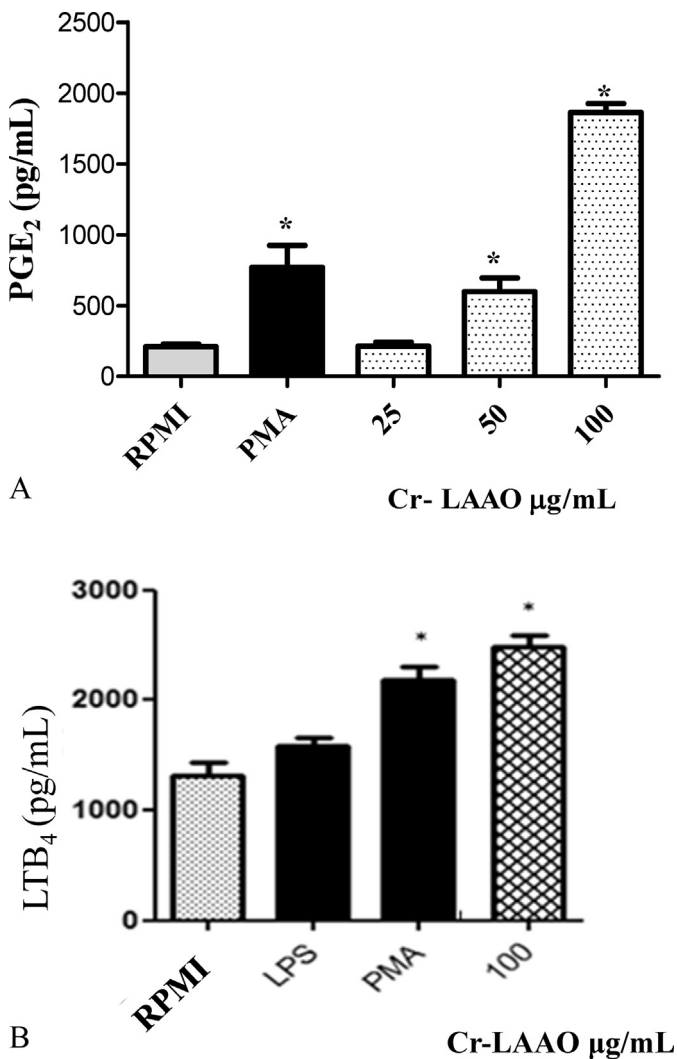


Fig. 8. Release of PGE₂ and LTB₄ by neutrophils induced by Cr-LAAO. Neutrophils (2×10^5) were incubated with RPMI (negative control) or LPS (1 µg/mL; positive control) or PMA (500 ng/mL, positive control) or non-cytotoxic concentrations of Cr-LAAO for 1 h (A) or 2 h (B) at 37 °C in a humid atmosphere (5% CO₂). PGE₂ and LTB₄ concentrations were quantitated by specific EIA in supernatant collected after incubation with RPMI or LPS or PMA or Cr-LAAO. The results were expressed as µg/mL of PGE₂ or LTB₄ produced and represent the mean \pm SEM of 4–5 donors. * $p < 0.05$ compared to control (ANOVA).

release of LTB₄ by human neutrophils. These findings evidenced the ability of Cr-LAAO to stimulate human neutrophils to induce PGE₂ and LTB₄ release.

4. Discussion

Venoms contain a complex mixture of proteins with pharmacological activities (Chippaux and Goyffon, 1998) among which are the LAOs. These toxins are found in large quantities in *C. rhodostoma* snake venom, representing 30% of venom (Ponnudurai et al., 1994).

Previously, we showed that Cr-LAAO, at non-cytotoxic concentrations, induced the superoxide anion production by isolated human neutrophils. This toxin, in its native form, is also able to stimulate the hydrogen peroxide production in neutrophils, suggesting that its primary structure is essential for cell stimulation. Moreover, Cr-LAAO was able to stimulate neutrophils to release proinflammatory mediators such as IL-8 and TNF- α as well as NETs, showing that Cr-LAAO triggers relevant proinflammatory events in such cells (Pontes et al., 2014). Despite this, there is still limited comprehension of this toxin's mechanism of action on human neutrophils.

It is known that neutrophils play a central role in the inflammatory process. After migration through the endothelial cells, these cells are attracted to a site of infection or insult by a chemotactic gradient of mediators (Kolaczowska and Kubes, 2013; Nauseef and Borregaard, 2014) such as the formulated compound (fMLP), derivatives of bacterial cell wall factors (LPS), complement fragment (C5a) and cytokines (Bokoch, 1995) which drive the movement of neutrophils (Dittmar et al., 2000).

Based on this knowledge, the ability of Cr-LAAO to induce human neutrophil chemotaxis through the polycarbonate filter was evaluated. The results showed that Cr-LAAO in its native form, at non-cytotoxic concentrations (50 and 100 µg/mL), was able to stimulate human neutrophil chemotaxis to the bottom of the compartment plate transwell after 3 h of incubation, as compared to controls (negative, RPMI and positive, fMLP). However, when Cr-LAAO in its inactive form was incubated with isolated human neutrophils, the stimulatory effect of Cr-LAAO was abrogated suggesting that enzymatic activity is important for neutrophil chemotaxis.

The mechanism of neutrophil chemotaxis is generally thought to depend on both PI3K- and p38 MAPK-dependent pathways, whereby exposure of neutrophils to a chemoattractant triggers either or both pathways (Gambardella and Vermeren, 2013; Kim

and Haynes, 2013). This study investigated the role of both PI3K and p38MAPK in Cr-LAAO induced neutrophil chemotaxis. Results showed that PI3K and p38MAPK are involved in Cr-LAAO induced neutrophil chemotaxis. The combined treatment with p38MAPK and PI3K inhibitors, at concentration that are effective as single treatment, significantly reduced Cr-LAAO induced neutrophil chemotaxis, therefore, indicating that PI3K and p38MAPK are involved in Cr-LAAO induced neutrophil chemotaxis and these pathways act in synergism. Using a different approach, immunoblotting assay showed a clear difference between p38MAPK and phosphor-p38MAPK indicating that Cr-LAAO induced p38MAPK phosphorylation that contributes to neutrophil chemotaxis. To the current date, there is no published data in literature showing the role of Cr-LAAO in neutrophil chemotaxis or migration of leukocytes into the peritoneal cavity of experimental animals and will enable an understanding of neutrophil immune response in both healthy and diseased systems. As such, this can be considered the first description.

Nonetheless, literature has demonstrated that p38 MAPK is present in PMNs, and is activated within seconds by a variety of stimuli, including bacterial peptides, cytokines, lipopolysaccharides, and chemoattractants (Kim and Haynes, 2013; Heit et al., 2008). p38MAPK activation in neutrophils induce adherence, chemotaxis, granular exocytosis, apoptosis and respiratory burst activity (Ono and Han, 2000). Based on this knowledge, it is possible to consider that p38MAPK is involved in neutrophil chemotaxis induced by Cr-LAAO and is able to stimulate neutrophils to produce hydrogen peroxide contributing to neutrophil chemotaxis.

Since LAAO has an intrinsic production activity of hydrogen peroxide which is permeable to the cell membrane, we suggest that the hydrogen peroxide somehow acts by activating neutrophils, regulating the extension of pseudopodia, the targeting and the cell orientation (Hattori et al., 2010a,b). In addition, when the enzymatic effect of Cr-LAAO was abrogated this enzyme fail the capacity to induce neutrophil chemotaxis. In this regard, recent evidence indicates that hydrogen peroxide controls the directed migration by mediating the recruitment of leukocytes to the inflammatory site (Niethammer et al., 2009); although Klyubin et al. (1996) were the first to propose that hydrogen peroxide acts as a chemoattractant in leukocytes. This data support our evidence that hydrogen peroxide has a role mediating the neutrophils chemoataxis.

In addition, Pontes et al. (2014) initially showed that the LAAO, *per se*, at concentrations of 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, did not produce hydrogen peroxide within the standards set by the hydrogen peroxide curve in the absence of neutrophils. However, when incubated in the presence of neutrophils, there was a high production of hydrogen peroxide, indicating that Cr-LAAO is able to stimulate neutrophils to produce hydrogen peroxide contributing to neutrophil chemotaxis.

Moreover, it is important to mention that neutrophils contain superoxide dismutase, catalase, and the glutathione redox system (Roos et al., 1980) that protect them against external oxidative stress. Studies with catalase-deficient and catalase-inhibited neutrophils proved that catalase is essential for adequate cell protection after incubation of neutrophils with the hydrogen peroxide-generating system. They also showed that catalase protect certain localized cell structures, and catalase along with glutathione redox are need for the preservation of the total cell function (Roos et al., 1980).

Another factor that must be taken into consideration is the interaction of Cr-LAAO glycan structure to the cell surface. The peculiar feature of LAAOs from snake venoms is its glycosylation. In this enzyme, some carbohydrates such as fucose, mannose,

galactose, N-acetyl glucosamida and sialic acid have been identified, making a total of 5.4% of the protein (De Kok and Rawitch, 1969; Solis et al., 1999; Ali et al., 2000). Wellner and Meister (1960) showed in their studies with *Crotalus adamanteus* snake venom the presence of glycosylation sites on the surface of LAAO. Furthermore, studies with *Crotalus atrox* snake venom in eukaryotic cells have shown that blocking glycosylation inhibits the residual activity of the enzyme (Torrii et al., 2000). Later, Ande et al. (2006) showed that glycans motifs of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* interact with structures of cell surface and induce apoptotic cell death as consequence of hydrogen peroxide production. Recently, Abdelkafi-Koubaa et al. (2016) showed that CC-LAAO from *Cerastes cerastes* binds to the cell surface and enables the production of highly localized concentration of hydrogen peroxide in or near the binding interfaces. On the other hand, the interaction of CC-LAAO with a mimetic phospholipid film indicated that phospholipid/CCLAEO interactions are not involved in their binding to membrane and in their pharmacological activities.

ROS can be derived from two sources: mitochondrial metabolism pathway (Murphy, 2009) or NADPH oxidase activation (Bedard and Krause, 2007). Mitochondria have important roles in cellular function, including participation in energy generation and modulation of apoptosis (Green and Reed, 1998). There are four carriers of electron transport, complexes I to IV, embedded in the lipid bilayer of the inner mitochondrial membrane. Complex I is considered to be a major site of electron leak and subsequent superoxide production (Lambert and Brand, 2004; Lenaz et al., 2006).

Thus, rotenone-a complex I electron transport inhibitor of the respiratory chain of the mitochondrial NADH metabolism pathway (Zmijewski et al., 2008) was used in order to verify if LAAO was able to induce ROS liberation, by a mechanism independent of NADPH oxidase. Results showed that LAAO, in all concentrations, stimulated neutrophils to produce ROS and, rotenone, reduced partially this effect suggesting that another pathway for ROS production participates in this effect: the NADPH oxidase. These data are in agreement with results from Zmijewski et al. (2008) that showed that rotenone potently inhibited mitochondrial complex I activity in neutrophils but these cells continuous produce ROS. It is important to note that rotenone did not induce apoptosis of human neutrophils (Sim et al., 2005).

Superoxide produced by complex I is predominantly generated in the mitochondrial matrix and, as a charged species; superoxide is not readily diffusible across mitochondrial membranes. However, superoxide rapidly undergoes dismutation to hydrogen peroxide (H_2O_2) within the mitochondria and, in contrast to superoxide, H_2O_2 is capable of diffusing across membranes and can transit from the mitochondria into the cytoplasm where it participates as a second messenger in the regulation of NF- κB and other intracellular signaling pathways. Several steps in the NF- κB signaling cascade have been shown to be regulated by H_2O_2 (Zmijewski et al., 2008). The released H_2O_2 is one of the ROS liberated by neutrophils and is particularly stable, has a half-life of 20 s (Barnard and Matalon, 1992) and diffuses faster than water (Bienert et al., 2006).

Phagocytosis is defined as the engulfing of other cells, cell fragments, and micro-organisms. The phagocytic process can be distinguished in several phases: (1) attachment of the opsonized particle upon recognition by specific receptors, (2) pseudopod extensions around attached particle whereby it is still exposed to the environment (“zippering”), and (3) completion of the engulfment resulting in the formation of a phagosome, which is an outside-in compartment inside the cell (van Kessel et al., 2014).

The next steps involve mobilization and fusion of the phagosome with different granule types resulting in the liberation of granule content that is required for killing of the microorganism (Flanagan et al., 2009; Nordenfelt and Tapper, 2011). Concurrently,

a strong oxidative burst is initiated in the phagosome by NADPH-dependent oxidases upon triggering of specific cell surface receptors, leading to the generation of highly toxic ROS. Together with the granular content, ROS play an important role in bacterial killing (Dale et al., 2008).

The present study evaluated the ability of Cr-LAAO to stimulate phagocytosis of non-opsonized zymosan particles by human neutrophils. Results obtained showed that Cr-LAAO is able to enhance the phagocytic capacity of neutrophils. There is no data in the literature to support these findings. Thus, this can be considered the first description.

Myeloperoxidase, a heme-protein, principal enzymes released from the neutrophil's azurophilic granules, released upon neutrophil activation (Witko-Sarsat et al., 2000). In the presence of H₂O₂, MPO catalyzes the oxidation of chloride ion to hypochlorous acid (HOCl), that is responsible for alkalization of the phagocytic vacuole during the oxidative burst (Borregaard, 1988), essential in the microbicidal activity (Segal et al., 1982). Literature documents that ROS and cytokines stimulate the release of MPO (Arimura et al., 1993). And, our group showed that Cr-LAAO induced the release of IL-8 as well as the production of ROS (Pontes et al., 2014). Thus, the presence of MPO in the supernatant of isolated human neutrophils incubated with Cr-LAAO was evaluated. Results showed Cr-LAAO induced MPO release suggesting that this enzyme leads to human neutrophils degranulation.

Cytokines are important mediators, and among the various cytokines, interleukin-6 (IL-6) and interleukin 8 (IL-8) are important mediators of inflammatory events. IL-6 is secreted by human neutrophils and has pro- and anti-inflammatory actions (Johnson et al., 1998). Among the IL-6 actions we can highlight their involvement in the initiation and maintenance of inflammation facilitating the trafficking of neutrophils to the inflammatory site and consequent stimulus to production of inflammatory mediators such as cytokines, prostaglandins, ROS and proteases (Fielding et al., 2008; Woodfin et al., 2010).

Thus, the involvement of IL-6 in Cr-LAAO action on neutrophil function was evaluated. Results showed that Cr-LAAO was able to induce IL-6 production. The data is in agreement with the results of Wei et al. (2007), in which LAAO of *Agkistrodon blomhoffii* induced the release of IL-6 by isolated human monocytes.

Another important cytokine that is involved in inflammatory processes is IL-8. This cytokine mediates neutrophil induced chemotaxis as the direction of polarization of neutrophils in the inflammatory site toward to a gradient of chemoattractants (Henkels et al., 2011). Thus, in order to understand the mechanism by which Cr-LAAO induces neutrophils chemotaxis IL-8 concentration was determined. Results showed that Cr-LAAO was able to induce the production of IL-8. Pontes et al. (2014) showed that Cr-LAAO induced the release of IL-8 by human neutrophils 12 h after incubation with the toxin. Importantly, since the LAAO induced release of IL-8 as well as production of ROS and literature documents that ROS and cytokines induce chemotaxis it is possible to suggest that IL-8 and the ROS, found in this study contribute to the phenomenon of chemotaxis of neutrophils by Cr-LAAO.

LTB₄ is a potent chemoattractant for neutrophils and a key player in the initiation of inflammation. This lipid mediator is widely recognized as an essential mediator in inflammation (Peters-Golden and Henderson, 2007). Literature shows that LTB₄ stimulation leads to a number of functional responses important in host defense such as the secretion of lysosomal enzymes, the activation of NADPH oxidase activity, NO formation, and phagocytosis. LTB₄ also stimulates the expression of the β2-integrin (CD11b/CD18), an effect likely related to its ability to stimulate leukocyte migration and phagocytosis (Flamand et al., 2007).

Knowing the important role played by neutrophils as front-line

cells in innate immunity and the importance of LTB₄ in neutrophil functional responses, we investigated the effect of Cr-LAAO on LTB₄ production by this cell type. Results showed that Cr-LAAO induced a significant increase in LTB₄ liberation by neutrophils suggesting its participation along with IL-8 in neutrophil chemotaxis induced by Cr-LAAO. In addition, since the Cr-LAAO induced phagocytosis as well as production of ROS and literature documents that LTB₄ is involved in these neutrophil responses it is possible to suggest that this lipid mediator, found in this study contribute to the neutrophils activation induced by Cr-LAAO. In the literature, there is no data showing the effect of Cr-LAAO on LTB₄ liberation.

Literature shows that IL-1 and IL-8 induced increase of COX-2 expression (Dorsam and Gutkind, 2007; Maloney et al., 1998; Smith et al., 1996) and Cr-LAAO induced the release of IL-8 (Pontes et al., 2014). Therefore is possible to suggest that this chemokine may contribute to the signaling process inducing the expression of COX-2 and consequently stimulating the release of PGE₂. Since, Cr-LAAO stimulated neutrophils to produce PGE₂ we suggest that it is able to induce COX-2 expression.

In summary, the obtained data showed that Cr-LAAO does not affect the viability of human neutrophils. Cr-LAAO, in its native form, stimulates neutrophil chemotaxis, an event with the involvement of intracellular signalling mediated by p38 MAPK and PI3K. In inactive form, Cr-LAAO does not induce neutrophil chemotaxis. Cr-LAAO is also able to stimulate the production of hydrogen peroxide in neutrophils. Moreover, Cr-LAAO induces the release of MPO, IL-6, IL-8, LTB₄ and PGE₂. Finally, since LAAO from *Calloselasma rhodostoma* venom comprises 30% of crude venom (Ponnudurai et al., 1994) it is possible to affirm that this toxin plays an important role in local symptoms of the envenomation.

Authorship

J.P.Z. and A.S.P. designed the study; A.S.P., S.S.S. and N.M.N. performed the experiments; S.D.S., R.G.S and A.M.S. performed and supervised the biochemical procedures; J.P.Z., A.S.P. and A.M.S. collected and analyzed the data; J.P.Z., C.F.C.F. and R.G.S. provided reagents; J.P.Z., A.S.P., C.F.C.F. and A.M.S. wrote the manuscript. All of the authors discussed the results and implications and commented on the manuscript at all stages.

Funding

The authors express their gratitude to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Pesquisa Translacional em Saúde e Ambiente na Região Amazônica (INCT-INPeTAM), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas (INCT-Tox) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Rondônia (FAPERO) for the financial support. This study was supported by grants (482562/2010-2 and 479316-2013-6) from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Juliana Pavan Zuliani was a recipient of productivity grant 301809/2011-9 and 306672/2014-6 from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Adriana Silva Pontes was the beneficiary of CAPES by Doctoral's fellowship.

Conflict of interest

There is no conflict of interest statement.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://>

dx.doi.org/10.1016/j.toxicol.2016.05.013.

References

- Abdelkafi-Koubaa, Z., Aissa, I., Morjen, M., Kharrat, N., El Ayeb, M., Gargouri, Y., Srairi-Abid, N., Marrakchi, N., 2016. Interaction of a snake venom L-amino acid oxidase with different cell types membrane. *Int. J. Biol. Macromol.* 82, 757–764.
- Ali, S.A., Stoeva, S., Abbasi, A., Alam, J.M., Kayed, R., Faigle, M., Neumeister, B., Voelter, W., 2000. Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 384, 216–226.
- Ande, S.R., Kommoju, P.R., Draxl, S., Murkovic, M., Macheroux, P., Ghisla, S., Ferrando-May, E., 2006. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. *Apoptosis* 11, 1439–1451.
- Arimura, Y., Minoshima, S., Kamiya, Y., Tanaka, U., Nakabayashi, K., Kitamoto, K., Nagasawa, T., Sasaki, T., Suzuki, K., 1993. Serum myeloperoxidase and serum cytokines in anti-myeloperoxidase antibody-associated glomerulonephritis. *Clin. Nephrol.* 40, 256–264.
- Barnard, M.L., Matalon, S., 1992. Mechanisms of extracellular reactive oxygen species injury to the pulmonary microvasculature. *J. Appl. Physiol.* 72, 1724–1729.
- Bedard, K., Krause, K.H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313.
- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P., 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 994–1003.
- Bokoch, G.M., 1995. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* 86, 1649–1660.
- Borregaard, N., 1988. The human neutrophil. Function and dysfunction. *Eur. J. Haematol.* 41, 401–413.
- Boyden, S., 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 115, 453–466.
- Capodici, C., Hanft, S., Feoktistov, M., Pillinger, M.H., 1998. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates chemoattractant-stimulated, CD11b/CD18-dependent cell-cell adhesion of human neutrophils: evidence for an ERK-independent pathway. *J. Immunol.* 160, 1901–1909.
- Chippaux, J.P., Goyffon, M., 1998. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicol* 36, 823–846.
- Costa, T.R., Burin, S.M., Menaldo, D.L., de Castro, F.A., Sampaio, S.V., 2014. Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 20, 23. <http://dx.doi.org/10.1186/1678-9199-20-23>.
- Costa, T.R., Menaldo, D.L., Prinholato da Silva, C., Sorrechia, R., Albuquerque, S., Pietro, R.C., Ghisla, S., Antunes, L.M., Sampaio, S.V., 2015. Evaluating the microbicidal, antiparasitic and antitumor effects of CR-LAAO from *Calloselasma rhodostoma* venom. *Int. J. Biol. Macromol.* 80, 489–497.
- Curti, B., Ronchi, S., Pilone Simonetta, M., 1992. D- and L- amino acid oxidases. In: Muller, F. (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of Flavo-enzymes*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 69–94.
- Dale, D.C., Boxer, L., Liles, W.C., 2008. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112, 935–945.
- deKok, A., Rawitch, A.B., 1969. Studies on L-amino acid oxidase. II. Dissociation and characterization of its subunits. *Biochemistry* 8, 1405–1411.
- Dittmar, T., Brandt, B.H., Lang, K., Zaenker, K.S., Entschladen, F., 2000. Lessons from tumor and immunocompetent cells the quantitative engagement of ligand-receptor interactions modulates stop-and-go behaviour as well as proliferation. *Medicina* 2, 27–33.
- Dorsam, R.T., Gutkind, J.S., 2007. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 79–94.
- Du, X.Y., Clemetson, K.J., 2002. Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicol* 40, 659–665.
- Fielding, C.A., McLoughlin, R.M., McLeod, L., Chantal, S.C., Najdovska, M., Grail, D., Matthias, E., Jones, S.A., Topley, N., Jenkins, B., 2008. IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. *J. Immunol.* 181, 2189–2195.
- Flamand, L., Tremblay, M.J., Borgeat, P., 2007. Leukotriene B4 triggers the in vitro and in vivo release of potent antimicrobial agents. *J. Immunol.* 178, 8036–8045.
- Flanagan, R.S., Cosío, G., Grinstein, S., 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 355–666. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2128>.
- Gambardella, L., Vermeren, S., 2013. Molecular players in neutrophil chemotaxis—focus on PI3K and small GTPases. *J. Leukoc. Biol.* 94, 603–612. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.1112564>.
- Green, D.R., Reed, J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309–1312.
- Guo, C., Liu, S., Yao, Y., Zhang, Q., Sun, M.Z., 2012. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. *Toxicol* 60, 302–311.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C., 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92, 3007–3017.
- Handa, O., Naito, Y., Takagi, T., Shimozawa, M., Kokura, S., Yoshida, N., Matsui, H., Cpinskas, G., Kvietys, P.R., Yoshikawa, T., 2004. Tumor necrosis factor- induced cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) production by rat gastric epithelial cells: role of reactive oxygen species and nuclear factor- κ B. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309, 670–676.
- Hattori, H., Subramanian, K.K., Sakai, J., Luo, H.R., 2010a. Reactive oxygen species as signaling molecules in neutrophil chemotaxis. *Commun. Integr. Biol.* 3, 278–281.
- Hattori, H., Subramanian, K.K., Sakai, J., Jia, Y., Li, Y., Porter, T.F., Loison, F., Sarraj, B., Kasorn, A., Jo, H., Blanchard, C., Zirkle, D., McDonald, D., Pai, S.Y., Serhan, C.N., Luo, H.R., 2010b. Small-molecule screen identifies reactive oxygen species as key regulators of neutrophil chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 3546–3551. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0914351107>.
- Heit, B., Robbins, S.M., Downey, C.M., Guan, Z., Colarusso, P., Miller, B.J., Jirik, F.R., Kubes, P., 2008. PTEN functions to 'prioritize' chemotactic cues and prevent 'distraction' in migrating neutrophils. *Nat. Immunol.* 9, 743–752. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1623>.
- Henkels, K.M., Frondorf, K., Gonzalez-Mejia, M.E., Doseff, A.L., Gomez-Cambroneiro, J., 2011. IL-8-induced neutrophil chemotaxis is mediated by Janus kinase 3 (JAK3). *FEBS Lett.* 585, 159–166. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.11.031>.
- Izidoro, L.F., 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., Calderon, L.A., Stábéli, R.G., Soares, A.M., 2014. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. *Biomed. Res. Int.* 2014, 196754. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/196754>.
- Johnson, J.L., Moore, E.E., Douglas, Y., Tamura, D.Y., Zallen, G., Biffi, W.L., Silliman, C.C., 1998. Interleukin-6 augments neutrophil cytotoxic potential via selective enhancement of elastase release. *J. Sur. Res.* 76, 91–94.
- Kim, D., Haynes, C.L., 2013. The role of p38 MAPK in neutrophil functions: single cell chemotaxis and surface marker expression. *Analyst* 138, 6826–6833. <http://dx.doi.org/10.1039/c3an01076g>.
- Klyubin, I.V., Kirpichnikova, K.M., Gamaley, I.A., 1996. Hydrogen peroxide-induced chemotaxis of mouse peritoneal neutrophils. *Eur. J. Cell Biol.* 70, 347–351.
- Kolaczowska, E., Kubes, P., 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 159–175. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3399>.
- Lambert, A.J., Brand, M.D., 2004. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Biol. Chem.* 279, 39414–39420.
- Lenaz, G., Fato, R., Genova, M.L., Bergamini, C., Bianchi, C., Biondi, A., 2006. Mitochondrial complex I: structural and functional aspects. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 1406–1420.
- Lokuta, M.A., Huttenlocher, A., 2005. TNF- α promotes a stop signal that inhibits neutrophil polarization and migration via a p38 MAPK pathway. *J. Leukoc. Biol.* 78, 210–219.
- Maloney, C.G., Kutchera, W.A., Albertine, K.H., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., 1998. Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. *J. Immunol.* 160, 1402–1410.
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13.
- Naccache, P.H., Moliski, T.F., Borgeat, P., White, J.R., Sha'afi, R.I., 1985. Phorbol esters inhibit the fMet-Leu-Phe- and leukotriene B₄-stimulated calcium mobilization and enzyme secretion in rabbit neutrophils. *J. Biol. Chem.* 260, 2125–2131.
- Nakajima, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Mishima, S., Hara, H., 2009. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complement. Altern. Med.* 9, 4. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-9-4>.
- Nauseef, W.M., Borregaard, N., 2014. Neutrophils at work. *Nat. Immunol.* 15, 602–611. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2921>.
- Niethammer, P., Grabher, C., Look, A.T., Mitchison, T.J., 2009. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 459, 996–999. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08119>.
- Nordenfelt, P., Tapper, H., 2011. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 90, 271–284.
- Ono, K., Han, J., 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12, 1–13.
- Peters-Golden, M., Henderson Jr., W.R., 2007. Leukotrienes. *N. Engl. J. Med.* 357, 1841–1854.
- Pick, E., Keisari, Y., 1980. A simple colorimetric method for measurement of hydrogen peroxide by cells in culture. *J. Immunol. Methods* 38, 161–170.
- Pick, E., Mizel, D., 1981. Rapid microassay for the measurement of peroxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Methods* 46, 211–226.
- Ponnudurai, G., Chung, M.C., Tan, N.H., 1994. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 313, 373–378.
- Pontes, A.S., Setúbal, S.S., Xavier, C.V., Lacouth-Silva, F., Kayano, A.M., Pires, W.L., Nery, N.M., Castro, O.B., da Silva, S.D., Calderon, L.A., Stábéli, R.G., Soares, A.M., Zuliani, J.P., 2014. Effect of L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodostoma* snake venom on human neutrophils. *Toxicol* 80, 27–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicol.2013.12.013>.
- Pradelles, P., Grassi, J., Maclouf, J., 1985. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. *Anal. Chem.* 57, 1170–1173.
- Roos, D., Weening, R.S., Wyss, S.R., Aebi, H.E., 1980. Protection of human neutrophils by endogenous catalase. Studies with cells from catalase-deficient individuals. *J. Clin. Invest.* 65, 1515–1522.
- Russo, M., Teixeira, H.C., Marcondes, M.C.G., Barbutto, J.A.M., 1989. Superoxide-independent hydrogen release by active macrophages. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 22, 1271–1273.
- Segal, A.W., Harper, A., Garcia, R., Jones, O.T., Cross, A.R., Geisow, M., 1982. The nature and function of the microbicidal oxidase system of neutrophils. *Adv. Exp. Med. Biol.* 141, 401–409.
- Sim, S., Yong, T.S., Park, S.J., Im, K.I., Kong, Y., Ryu, J.S., Min, D.Y., Shin, M.H., 2005. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species-mediated activation of ERK1/2

- is required for apoptosis of human neutrophils induced by *Entamoeba histolytica*. *J. Immunol.* 174, 4279–4288.
- Smith, W.L., Gavavito, R.M., Dewitt, D.L., 1996. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 271, 33157–33160.
- Solis, C., Escobar, E., Yarleque, E., Gutierrez, S., 1999. Purificación y caracterización de la L-amini oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* jergon shushupe. *Rev. Peru. Biol.* 6, 75–84.
- Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., Fujikur, T., 1983. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal. Biochem.* 132, 345–352.
- Torii, S., Yamane, K., Mashima, T., Haga, N., Yamamoto, K., Fox, J.W., Naito, M., Tsuruo, T., 2000. T. Molecular cloning and functional analysis of apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. *Biochemistry* 39, 3197–3205.
- van Kessel, K.P., Bestebroer, J., van Strijp, J.A., 2014. Neutrophil-mediated phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Front. Immunol.* 5, 467. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00467>.
- Wei, X.L., Wei, J.F., Li, T., Qiao, L.Y., Liu, Y.L., Huang, T., He, S.H., 2007. Purification, characterization and potent lung lesion activity of an L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* snake venom. *Toxicon* 50, 1126–1139.
- Wellner, D., Meister, A., 1960. Crystalline L-amino acid oxidase of *Crotalus adamanteus*. *J. Biol. Chem.* 235, 2013–2018.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L., 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Investig.* 80, 617–653.
- Woodfin, A., Voisin, M.B., Nourshargh, S., 2010. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr. Opin. Hematol.* 17, 9–17.
- Zmijewski, J.W., Lorne, E., Zhao, X., Tsuruta, Y., Sha, Y., Liu, G., Siegal, G.P., Abraham, E., 2008. Mitochondrial respiratory complex I regulates neutrophil activation and severity of lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 168–179. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200710-1602OC>.
- Zuliani, J.P., Kayano, A.M., Zaqueo, K.D., Coutinho-Neto, A., Sampaio, S.V., Soares, A.M., Stábeli, R.G., 2009. Snake venom L-amino acid oxidases: some consideration about their functional characterization. *Prot. Pep. Lett.* 16, 908–912.