



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ISABEL CRISTINA OLIVEIRA DE MORAIS**

EFEITO NEFROTÓXICO DIRETO INDUZIDO PELA FRAÇÃO  
L-AMINOÁCIDO OXIDASE ISOLADA DO VENENO DA SERPENTE  
*Bothrops leucurus*.

ORIENTADORA: ALICE MARIA COSTA MARTINS

Fortaleza

2015

ISABEL CRISTINA OLIVEIRA DE MORAIS

EFEITO NEFROTÓXICO DIRETO INDUZIDO PELA FRAÇÃO  
L-AMINOÁCIDO OXIDASE ISOLADA DO VENENO DA SERPENTE  
*Bothrops leucurus*.

Tese de doutorado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Farmacologia.

ORIENTADORA: ALICE MARIA COSTA MARTINS

Fortaleza

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca de Ciências da Saúde

---

M825e Morais, Isabel Cristina Oliveira de.

Efeito nefrotóxico direto induzido pela fração I-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops leucurus*/ Isabel Cristina Oliveira de Moraes. – 2015.

96 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2015.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

1. Nefropatias. 2. Toxicidade. 3. Apoptose. 4. L-Aminoácido Oxidase. I. Título.

CDD 615.1

---

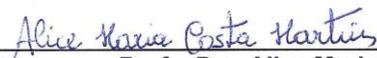
ISABEL CRISTINA OLIVEIRA DE MORAIS

**“Efeito nefrotóxico direto induzido pela fração L-Aminoácido  
Oxidase isolada de veneno da serpente *Bothrops leucurus*”**

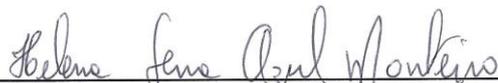
Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor. Área de concentração em Farmacologia.

Aprovada em 16/09/2015

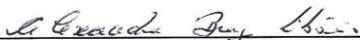
BANCA EXAMINADORA



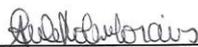
**Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins**  
Orientadora  
Universidade Federal do Ceará



**Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro**  
Universidade Federal do Ceará



**Prof. Dr. Alexandre Braga Libório**  
Universidade Federal do Ceará – UFC



**Profa. Dra. Arlândia Cristina Lima Nobre de Moraes**  
Universidade de Fortaleza – UNIFOR



**Profa. Dra. Lucília Maria Abreu Lessa Leite Lima**  
Universidade Estadual do Ceará – UECE.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Socorro e Vicente.  
À minha irmã Vilmara e ao meu sobrinho Nathan.

## AGRADECIMENTOS

À Deus que guia e protege minha vida, pelas oportunidades e conquistas. Por me dar força e coragem para enfrentar os momentos difíceis.

Aos meus pais (Socorro e Vicente), minha Irmã (Vilmara) e a toda minha família por todo o amor, apoio, educação, exemplo, confiança e incentivo durante minha vida.

À Professora Dra. Alice Maria Costa Martins, pela orientação, exemplo, dedicação e incentivo à pesquisa.

À Enrique Pérez Payá (*in memoriam*) e Mar Orzáez Cataluyad por terem me aceitado no laboratório de Peptídeos e Proteínas e por tudo que fizeram para meu aprendizado como pesquisadora e para melhorar este trabalho.

Aos meus grandes amigos Roberta Jeane, Sonnara Correia, Gustavo Pereira, Aline Marinho, Dânya Bandeira, Melca Amanda, Mary Sandra e Jennifer Cabral pela força no dia a dia, pelas confidências, cumplicidade e amizade. Espero tê-los para sempre em minha vida.

As amigas Roberta Jeane, Larissa Gonçalves e Janaina Serra Azul pela amizade e companheirismo durante o período do doutorado sanduíche na Espanha.

Aos amigos do Laboratório de Nefrologia e Doenças Tropicais (LNDDT): Ramon Róseo, Tiago Sampaio, Dânya Bandeira, Clarissa Perdigão, Louise Tessarolo, Jáder Canuto, Lívia Fernandes, Gabriela Freire, Gdaylon Cavalcante, Marcus Felipe, Ticiano Praciano, Alba Fabíola e Rodrigo Tavares, pela ajuda nos experimentos, a amizade e o excelente convívio.

A todos os amigos do Grupo de Pesquisa de Sinalização e Morte Celular por me proporcionarem um ambiente de trabalho maravilhoso, pelo apoio, amizade e profissionalismo. Em especial a Soraya Soubhi Smaili por sempre ter me recebido em seu grupo de pesquisa, a Gustavo Pereira e Hanako Hirata pela amizade e ajudas científicas.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas (LAFAVET). Em especial a Dra Helena Serra Azul Monteiro, Roberta Jeane, Rafael Jorge, Natacha Tereza, Aline Marinho, João Vitor, Adelvane e Antônio Neto.

A todos do laboratório de Peptídeos e Proteínas e do Centro de Investigação Príncipe Felipe, pelo acolhimento e pela excelente assistência científica e técnica. Em especial a Tatiana Guevara, Vicente Andreu, Guillermo Garcia e Cristina Paredes.

À Banca examinadora, pelo aceite ao convite.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido na forma de bolsa de doutorado para parte realizada no país e para parte desenvolvida na Espanha.

À todos os professores que tive nessa longa jornada, que construíram passo a passo o conhecimento que hoje detenho. Obrigada pela dedicação, amor e competência.

Agradeço a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta em minha formação.

À todos meus sinceros agradecimentos.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

“La mejor recompensa que puede tener un científico es ver que su trabajo, y el de toda la gente que trabaja con él, pueda devolver a la sociedad esa inversión que hace con nosotros o si pudiéramos mejorar, al menos un poco, la salud de las personas. ”

Enrique Pérez Payá

## RESUMO

A *Bothrops leucurus* (jararaca do rabo branco) é uma serpente peçonhenta que habita a região Nordeste do Brasil. Os efeitos biológicos devido ao envenenamento por *B. leucurus* têm perfil semelhante àqueles apresentados por outras serpentes do gênero *Bothrops*, tais como, importantes efeitos locais e sistêmicos graves como a Insuficiência Renal Aguda (IRA). O veneno de *Bothrops leucurus* induziu nefrotoxicidade em sistema de perfusão de rim isolado de rato, associado com citotoxicidade em células tubulares epiteliais renais. Neste trabalho foi avaliado o efeito nefrotóxico direto da enzima L-aminoácido oxidase isolada do veneno de *Bothrops leucurus* (LAAO-*Bl*) sobre células epiteliais renais (MDCK e HK2) e o seu potencial nefrotóxico em rim isolado de rato. O tratamento com LAAO-*Bl*, 1,56 – 100 µg/mL induziu significativa morte celular de maneira concentração dependente em ambas às linhagens celulares após 12 horas de tratamento. Nas células MDCK não foi observada liberação de LDH após 12 horas de exposição à LAAO-*Bl*, enquanto nas células HK2 LAAO-*Bl* induziu ruptura de membrana nas maiores concentrações estudadas quando comparado ao controle não tratado. Nas células MDCK o tratamento com LAAO-*Bl* aumentou significativamente a porcentagem de células em apoptose (Anexina-V+, IP-), necrose (Anexina-V-, IP+) e necrose secundária (Anexina-V+, IP+). Nas células HK2 LAAO-*Bl* induziu um aumento na porcentagem de células em necrose (IP+) e necrose secundária (Anexina-V+, IP+) de maneira concentração dependente. A indução de apoptose nas células MDCK foi acompanhada de liberação de Ca<sup>2+</sup> do retículo endoplasmático, aumento de espécies reativas de oxigênio, disfunção mitocondrial e aumento de expressão de Bax. O tratamento com LAAO-*Bl* induziu ativação de caspase 3 e 7 em ambas as linhagens celulares. LAAO-*Bl* (10 µg/mL) exerce efeitos significativos no rim isolado de rato aumentando a pressão de perfusão e o fluxo urinário e diminuindo a taxa de filtração glomerular e os transportes tubulares de sódio, potássio e cloreto. Os nossos resultados sugerem que LAAO-*Bl* contribui para nefrotoxicidade observada no envenenamento por *Bothrops leucurus*. Além disso, os efeitos citotóxicos de LAAO-*Bl* nas células epiteliais renais podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pela nefrotoxicidade observada no rim isolado.

**Palavras-chave:** Nefropatias; Toxicidade; Apoptose; L-Aminoácido Oxidase

## ABSTRACT

Title: Effect direct nephrotoxic induced by L-aminoacid oxidase isolated of *Bothrops leucurus* venom

The pit viper *Bothrops leucurus* (White-tailed-jararaca) is a poisonous snake habituating area in the northeast of Brazil. The biological effects due envenomation have similar profile than those observed with other *Bothrops*, such as important severe local and systemic effects such as Acute Renal Failure (ARF). *Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney of rats associated with cytotoxicity against renal tubular epithelia cells. In this study, it was evaluated the direct nephrotoxicity of L-aminoacid oxidase isolated of *B. leucurus* venom (LAAO-*Bl*) on renal epithelial cells (MDCK and HK2) and their potential nephrotoxic in isolated rat kidney. In these cells treated with LAAO-*Bl*, 1.56 – 100 µg/mL for 12 h, there was a decrease in their viability in a concentration-dependent manner after 12 hours of treatment. In MDCK cells LDH release was not observed after 12 h of LAAO-*Bl* exposure while LAAO-*Bl* induced membrane rupture in HK-2 cells at the highest concentrations studied when compared with untreated cells. In MDCK cells, LAAO-*Bl* significantly increased the percentage of early apoptotic (Annexin-V+, PI-), necrotic (Annexin-V-, PI+) and secondary necrotic cells (Annexin-V+, PI+) when compared with control untreated cells. In HK-2 cells LAAO-*Bl* induced an increase in necrotic (PI+ cells) and secondary necrotic cells (Annexin-V+, PI+) in a concentration-dependent manner. MDCK apoptosis induction was accompanied with Ca<sup>2+</sup> release from the endoplasmic reticulum, reactive oxygen species (ROS) generation, mitochondria dysfunction with enhanced expression of Bax protein levels. LAAO-*Bl* induced caspase-3 and caspase-7 activation in both cell lines. LAAO-*Bl* (10 µg/mL) exerts significant effects on the isolated kidney perfusion increasing perfusion pressure and urinary flow and decreasing the glomerular filtration rate and sodium, potassium and chloride tubular transport. Taken together our results suggest that LAAO-*Bl* contributes for the nephrotoxicity observed in the envenomation by *Bothrops leucurus*. Moreover, the cytotoxic of LAAO-*Bl* to renal epithelial cells might be responsible, least in part for the nephrotoxicity observed in isolated kidney.

**Keywords:** Nephropathy; Toxicity, Apoptosis, L- aminoacid oxidase.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> - concentração citoplasmática de íons cálcio
- 2-APB - Borato de 2-Aminoetoxidifenil
- Ac-DEVD-AFC - Acetil-Asp-Glu-Val-Asp- 7-amino-trifluorometil-coumarina
- AM - acetoximetil éster
- AnnV - Anexina V
- APAF-1 - Fator de Ativação Associado a apoptose-1
- BSA - albumina sérica bovina
- Ca<sup>2+</sup> - íon cálcio
- CAT - catalase
- DCFH-DA - 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato
- DISC - *Disc Inducing Signaling Complex*
- DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's medium*
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DOXO - Doxorrubicina
- DR - *Death Receptors*
- DTT - Ditioneitol
- EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Ácético
- EGTA - Ácido Etileno Glicol Tetracético
- EROS - Espécies Reativas de Oxigênio
- FCCP - Carbonilcianeto-p-tri fluorometoxifenilhidrazon
- FU - Fluxo Urinário
- HK2 - *Human Kidney 2*
- IP - Iodeto de propídeo
- IP3R - Receptor de trifosfato de inositol
- IRA - Insuficiência Renal Aguda
- LAAO - L- aminoácido oxidase
- LAAO- *BI* - LAAO isolada de *Bothrops leucurus*
- LDH - Lactato desidrogenase
- MDCK - *Madin-Darby Canine Kidney*

MS - Ministério da Saúde  
MTT - 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
%TCl - Percentual de cloreto transportado  
%TK<sup>+</sup> - Percentual de potássio transportado  
%TNa<sup>+</sup> - Percentual de sódio transportado  
PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonio  
PP - pressão de perfusão  
PS - fosfatidilserina  
RE - Retículo Endoplasmático  
RFG - Ritmo de Filtração Glomerular  
rTNF - Receptor de fator de necrose tumoral  
RVR - Resistência Vascular Renal  
RyR - Receptor de rianodina  
SBF - Soro Bofino Fetal  
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio  
SERCA - Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo endoplasmático  
SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação  
svLAAO - L- aminoácido oxidase isolada de veneno de serpente  
svMPS - Metaloproteinases isoladas de venenos de serpentes  
svPLA2 - Fosfolipase isolada de venenos de serpente  
TAP - tapsigargina  
t-BHP - Tert-Butilhidroperóxido  
TMRE - *Tetramethylrhodamine ethyl ester*  
 $\Delta\Psi_m$  - potencial de membrana mitocondrial

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Bothrops leucurus</i>	21
Figura 2: Distribuição geográfica da serpente <i>Bothrops leucurus</i>	22
Figura 3: Composição química do veneno botrópico	23
Figura 4: Fisiopatologia dos efeitos renais induzidos pelo veneno botrópico e suas toxinas	28
Figura 5: Vias de sinalização da apoptose	31
Figura 6: Esquema da ação de componentes de peçonhas ofídicas na morte celular apoptótica	32
Figura 7: Esquema do ensaio do MTT	42
Figura 8: Esquema do ensaio de LDH	43
Figura 9: Esquema do ensaio de marcação com Anexina V/PI	44
Figura 10: Esquema da medida de variação de $Ca^{2+}$ intracelular	47
Figura 11: Foto do sistema de perfusão de rim isolado	53
Figura 12: Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado	53
Figura 13: Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n = 6)	54
Figura 14: Valores registrados pelo fluxômetro (L/min) durante a calibração do sistema (n=6)	54
Figura 15: Valores de volume urinário (mL/min) registrados durante a calibração do sistema (n = 6)	55
Figura 16: Fotografia do rim de rato isolado no sistema de perfusão	56
Figura 17: Efeito da LAAO- <i>Bl</i> sobre a viabilidade de células tubulares renais	61
Figura 18: Efeito da LAAO- <i>Bl</i> sobre a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH)	62
Figura 19: Análise do tipo de morte celular por citometria de fluxo	63
Figura 20: Medida do $\Delta\Psi_m$ nas células MDCK	64
Figura 21: Efeito da LAAO- <i>Bl</i> na mobilização de cálcio citosólico nas células MDCK	66

Figura 22: Determinação do aumento intracelular de ROS nas células MDCK	67
Figura 23: Avaliação da ativação de caspases executores	69
Figura 24: Western blotting das proteínas envolvidas na morte celular por apoptose	70
Figura 25: Efeito da LAAO- <i>B</i> na liberação de citocromo c no citosol nas células HK2	71
Figura 26: Efeitos da LAAO- <i>B</i> em rim isolado de rato	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos de nefrotoxicidade direta com venenos de Bothrops no modelo de perfusão de rim isolado de rato.	57
---	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	19
1.1 Gênero <i>Bothrops</i> e <i>Bothropoides</i>	19
1.1.1 <i>Bothrops leucurus</i>	21
1.1.1.1 Distribuição geográfico- epidemiológica	22
1.2 Veneno botrópico	23
1.2.1 Composição química	23
1.2.2 Efeitos tóxicos	26
1.2.2.1 Insuficiência Renal Aguda (IRA)	27
1.2.2.1.1 Nefrotoxicidade direta induzida pelo veneno botrópico e seus componentes	29
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	36
<b>3. OBJETIVOS</b>	38
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	40
4.1 Materiais	40
4.1.1 Obtenção de LAAO- <i>Bl</i>	40
4.2 Linhagens Celulares	40
4.2.1 Cultivo das linhagens celulares	41
4.3 Estudo da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	41
4.3.1 Ensaio com MTT	41
4.3.1.1 Princípio do método	41
4.3.2 Ensaio de atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH)	42
4.3.2.1 Princípio do método	42
4.4 Detecção de células apoptóticas e necróticas por marcação com Anexina V/Iodeto de propídeo	44
4.4.1 Princípio do método	44

4.5 Medida do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )	45
4.5.1 Princípio do método	45
4.6 Medidas da variação do $\text{Ca}^{2+}$ intracelular	46
4.6.1 Princípio do método	46
4.7 Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)	48
4.7.1 Princípio do método	48
4.8 Ensaio de ativação da caspase 3 e 7	49
4.8.1 Princípio do método	49
4.9 Análise de proteínas por western blott	50
4.9.1 Extratos proteicos totais	50
4.9.2 Eletroforese das proteínas em SDS-PAGE	50
4.9.3 Imunodeteção de proteínas (Western blot)	51
4.10 Ensaio de liberação de citocromo c	51
4.10.1 Princípio do método	51
4.11 Perfusão de rim isolado	52
4.11.1 Animais	52
4.11.2 Sistema utilizado	52
4.11.2.1 Calibração do sistema	53
4.11.3 Análises bioquímicas	57
4.11.4 Cálculo dos parâmetros funcionais renais	57
4.12 Análise estatística	58
4.13 Comitê de Ética	59
<b>5. RESULTADOS</b>	61
5.1 Efeito da LAAO- <i>Bl</i> sobre a viabilidade das células tubulares renais (MDCK e HK2).	61
5.2 Efeito da LAAO- <i>Bl</i> sobre a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH).	61
5.3 Análise do tipo de morte celular por citometria de fluxo	62
5.4 Efeito da LAAO- <i>Bl</i> sobre o potencial de membrana mitocondrial nas células MDCK	63
5.5 Efeito da LAAO- <i>Bl</i> na mobilização de cálcio citosólico nas células MDCK	65
5.6 Estresse oxidativo induzido por LAAO- <i>Bl</i> nas células MDCK	66

5.7 Avaliação da ativação de caspases executores do processo de morte celular por apoptose	68
5.8 Avaliação da liberação de citocromo c induzido por LAAO- <i>Bl</i> nas células HK2	71
5.9 Efeitos da LAAO- <i>Bl</i> em rim isolado de rato	72
<b>6. DISCUSSÃO</b>	76
<b>7. CONCLUSÕES</b>	84
<b>REFERÊNCIAS</b>	86



# *INTRODUÇÃO*

## 1. INTRODUÇÃO

Envenenamento por serpentes, reconhecido como uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), constitui um importante problema de saúde pública, particularmente em áreas rurais de países tropicais como África, Ásia e América Latina (WHO, 2009; MARTINES *et al.*, 2014). Dentre os países da América do Sul o Brasil é o país com o maior número de acidentes com aproximadamente 20.000 casos notificados por ano e uma taxa de letalidade de 0,45% (LEITE *et al.*, 2013). De acordo com os dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do ministério da Saúde (MS) ocorreram nos anos de 2000 a 2013, mais de 360.506 casos de acidentes por serpentes no Brasil, resultando em 1.487 óbitos (BRASIL, 2013).

O Brasil possui uma vasta fauna ofídica totalizando 381 espécies, distribuídas em 10 famílias e 75 gêneros. Apenas 2 famílias (*Elapidae* e *Viperidae*) reúnem as espécies chamadas de peçonhentas, ou seja, aquelas que produzem toxinas em suas glândulas especializadas e possuem aparelhos apropriados para inoculá-las (BÉRNILS, 2012).

Dentre as famílias de serpentes peçonhentas existentes no Brasil, destaca-se a família *Viperidae*, pela gravidade dos acidentes que causam. Essa família é composta pelos gêneros *Bothrops*, *Bothropoides*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Rhinocerophis*, *Crotalus* e *Lachesis* (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

### 1.1 Gênero *Bothrops* e *Bothropoides*

Na América do Sul, serpentes do gênero *Bothrops* apresentam um alto interesse científico, pois são as maiores causadoras de envenenamentos ofídicos (HIGUCHI *et al.*, 2007; ACOSTA, 2010). No Brasil, são responsáveis por cerca de 90% dos acidentes ofídicos notificados. Esse gênero compreende cerca de 30 espécies e são popularmente conhecidas como jararacas (CARRASCO *et al.*, 2012).

As serpentes pertencentes a este gênero são caracterizadas por possuírem a cauda sem maiores modificações, geralmente com escamas subcaudais em pares,

cabeça triangular e fosseta loreal. Habitam preferencialmente os ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas. Possuem hábitos noturnos ou crepusculares, são consideradas muito agressivas e chegam a atacar sem causar ruídos (MELGAVAREJO, 2003; ALBUQUERQUE; COSTA; CAVALCANTE, 2004). Possuem um alto grau de especialização no aparato venenífero, caracterizado pela presença de complexos sistemas de produção e armazenamento do veneno, bem como modificações morfológicas importantes, como musculatura cefálica bem desenvolvida, sobretudo próxima às glândulas de veneno, além de dentes móveis e canaliculados, implantados na parte anterior do maxilar, que permite a ereção das presas para frente no momento do bote (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003).

Devido a grande diversidade de serpentes do gênero *Bothrops*, as relações filogenéticas não são completamente definidas e a separação das serpentes em diferentes gêneros é frequentemente necessária (SOUSA *et al.*, 2013). Em 2009, levando em consideração as variações morfológicas e moleculares, foi criada uma nova espécie e reclassificadas algumas espécies anteriormente pertencentes ao gênero *Bothrops*; este gênero foi nomeado por *Bothropoides* e contém 11 espécies: *Bothropoides alcatraz*, *Bothropoides diporus*, *Bothropoides erythromelas*, *Bothropoides insularis*, *Bothropoides jararaca*, *Bothropoides lutzi*, *Bothropoides marmoratus*, *Bothropoides Mattogrossensis*, *Bothropoides neuwiedi*, *Bothropoides pauloensis* e *Bothropoides pubescens*. Essa nova classificação é aceita e fornecida pela Sociedade Brasileira de Herpetologia (FENWICK *et al.*, 2009).

Algumas espécies apresentam maior importância devido sua ampla distribuição geográfica como: a *B. atrox*, encontradas no Norte do Brasil; *B. jararaca*, distribuídas na região Sul e Sudeste do país; *B. jararacussu*, encontradas no cerrado da região Central e em florestas tropicais da região Sudeste; *B. alternatus*, distribuídas ao Sul do país; *B. moojeni* na região Centro Oeste e Sudeste; *B. erythromelas* e *B. leucurus* principalmente na região Nordeste (PINHO, PEREIRA, 2001; MELGAVAREJO, 2003).

### 1.1.1 *Bothrops leucurus*

A serpente *Bothrops leucurus* foi descrita pela primeira vez por Wagler em 1824 e pertencia a um complexo da *Bothrops atrox*, o qual compreendia as serpentes *Bothrops marajoensis*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops asper*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops colombienses*, *Bothrops isabelae*, *Bothrops lanceolatus aidae*, *Bothrops lanceolatus nacaridae*. Na década de 60, as serpentes incluídas neste complexo, foram divididas em espécies distintas de acordo com sua localização geográfica e a composição dos venenos (WÜSTER *et al.*, 1997).

É popularmente conhecida como jararaca-do-rabo-branco e/ou caiçara, quando filhote, e malha-de-sapo, cabeça de capanga e jararaca, quando adulta (LIRA-DA-SILVA, 2009). Apresenta um par de fossetas loreais (órgão termorreceptor), um olho e uma narina de cada lado de sua cabeça, daí sua denominação popular de cobra de “quatro-ventas”. A dentição é do tipo solenóglifa, é uma espécie de médio porte (28 a 187 cm) que possui vários padrões de coloração. Diferenças mais marcantes podem ser encontradas entre indivíduos adultos e jovens. Geralmente apresentam um padrão dorsal cinza ou amarronzado, com manchas negras em formato de “V” invertido (Figura 1). Apresentam também uma faixa pós-ocular bem definida e um ventre enxadrezado de coloração cinza e amarelada (PORTO; TEIXEIRA, 1995).



Figura 1: *Bothrops leucurus* (Fonte: <http://www.venomland.org>).

### 1.1.1.1 Distribuição geográfica epidemiológica.

Sua incidência varia desde o Norte da região Sudeste (Espírito Santo) até o Nordeste brasileiro (Figura 2). No Nordeste a distribuição dessa espécie é mais ampla, se estendendo para o norte do Estado do Maranhão, Sul do Ceará e na Bahia ela ocorre na Chapada Diamantina e no Chapadão Ocidental de São Francisco (MELGAVAREJO, 2003). É comum em áreas florestadas do Nordeste e se adapta bem em ambientes urbanos, incluindo os ambientes peridomiciliares. Foi registrada a incidência dessa espécie também na região de Caatinga na Bahia (ULLOA *et al.*, 2004), em que prevalece a vegetação secundária desse tipo de ecossistema, altamente impactado pela ação antrópica. Além disso, ela também foi localizada em remanescentes da Mata Atlântica no Estado de Pernambuco. Essa incidência indica que *B. leucurus* está aumentando a sua distribuição geográfica para áreas com diferentes características pedoclimáticas e vegetacionais, invadindo diferentes biotas, fato provavelmente favorecido pelo desmatamento e pela sua grande plasticidade ecológica (GUARNIERI *et al.*, 2000; LIMA-DUARTE *et al.*, 2003).



Figura 2: Distribuição geográfica da serpente *Bothrops leucurus*. (Fonte: [www.luar.dcc.ufmg.br](http://www.luar.dcc.ufmg.br)).

Do ponto de vista médico, *Bothrops leucurus* constitui uma importante serpente causadora de acidentes no Nordeste do Brasil. Juntamente com a *Bothropoides erytromelas*, são as responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos notificados nesta região.

## 1.2 Veneno botrópico

### 1.2.1 Composição química

Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* são constituídos por uma complexa mistura de componentes proteicos e não proteicos, com diferentes estruturas e atividades bioquímicas específicas (DE MARCO *et al.*, 2015). Todos estes componentes sofrem grande variabilidade, tanto inter como intraespecífica, as quais são decorrentes da idade, sexo, sazonalidade, variação geográfica e alimentação das serpentes (JORGE *et al.*, 2015).

Os maiores componentes proteicos do veneno (cerca de 90% do peso seco), com ou sem atividade catalítica, são neurotoxinas, cardiotoxinas, lectinas, disintegrinas, peptídeos natriuréticos, proteinases (metaloproteinases, serino proteinases), fosfolipases, L-aminoácido oxidases, fosfodiesterases, nucleotidasas, hialuronidasas, acetilcolinesterases, fatores de crescimento e ativadores de proteína C (DE TONI *et al.*, 2015). Enquanto os componentes não proteicos incluem constituintes orgânicos e não orgânicos (MATSUI *et al.* 2004; RAJENDRA *et al.* 2004) (Figura 3). Dentre todos os compostos proteicos, os que merecem destaque são as enzimas fosfolipase A<sub>2</sub>, metaloproteinases, serinoproteinases e L-aminoácido oxidases, devido ao seu valor farmacológico, medicinal e biotecnológico.



Figura 3: Composição química do veneno botrópico (Fonte: DE TONI *et al.*, 2015).

As fosfolipases isoladas de venenos de serpentes (svPLA<sub>2</sub>s) são enzimas secretórias de baixo peso molecular (13 a 15 kDa), estáveis, requerem cálcio para desempenhar sua atividade catalítica e agem sobre substratos lipídicos

(principalmente fosfolipídios) (FERREIRA *et al.*, 2013). Atuam catalisando a hidrólise especificamente na ligação 2-acil éster de fosfolipídios, liberando como produtos os lisofosfolipídios e ácidos graxos livres (GARCIA-DENEGRI *et al.*, 2014). svPLA2s são muito tóxicas e iniciam um importante papel na imobilização da presa. Em um único veneno podem ocorrer várias isoenzimas, cujos efeitos farmacológicos podem variar consideravelmente. Esses efeitos incluem ação hemolítica indireta, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, agregação de plaquetas, anticoagulante, edematogênica, miotóxica, bactericida e pró-inflamatória. Nos venenos botrópicos, estas enzimas estão relacionadas à mionecrose local que pode provocar sequelas drásticas, como perda tecidual permanente, incapacidade ou amputação do membro afetado (GHAZARYAN *et al.*, 2014).

As metaloproteases e serinoproteases são complexos de proteases que atuam sobre diferentes alvos hemostáticos e ajudam na digestão de presas, promovendo danos teciduais. As metaloproteinases são um grupo de endopeptidases, dependentes de cálcio ou zinco ligados no sítio ativo para possuírem atividade, desempenham um papel central no envenenamento, e são classificadas em cinco superfamílias sendo uma delas a família metzincinas, da qual fazem parte as metaloproteinases isoladas dos venenos de serpentes (svMPs) (DE PAULA *et al.*, 2014).

Metaloproteinases de venenos de serpentes têm sido objeto de muito estudo devido à importância que estas desempenham no envenenamento. Em geral, a ação das SVMPs relaciona-se com a proteólise de componentes da matriz extracelular (colágeno tipo IV, laminina e fibronectina), proteínas plasmáticas (fibrina, fibrinogênio, fator Von Willenbrand e pró-trombina) e das proteínas da superfície celular (integrinas e caderinas). Estes efeitos promovem diversas alterações patológicas, tais como hemorragia, inibição da agregação plaquetária, coagulopatia, mionecrose, edema, equimose e resposta inflamatória (BERNADONI *et al.*, 2014).

As serinoproteases estão associadas aos distúrbios hemostáticos devido à sua atuação nos componentes da cascata da coagulação sanguínea e do sistema fibrino(geno)lítico (ZAQUEO *et al.*, 2014). Apresentam outras funções, podendo estar envolvidas na digestão da presa, ativação do sistema complemento e diferenciação celular. Individualmente, essas enzimas não são consideradas letais, mas elas

contribuem para o efeito tóxico quando combinadas com outras proteínas presentes no veneno (BRAUD *et al.*, 2000). Na captura de presas, as serino proteinases agem em conjunto com as metaloproteinases, que também podem apresentar atividade fibrinogenolítica, produzindo uma hemorragia incontrolável no animal capturado, facilitando sua digestão (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009).

Outro importante componente protéico encontrado nos venenos botrópicos é a enzima L-aminoácido oxidase (LAAO). LAAOs são flavoenzimas que catalisam a desaminação estereoespecífica de um substrato L-aminoácido, a um  $\alpha$ -cetoácido correspondente, com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia. Essas enzimas são amplamente distribuídas em venenos de serpentes da família *Viperidae*, *Crotalidae* e *Elapidae*. Nos venenos botrópicos pode chegar a 30% do teor total de proteína (TAN *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2014).

L-aminoácido oxidases isoladas dos venenos de serpentes (svLAAOS) apresentam grande similaridade, como, massa molecular e sequência N-terminal. Estruturalmente são glicoproteínas (3-4%), homodiméricas ácidas ou básicas, se ligam a FMN (flavina mononucleotídeo) e FAD (flavina adenina dinucleotídeo) como co-fatores, têm massa molecular de 120-150 kDa na forma nativa e 55-56 kDa na forma monomérica (CALDERON *et al.*, 2014).

Até a década de noventa, os estudos realizados com LAAOs foram restritos as características estruturais e funcionais destas enzimas (DU, CLEMETSON, 2002). Atualmente LAAOs têm atraído o interesse de pesquisadores devido aos seus efeitos polifuncionais em diferentes sistemas biológicos. Os estudos mostraram evidentes efeitos sobre a agregação plaquetária, formação de edema, hemorragia, antimicrobianos, antivirais, anti-HIV e citotóxicos para células tumorais. O mecanismo pelo qual LAAO participa da toxicidade dos venenos é desconhecido. Entretanto, essa enzima libera  $H_2O_2$  quando oxidada, o que provavelmente desempenha um importante papel na sua toxicidade, pois sua atividade antibacteriana, citotóxica e agregante plaquetária é inibida por catalase (STABELI *et al.*, 2007; NAUMAN *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2014).

### 1.2.2 Efeitos tóxicos

Os componentes ativos do veneno botrópico possuem importantes atividades fisiopatológicas, com ação proteolítica, coagulante e hemorrágica (OLIVEIRA *et al.*, 2009; CAMPOS *et al.*, 2013).

A ação proteolítica caracteriza-se por lesão do tecido local proeminente, desenvolve-se rapidamente após o acidente e pode resultar em sequelas permanentes. A patogênese é complexa, decorrente da ação de várias enzimas presentes no veneno, dentre elas, as metaloproteinases, hialuronidases, fosfolipases A<sub>2</sub> (STUQUI *et al.*, 2015). Estas enzimas podem atuar por ação direta sobre diferentes substratos, causando lesão tecidual através da ativação/liberação de mediadores celulares e moleculares do processo inflamatório. O quadro clínico caracteriza-se por manifestações locais importantes como dor e edema de caráter precoce e progressivo. Frequentemente surgem equimoses, lesões bolhosas e sangramentos no local da picada. Nos casos mais graves, pode ocorrer necrose de tecidos moles com formação de abscessos e desenvolvimento de síndrome compartimental, podendo deixar como sequelas a perda funcional ou mesmo anatômica do membro acometido (GUTIERREZ, 2014; YAMASHITA *et al.*, 2014).

Uma grande variedade de proteínas presentes no veneno botrópico afetam a hemostasia. Muitas são enzimas como nucleotidases, fosfolipases A<sub>2</sub>, L-aminoácido oxidases (LAAO), metaloproteinases e serinoproteinases, enquanto outras, como desintegrinas e lectinas tipo C, não têm atividade enzimática. Essas proteínas podem ser classificadas como pró-coagulantes, anticoagulantes ou ativadoras de fibrinólise. No grupo dos pró-coagulantes estão incluídos os ativadores do fator V, do fator X e de protrombina, além de várias enzimas semelhantes à trombina. Inibidores de fatores IX e X, ativadores de proteína C, inibidores de trombina e fosfolipases A<sub>2</sub> exibem propriedades anticoagulantes. Atuantes sobre o sistema fibrinolítico estão as proteínas com atividade proteolítica sobre a fibrina e os ativadores de plasminogênio. As proteínas que agem como pró-coagulantes, causam a ativação *in vivo* do sistema de coagulação, mas, na maioria dos casos, isto não

resulta em trombose maciça e embólica, mas provoca o consumo de fatores da coagulação, resultando em um quadro clínico de incoagulabilidade sanguínea (CLEMETSON; LU; CLEMETSON, 2005; SARTIM *et al.*, 2015).

A ação hemorrágica é decorrente de toxinas presentes no veneno que agem como anticoagulantes diretos ou indiretos, potencializando o risco de hemorragia. Essas toxinas atuam aumentando a permeabilidade vascular ou danificando o endotélio vascular (hemorraginas e metaloproteinases). Os mecanismos de ação das hemorraginas incluem danos às células endoteliais, mionecrose, ruptura das fibras de colágeno e da membrana basal. O resultado final é um aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de líquido intersticial, acarretando a formação de edema, ou extravasamento de células sanguíneas, levando a equimoses, púrpuras ou sangramentos (HUTTON, WARREL, 1993; OGUIURA *et al.*, 2014).

Os efeitos clínicos são vistos localmente no membro picado e por todo o corpo. Pode haver sangramento espontâneo a partir de tecidos, observáveis muitas vezes como sangramento das gengivas (gengivorragia), mas também como sangramento no trato gastrointestinal (TGI), com hematêmese e melena, hemorragia nos pulmões, com hemoptise, sangramento no trato genito-urinário, com hematúria ou menorragia. Cada um destes pode variar de leve a grave, capaz de provocar um choque com risco de vida (WHITE, 2005).

As manifestações sistêmicas incluem, além das supracitadas, náuseas, vômitos, sudorese, hipotensão arterial e, mais raramente, choque. As complicações sistêmicas mais comuns são, insuficiência renal aguda, septicemia e coagulação intravascular disseminada, tendo patogênese multifatorial e sendo causas frequentes de óbitos (PINHO; PEREIRA, 2001; FRANÇA; MALÁQUE, 2003).

### **1.2.2.1 Insuficiência Renal Aguda (IRA)**

Uma importante complicação sistêmica nos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* é a Insuficiência Renal Aguda (IRA). A IRA é considerada a complicação mais grave e letal desses acidentes. Estudos retrospectivos mostraram

que IRA ocorreu em 1,5% a 10% dos casos, mas provavelmente a real magnitude deste problema é subestimada (TORREZ *et al.*, 2014).

O rim é um órgão altamente vulnerável à ação de venenos e toxinas devido sua alta vascularidade. Muitos fatores têm sido implicados na patogênese da IRA induzida pelo envenenamento botrópico, dentre eles, alta concentração do veneno no tecido renal, ação direta dos componentes do veneno sobre o túbulo renal e células epiteliais renais, hemoglobinúria, deposição de fibrina glomerular, lesão vascular, liberação de substâncias vasoativas, deposição de complexos imunes e estresse oxidativo (Figura 4) (SITPRIJA, SITPRIJA, 2012).

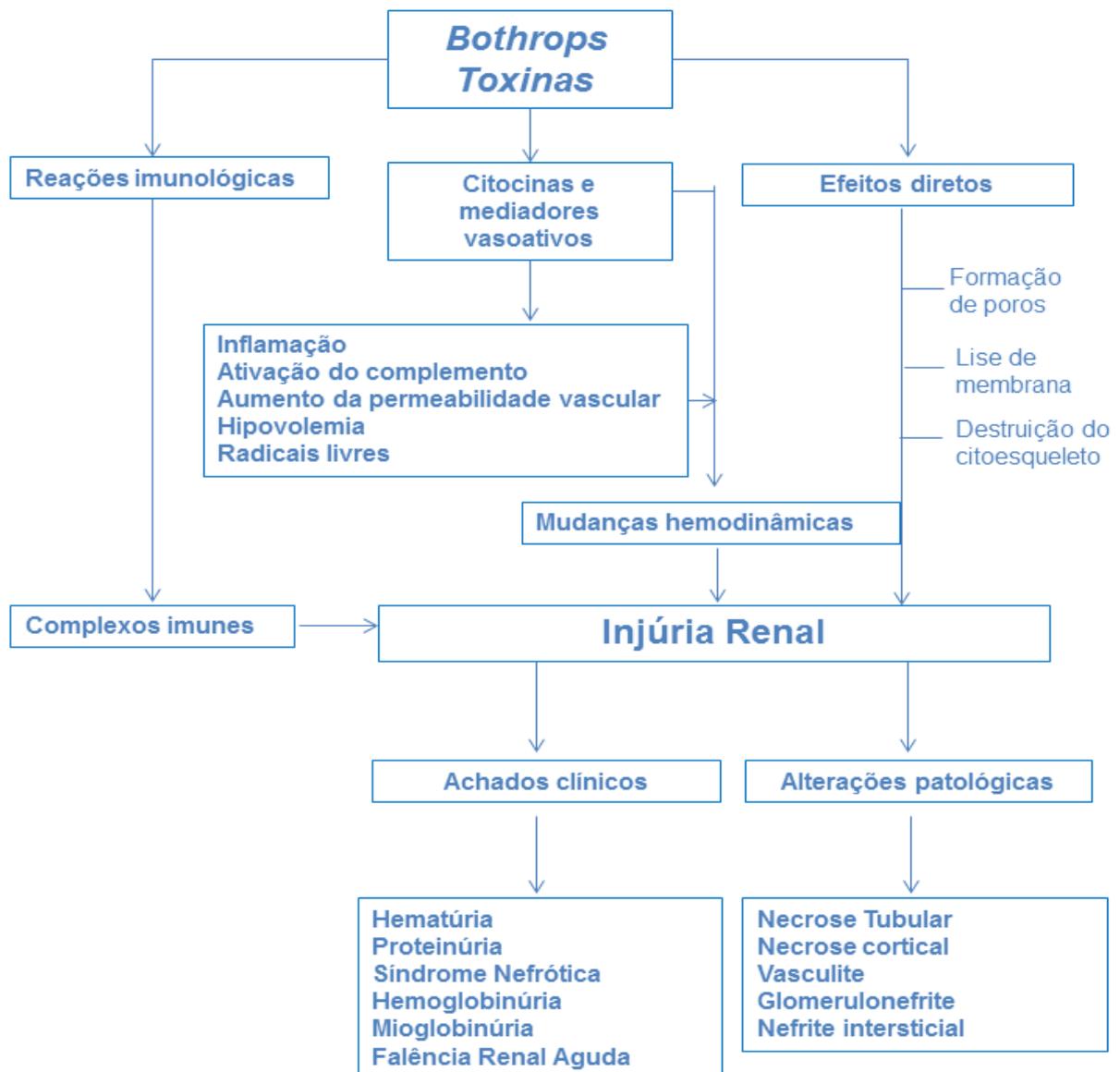


Figura 4: Fisiopatologia dos efeitos renais induzidos pelo veneno botrópico e suas toxinas. (Fonte: Adaptado de Sitprija e Sitprija, 2012).

A lesão renal mais frequente observada após o acidente botrópico é a necrose tubular aguda, mas casos de necrose cortical também são descritos, bem como nefrite intersticial aguda, alterações glomerulares, vasculite e necrose de papila em menor frequência. A evolução clínica depende da precocidade do diagnóstico e do tratamento com soroterapia, hidratação e diálise (MARROTA *et al.*, 2006; SITPRIJA, SITPRIJA, 2012).

#### **1.2.2.1.1 Nefrotoxicidade direta induzida pelo veneno botrópico e seus componentes**

Dentre os fatores envolvidos na patogênese da IRA, o efeito nefrotóxico direto de venenos botrópicos e suas frações foram relatados. Segundo Sitprija e Sitprija (2012), os estudos clínicos e histopatológicos não são conclusivos sobre a nefrotoxicidade direta de venenos e toxinas. Evidência convincente é fornecida a partir de estudos com cultura de células renais e perfusão de rim isolado. Vários estudos demonstraram que diferentes componentes dos venenos estão envolvidos na indução de morte celular por necrose e/ou apoptose (ARAKI *et al.*, 2002; MORA *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2009; NAUMAN *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2014).

A necrose é um tipo de morte celular que ocorre de forma descontrolada e acidental, sendo desencadeada principalmente por lesões mecânicas, agentes citotóxicos e hipóxia. É caracterizada pela ruptura da membrana plasmática, condensação da cromatina, hidrólise do DNA, aumento do volume celular, desagregação dos ribossomos e finalmente lise celular. Após a lise celular ocorre a liberação de componentes intracelulares, ocasionando uma reação inflamatória local. Ainda que o material necrótico seja removido por fagócitos, a inflamação causa danos locais significativos (ORRENIUS; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY, 2015). Os múltiplos caminhos bioquímicos que são ativados pelo dano celular inicial e que podem levar à necrose incluem a depleção severa de reservas de energia celular (ATP); aumento do cálcio citosólico livre; geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a ativação de várias enzimas, incluindo as fosfolipases, proteases e endonucleases (RANA; SATHYANARAYANA; LIEBERTHAL, 2001).

Recentemente, demonstramos que o veneno de *Bothrops leucurus* induziu nefrotoxicidade direta associada com indução de morte celular por necrose e apoptose (DE MORAIS *et al.*, 2013). Castro *et al.* (2004) demonstraram que o veneno de *B. jararaca* causou toxicidade direta para túbulos proximais via estresse oxidativo. *Bothrops insularis* induziu citotoxicidade em células tubulares renais através de disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (MELLO *et al.*, 2014). Nascimento *et al.*, (2007) e Colares Buzato *et al.*, (2002) avaliaram a citotoxicidade das peçonhas de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* em cultura de células tubulares renais, e verificaram redução da viabilidade celular, com diminuição da resistência transepitelial das monocamadas. Ao estudarem o mecanismo de morte celular, verificaram morte predominantemente por necrose e possivelmente através da ação das espécies reativas de oxigênio.

A apoptose caracteriza-se por alterações no citoesqueleto que induzem contração celular, fragmentação do DNA, condensação da cromatina, clivagem de substratos proteicos, formação de vesículas sem perda de integridade da membrana e sem resposta inflamatória. É um dos principais mecanismos que contribui para perda da função das células do rim e atrofia tubular em doenças renais (VERZOLA *et al.*, 2014).

A ativação da apoptose pode ser deflagrada por estímulos externos por meio da ativação de receptores específicos presentes na superfície celular (via extrínseca ou via de receptor de morte celular), ou pelo estresse intracelular (via intrínseca ou mitocondrial). Ambas as vias culminam com a ativação de caspases que levam à morte celular (ZHU *et al.*, 2015).

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF), a porção citoplasmática desses receptores contém um domínio de morte intracelular chamados de receptores de morte (*death receptors*, DRs). Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/ MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem as pró caspases iniciadoras 8 e 10. Depois de tornarem-se ativas as caspases 8 e 10 difundem-se no citoplasma e ativam as caspases efetoras 3, 6 e 7, entre outras (Figura 5). As caspases efetoras, por sua

vez, clivam múltiplos componentes vitais para as células, levando a morte por apoptose (CHEN *et al.*, 2015; SAKAMAKI *et al.*, 2015).

A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular, como privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia, dentre outros. A mitocôndria sofre modificações de potencial de membrana interna, de permeabilidade de membrana e aumento de densidade de matriz. Estas alterações mitocondriais podem ser cruciais para o disparo da morte, podendo facilitar a translocação de proteínas mitocondriais, bloqueio na síntese de ATP e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, que leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucléicos, além de contribuir para a ativação de caspases-9 e 3. O desarranjo mitocondrial também pode facilitar a liberação de citocromo c para o citoplasma, onde o mesmo forma complexo com o fator de ativação associado à apoptose-1 (APAF-1) e caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa, que é capaz de ativar a caspase-3 e levar a apoptose (Figura 5) (JEONG *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015).

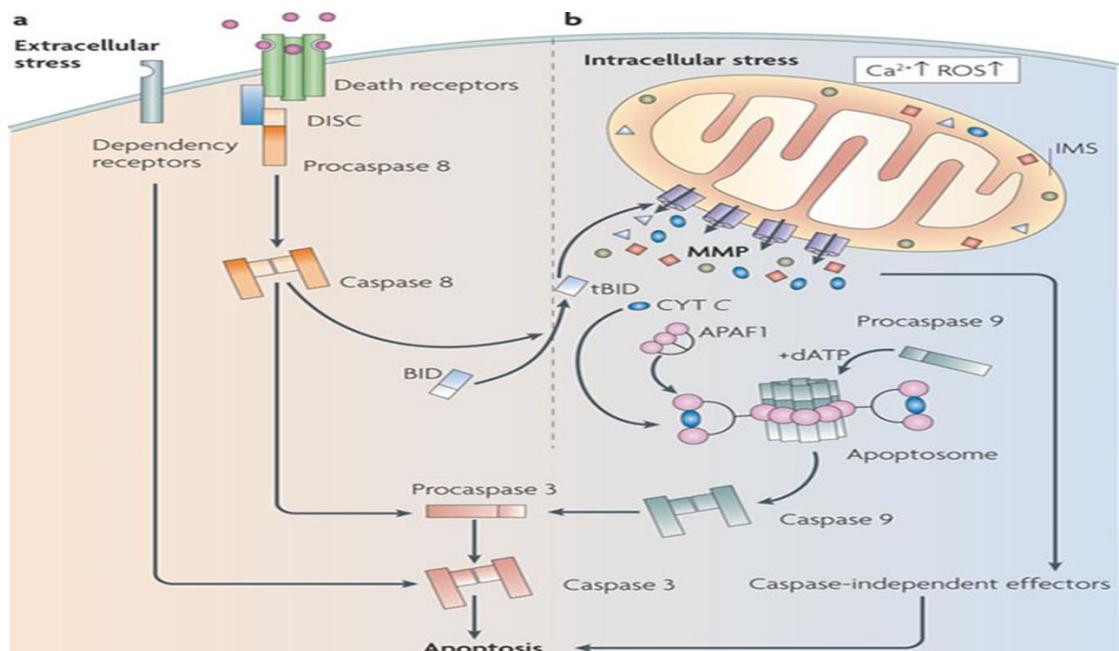


Figura 5: Vias de sinalização da apoptose: A via de receptores de morte (via à esquerda da figura) é acionada por membros da superfamília de receptores de morte (como FasL, TRAIL e de fator necrose tumoral). Este complexo ativa a pró caspase 8, que uma vez ativada pode ativar diretamente a pró caspase 3 ou clivar a proteína pró apoptótica Bid, a qual induz a saída do citocromo c. Na via intrínseca, a mitocôndria integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e conseqüente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (citocromo c). O

citocromo c liberado se oligomeriza com APAF-1 e pró-caspase 9, para formar o complexo ativador da caspase 9 chamado apoptossoma, uma vez ativada a caspase 9 cliva e ativa a pró-caspase 3, induzindo a apoptose (Fonte: Galluzzi, Blomgren, Kroemer, 2009).

Diversas proteínas presentes nos venenos botrópicos podem induzir ativação da via extrínseca ou intrínseca da apoptose (Figura 6). Vários estudos identificaram metaloproteínas que, devido à sua similaridade com a convertase de TNF- $\alpha$ , são capazes de causar apoptose *in vitro* (MOURA-DA-SILVA e BALDO, 2012; CALDERON *et al.*, 2014; ACHÊ *et al.*, 2015). PLA<sub>2</sub> podem induzir apoptose via estresse oxidativo, distúrbios da sinalização de cálcio e produção de ceramida (SHAKHMAN *et al.*, 2003; MORA *et al.*, 2005; TONELLO *et al.*, 2012). As desintegrinas interferem na adesão celular e também atuam na via de transdução de sinal da fosfolipase C fosfatidilcolina-específica, assim como a indução da expressão de p53 (ZHAO *et al.*, 2004; LUCENA *et al.*, 2015). As cardiotoxinas podem ativar apoptose tanto pela via extrínseca (caspases 8 e 3) como pela via mitocondrial, com a liberação de citocromo c (CHIEN *et al.*, 2008; CALDERON *et al.*, 2014). Outro importante indutor de apoptose é a enzima L-aminoácido oxidase (LAAO), que pode bloquear os receptores de timidina causando danos ao DNA. LAAO induz apoptose ao ativar os receptores de morte (CALDERON *et al.*, 2014). LAAO gera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em sua reação catalítica, produzindo apoptose como efeito secundário (NAUMAN *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2014; MORAIS *et al.*, 2015).

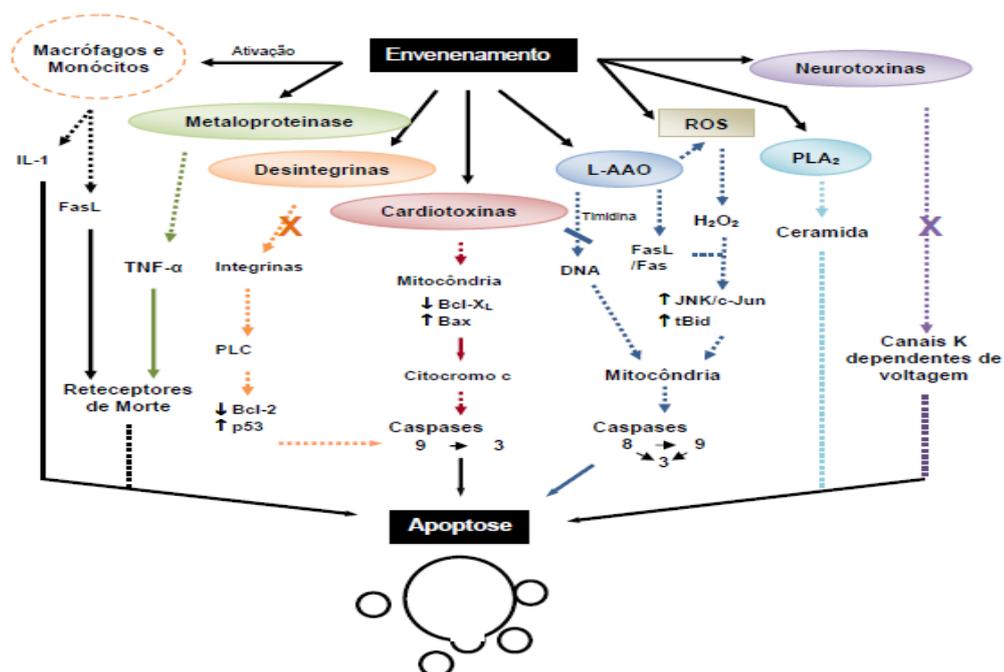


Figura 6: Esquema da ação de componentes de peçonhas ofídicas na morte celular apoptótica. As

setas tracejadas indicam as possíveis vias de ação das enzimas/toxinas da peçonha nas células. As setas contínuas indicam vias já estabelecidas na literatura. X = bloqueio de integrinas ou canais iônicos. U = aumento na expressão; V = redução na expressão. (Fonte: NASCIMENTO, 2008).

Além dos estudos de citotoxicidade, outros estudos foram conduzidos com venenos botrópicos e suas toxinas utilizando perfusão de rim isolado de rato, onde foram observados efeitos nefrotóxicos diretos. Em estudos prévios realizados por Havt *et al.*, (2005), Martins *et al.*, (2005), Braga *et al.* (2006), Evangelista *et al.*, (2010), De Moraes *et al.*, (2013), foi demonstrado que os venenos de diferentes espécies de *Bothrops* alteram os parâmetros fisiológicos da função renal. De um modo geral os venenos botrópicos induzem diminuição na Pressão de Perfusão, na Resistência Vascular Renal, no Ritmo de Filtração Glomerular, no Fluxo Urinário e na porcentagem de transporte tubular de sódio (Tabela 1).

Tabela 1: Estudos de nefrotoxicidade direta com venenos de *Bothrops* no modelo de perfusão de rim isolado de rato.

Veneno	PP	RVR	RFG	FU	%TNA+	Referência
<i>Bothrops leucurus</i>	↓	↓	↓	↓	↓	De Moraes <i>et al.</i> , 2013
<i>Bothrops erythromelas</i>	↓	↓	↓	↓	↓	Martins <i>et al.</i> , 2005
<i>Bothrops insularis</i>	↓	↓	↓	↓	↓	Braga <i>et al.</i> , 2006
<i>Bothrops pirajai</i>	↓	↓	↓	↓	↓	Havt <i>et al.</i> , 2005
<i>Bothrops marajoensis</i>	↓	↓	↓	↓	↓	Evangelista <i>et al.</i> , 2010

PP: Pressão de Perfusão; RVR: Resistência Vascular Renal; RFG: Ritmo de Filtração Glomerular; FU: Fluxo Urinário; %TNA: percentual de sódio transportado.

Observamos que o veneno de *Bothrops leucurus* induziu nefrotoxicidade em rim isolado de rato, associado com citotoxicidade em células tubulares epiteliais renais (DE MORAIS *et al.*, 2013). No presente trabalho demos continuidade ao estudo, avaliando o efeito nefrotóxico da enzima L-aminoácido oxidase isolada do veneno de *Bothrops leucurus* (LAAO-BI). A fim de saber se esta enzima está envolvida no processo de nefrotoxicidade direta do veneno de *Bothrops leucurus* nós

investigamos a sua citotoxicidade sobre células epiteliais renais e o seu potencial nefrotóxico em rim isolado de rato.

***JUSTIFICATIVA***

## 2. JUSTIFICATIVA

A *Bothrops leucurus* é uma serpente peçonhenta que habita a região Nordeste do Brasil, responsável por grande parte dos casos de acidentes ofídicos reportados na região (SATURNINO, OLIVEIRA *et al.*, 2014). Os efeitos biológicos devido ao envenenamento por *B. leucurus* têm perfil semelhante àqueles apresentados por outras serpentes do gênero *Bothrops*, ou seja, importantes efeitos locais, assim como efeitos sistêmicos graves, como a insuficiência renal aguda (IRA) que é a principal causa de morte nesses acidentes (SANCHEZ *et al.*, 1992, LIRA- DA- SILVA, 2009).

Recentemente, demonstramos os efeitos do veneno da serpente *Bothrops leucurus* em rim isolado e em cultura de células renais. O veneno induziu alterações nos parâmetros fisiológicos renais, e efeitos citotóxicos em cultura de células tubulares renais, como indução de morte celular por necrose e apoptose, despolarização no potencial de membrana mitocondrial, aumento de cálcio citosólico e aumento de expressão de caspases (DE MORAIS *et al.*, 2013).

A abordagem proposta neste trabalho foi dar continuidade ao estudo. Portanto, objetivou-se estudar se a fração L-aminoácido oxidase, o maior componente proteico de *B. leucurus*, está envolvida na nefrotoxicidade do veneno. Para isso, utilizamos técnicas farmacológicas clássicas aliadas a técnicas modernas de sinalização de morte celular.

O estudo do mecanismo molecular envolvido nos distúrbios renais causado por ofidismo tem como finalidade dar um melhor entendimento de como agem os venenos e seus componentes e contribuir para o conhecimento da fisiopatologia renal. Espera-se assim, esclarecer os mecanismos de nefrotoxicidade, bem como ajudar na busca de fármacos e estratégias terapêuticas mais efetivas que possam ser úteis para o tratamento da insuficiência renal aguda induzida pelo envenenamento botrópico.

## ***OBJETIVOS***

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Estudar os efeitos nefrotóxicos diretos induzidos pela fração L- aminoácido oxidase isolada do veneno de *B. Leucurus* (LAAO-*Bl*).

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da LAAO-*Bl* sobre a viabilidade das células tubulares renais (MDCK e HK2).
- Estudar o mecanismo de morte induzido por LAAO-*Bl* sobre as linhagens celulares em estudo.
- Verificar o efeito da LAAO-*Bl* sobre o potencial de membrana mitocondrial nas células MDCK.
- Avaliar o efeito da LAAO-*Bl* sobre a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico nas células MDCK.
- Investigar se LAAO-*Bl* induz aumento de espécies reativas de oxigênio nas células MDCK.
- Avaliar se LAAO-*Bl* induz ativação de caspases executoras da apoptose sobre as linhagens celulares em estudo.
- Avaliar se LAAO-*Bl* induz liberação de citocromo c nas células HK2.
- Avaliar os efeitos da LAAO-*Bl* em rim isolado de rato.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

Para o ensaio de viabilidade: *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide* (MTT, (M5655, Sigma). Atividade de lactato desidrogenase (Kit *cytoTox96* – Promega 6179A). Análise de apoptose e necrose por citometria de fluxo: *AnnexinV/FITC Apoptosis Detection Kit BD Pharmigen* (CA, USA). No ensaio de atividade de caspase-3: substrato fluorogénico de caspase-3 (*Ac-DEVD-AFC*, P-409, Biomol). *Tetramethylrhodamine ethyl ester* (TMRE), Fura-2AM e *2,7dichlorodihydrofluorescein diacetate* (DCFH-DA) foram obtidos de Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Nos experimentos de western Blot: Caspase 3 (#96615), Caspase 7(#9492) foram obtidas de Cell Signaling,  $\alpha$ -tubulin (#T8203) foi obtida de Sigma-Aldrich e Bax (Sc 493) de Santa Cruz Biotechnology. Para revelar os western: *ECL Western Blotting Detection Reagents* (RPN2209, GE Healthcare).

#### 4.1.1 Obtenção da LAAO-BI

L- aminoácido oxidase foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama da Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Campus do Litoral Paulista, Unidade de São Vicente.

### 4.2 Linhagens Celulares

As células utilizadas para os ensaios de citotoxicidade foram: HK2 e MDCK

As células HK2 constituem uma linhagem imortalizada proveniente do túbulo proximal renal humano (ATCC 2290). Fenotipicamente, as células HK2 têm as mesmas características das células tubulares de adultos normais, como demonstradas por uma série de testes bioquímicos. Em particular, foi mostrado que as células HK2 mantêm a borda em escova e atividades enzimáticas típicas (ácido e fosfatase alcalina, aminopeptidase de leucina e gama glutamil transferase). Vários estudos demonstraram que esta linhagem celular é uma ferramenta experimental para o estudo da fisiopatologia renal bem como para mecanismos de lesão e

reparação ao nível da célula tubular (ROMITI *et al.*, 2008; VERZOLA *et al.*, 2014).

As células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) constituem uma linhagem imortalizada proveniente do túbulo renal de cadelas, com características morfológicas e funcionais semelhantes às células do ducto colector e/ou túbulo distal de mamíferos e têm sido muito utilizadas na investigação de uma variedade de processos celulares, incluindo o transporte epitelial e resposta celular a agentes tóxicos (COLLARES-BUZATO *et al.*, 2002; DE MORAIS *et al.*, 2013;)

#### **4.2.1 Cultivo das linhagens celulares**

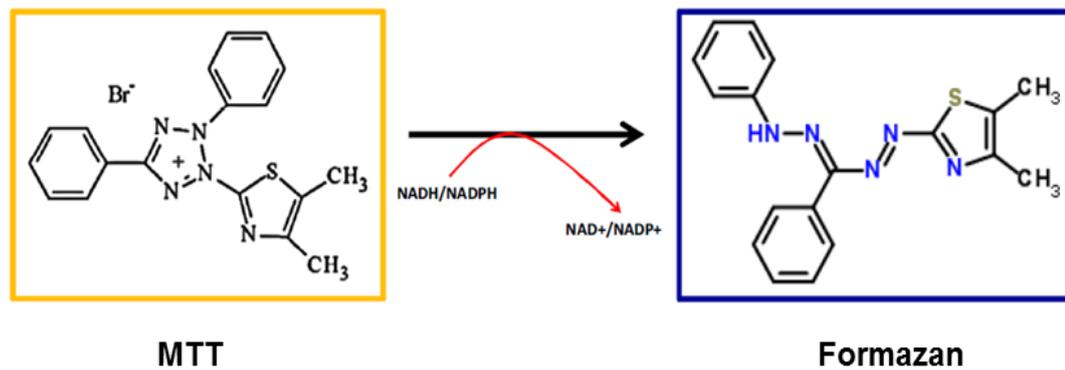
As células HK2 e MDCK foram cultivadas em frascos plásticos, com meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10 mg/mL). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, seguido da observação do crescimento celular a cada 24 horas.

### **4.3 Estudo do efeito citotóxico *in vitro***

#### **4.3.1 Ensaio com MTT**

##### **4.3.1.1 Princípio do método**

O ensaio consiste em uma análise colorimétrica que mede indiretamente a citotoxicidade. A técnica baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs, ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazólio (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H ou MTT), que é solúvel em água e de cor amarelada em cristais de formazan, que são de cor púrpura. Os cristais de formazan são solubilizados, formando um produto colorido cuja medição da densidade óptica é feita em espectrofotômetro a 570 nm de absorbância (Figura 7). A intensidade do produto colorido formado é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes na amostra, confirmando a capacidade redutora do sistema sobre o MTT (MOSMANN 1983; HEINRICH *et al.*, 2005).



**Figura 7: Esquema do ensaio do MTT.** Redução metabólica do Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol a formazan (composto azul). A adição de dimetilsulfóxido (DMSO) solubiliza os cristais de formazan e a intensidade é medida a uma longitude de onda de 570 nm.

### Protocolo experimental

As células foram distribuídas em placas de 96 poços. Decorridas 24 horas do plaqueamento, foram adicionadas aos poços diferentes concentrações da LAAO-*Bl* solubilizadas em PBS. Após 12 horas do tratamento, foi removido todo o meio de cultura (100µL) e adicionou-se 20µL da solução do sal de tetrazolium (MTT; 5mg/mL; Sigma) dissolvido em PBS. Após incubação por 4 horas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C, adicionou-se 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar os cristais de formazan formados. Mediu-se a absorbância a 570 nm usando o espectrofluorímetro Wallac Victor 1420 (PerkinElmer). Os resultados da leitura se expressam como porcentagem de morte celular das amostras tratadas comparadas com as amostras que receberam apenas o veículo de diluição da substância teste (PBS).

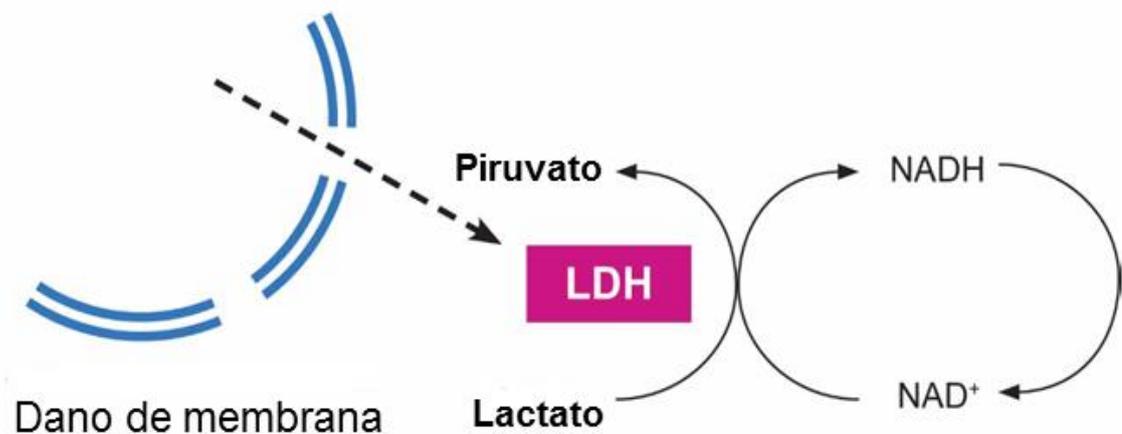
$$\% \text{ Morte celular: } [1 - (\text{Células tratadas} / \text{Células controle}) * 100]$$

## 4.3.2 Ensaio de atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH)

### 4.3.2.1 Princípio do método

Nos ensaios de citotoxicidade, a atividade da enzima lactato desidrogenase tem sido utilizada como principal marcador de lise celular *in vitro*. Para verificarmos se a citotoxicidade da LAAO-*Bl* nas linhagens celulares em estudo estava associada

à lise da membrana plasmática, realizamos o teste de atividade da enzima lactato desidrogenase. O teste baseia-se na redução de NAD a NADH pela LDH (enzima citosólica, liberada para o meio extracelular quando a integridade da membrana é afetada). Nas condições do ensaio, a LDH catalisa a conversão do piruvato para lactato, enquanto o NADH é oxidado para  $\text{NAD}^+$ . A atividade catalítica é determinada a partir da velocidade de desaparecimento do NADH (Figura 8). Assim, quanto maior a liberação da enzima, e conseqüentemente a perda da integridade da membrana, maior a atividade da enzima (CHAN; MORIWAK; DE ROSA, 2013).



**Figura 8: Esquema do ensaio de LDH:** A LDH catalisa a redução do piruvato pelo NADH, que é convertido em lactato, transformando o NADH em NAD. A concentração catalítica é determinada a partir da velocidade de extinção do NADH, medida espectrofotometricamente em 490nm.

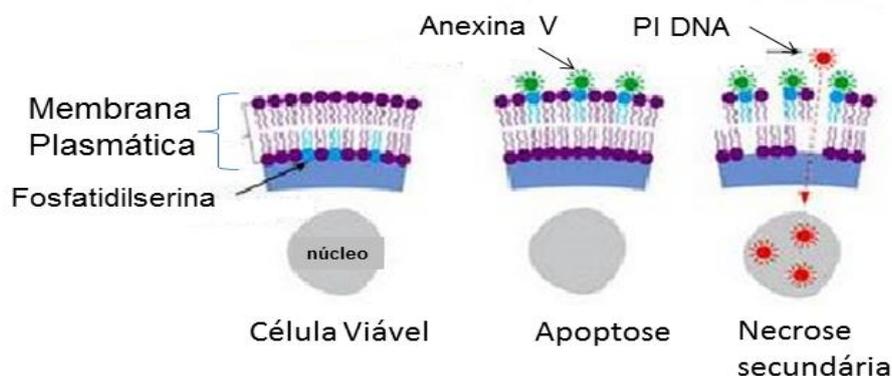
### Protocolo experimental

As células foram distribuídas em placas de 96 poços. Decorridas 24 horas do plaqueamento, foram adicionadas aos poços diferentes concentrações de LAAO-*Bl*. Após 12 horas do tratamento foi retirado 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante, levado para outra placa de 96 poços e adicionado 50  $\mu\text{L}$  da solução do substrato mix (Promega) e a mistura foi incubada por 30 minutos protegida da luz. Triton-X 7% foi utilizado como controle positivo de liberação de LDH. Mediu-se a absorbância a 490 nm usando o espectrofluorímetro Wallac Victor 1420 (PerkinElmer). Os valores de citotoxicidade foram calculados utilizando os resultados do controle negativo como liberação basal de LDH, e os resultados do controle positivo, como 100% de liberação da enzima.

#### 4.4 Detecção de células apoptóticas e necróticas por marcação com Anexina V/Iodeto de propídeo.

##### 4.4.1 Princípio do método

Este método baseia-se na detecção da fosfatidilserina (PS), que nas células apoptóticas se transloca do interior ao exterior da membrana plasmática. A anexina V é uma proteína anticoagulante vascular que possui uma grande afinidade pela fosfatidilserina. A anexina V pode ser conjugada com fluórocromos, permitindo a identificação das células apoptóticas através de sua ligação a fosfatidilserina na superfície celular. No entanto, a anexina V também é capaz de se ligar a PS no interior das células que não apresentam sua membrana plasmática intacta, consideradas como necróticas (ENGELAND *et al.*, 1998). Portanto, junto com a anexina, simultaneamente as células são incubadas com iodeto de propídeo (IP) um marcador que se internaliza somente nas células mortas que não possuem a membrana intacta e se intercala no DNA emitindo fluorescência (Figura 9). Este ensaio permite distinguir entre células viáveis (Anexina-/IP-), em apoptose (Anexina+/IP-), em apoptose tardia/necrose secundária (Anexina+/IP+) e em necrose (Anexina-/IP+).



**Figura 9: Esquema do ensaio de marcação com Anexina V/IP:** A anexina V tem uma grande afinidade por fosfatidilserina, tal característica pode ser utilizada para identificar células apoptóticas. Células viáveis excluem o iodeto de propídeo (IP) da interação com a membrana, enquanto que a membrana de células mortas ou danificadas pode ser penetrada pelo IP. Células que são positivas para FITC-Anexina V e negativas para IP estão no estágio precoce da apoptose. Células que são

positivas para FITC-Anexina V e IP estão no final do estágio de apoptose, em estágio de necrose ou estão completamente mortas. Células que são negativas para FITC-Anexina V e IP estão viáveis

### Protocolo experimental

Para este ensaio as células foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após 12 horas do tratamento com diferentes concentrações de LAAO-*Bl*, o meio de cultura foi coletado e as células aderidas à placa foram lavadas com PBS e tripsinizadas, e procedeu-se a marcação seguindo as instruções do fabricante Kit BD Pharmigen. Resumidamente, o “pellet” obtido após as lavagens e centrifugação foi ressuspenso em 100µL de tampão de ligação. Posteriormente, adicionou-se 5µL de AnnV e 5µL de IP e os tubos foram incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente protegidos da luz, após este período adicionou-se 400 µL do tampão de ligação. Por último, os resultados foram analisados por citometria de fluxo (Cytomics FC de Beckman Coulter). A emissão de luz de excitação realizou-se a 488 nm com um laser de argônio. O sinal de AnnV-FITC (fluorescência verde) detectou-se a 518 nm e o sinal do IP (fluorescência vermelha) a 620nm. Os dados foram analisados utilizando o programa WinMDI 2.9.

## **4.5 Medida do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )**

### **4.5.1 Princípio do método**

Essa técnica baseia-se na capacidade de um corante fluorescente específico, se ligar diretamente as mitocôndrias de células viáveis. A tetrametilrodamina (TMRE) é um indicador catiônico que se acumula preferencialmente em mitocôndrias energizadas e tem sido amplamente utilizada como corante fluorescente de mitocôndrias. Ao utilizar TMRE é possível acompanhar a dissipação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) indicada pela perda do corante acumulado na mitocôndria para o citosol, bem como é possível verificar aumentos no  $\Delta\Psi_m$  indicado pelo aumento na fluorescência na organela (MITRA; LINPPINCOTT, 2010). O sinal do TMRE é calibrado usando Carbonilcianeto-p-tri fluorometoxifenilhidrazona (FCCP) no final do experimento. Antes de iniciar o experimento, a estabilidade de fluorescência deve ser verificada através da aquisição de algumas imagens, até que uma base

estável seja alcançada. Quando uma base estável não foi obtida, devido à *photobleaching* ou efeitos de fotodinâmica, as células foram descartadas.

#### Protocolo experimental:

Microscopia de fluorescência: Para avaliar os efeitos da LAAO-*BI* (50 ug / mL) no  $\Delta\Psi_m$ , as células foram plaqueadas em lâminas e incubadas com TMRE (25 nM, 15 min a 37 °C). Antes da adição de LAAO-*BI*, as células foram expostas à luz durante pelo menos 5 minutos para assegurar uma linha de base estável. A fluorescência do TMRE (548 nm de excitação e 585 nm de emissão) foi adquirida usando um microscópio de fluorescência de alta resolução (Nikon TE 300, Nikon, Osaka, Japão) acoplado a uma câmera CCD (CoolSnap-Roper Scientific Inc., Princeton Instruments, Princeton, NJ, EUA). As imagens foram adquiridas por software BiOP (Anderson Eng., EUA).

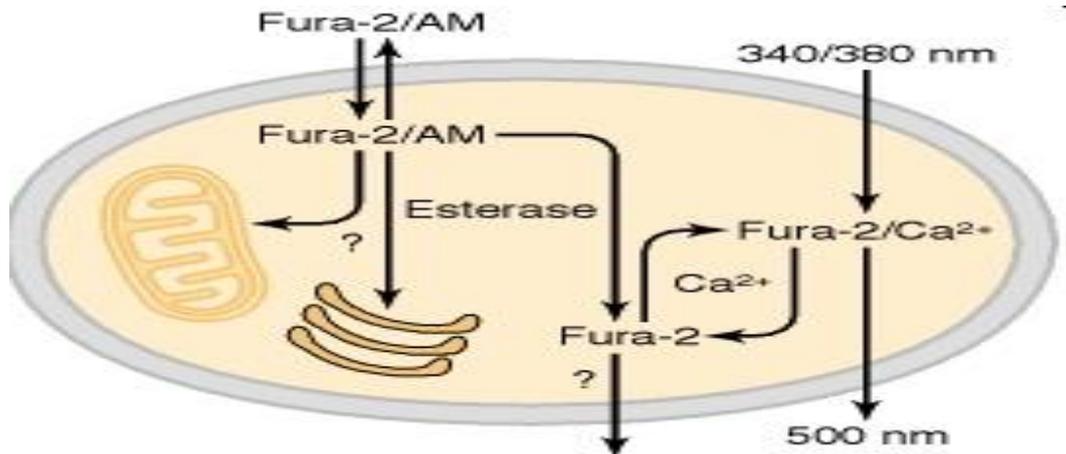
Citometria de fluxo: Após 12 horas do tratamento com LAAO-*BI*, as células MDCK foram recolhidas e colocadas em frascos do citômetro, centrifugadas e o precipitado ressuspensão em 200 $\mu$ L PBS contendo o TMRE na concentração de 50 nM. Após 30 minutos de incubação com TMRE, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo.

### **4.6 Medidas da variação do $Ca^{2+}$ intracelular**

#### **4.6.1 Princípio do método**

Os experimentos para verificar as alterações dos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  foram realizados com o marcador fluorescente de  $Ca^{2+}$ , Fura-2-AM. O Fura-2-AM é um indicador de  $Ca^{2+}$  permeante à membrana plasmática, devido à sua porção acetoximetil éster (AM). Uma vez dentro das células, este indicador que na forma AM é insensível a íons é hidrolizado por esterases intracelulares liberando o indicador poliânico do grupamento AM, tornando-se assim sensível a íons. A excitação do Fura-2-AM foi realizada continuamente em dois comprimentos de onda, 340 nm e 380 nm, sendo a emissão da fluorescência coletada no comprimento de onda de 505 nm (Figura 10). Quando o Fura-2-AM está ligado ao  $Ca^{2+}$ , a fluorescência em 340 nm aumenta, enquanto que a fluorescência em 380 nm diminui. Desta maneira, a razão

340/380 nm corresponde às variações de cálcio citosólico (SMAILI *et al.*, 2008). Os valores em porcentagem são expressos como a razão (340/380), normalizado da fluorescência basal e os dados foram normalizados pela fórmula  $(F - F_0)/F_0 \times 100$ , no qual  $F_0$  representa os níveis basais de  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 10: Esquema da medida de variação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular:** O Fura-2-AM é um indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  permeante à membrana plasmática, devido à sua porção acetoximetil éster (AM). Quando o Fura-2-AM está ligado ao  $\text{Ca}^{2+}$ , a fluorescência em 340 nm aumenta, enquanto que a fluorescência em 380 nm diminui. Desta maneira, a razão 340/380 nm corresponde às variações de cálcio citosólico

### Protocolo experimental

As células MDCK foram plaqueadas em placas de Petri contendo lamínulas (*coverslips*) redondas de 25 mm de diâmetro, previamente lavadas com água destilada, autoclavadas e deixadas por 30 minutos sob luz UV. Após 24 horas do plaqueamento as células foram lavadas com tampão para fluorescência (em mM: NaCl 130; KCl 5,36;  $\text{MgSO}_4$  1;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1;  $\text{CaCl}_2$  1,5;  $\text{NaHCO}_3$  2,5; Albumina 1,5; Glicose 25 e HEPES 20) e incubadas com Fura-2AM (3  $\mu\text{M}$ ) por 30 minutos e protegidos da luz à temperatura ambiente em tampão de fluorescência. Transcorrido o tempo de incubação, as células foram lavadas com o mesmo tampão para fluorescência e a lamínula foi encaixada na câmara de Leiden, a qual foi adicionado 1,0 mL de tampão. No microscópio a câmara foi inserida no sistema com controle de temperatura, de forma que os experimentos foram realizados com as células mantidas a 37 °C. Durante os primeiros 2 minutos de cada experimento, correspondentes a 20 imagens, não foi dado qualquer estímulo, para que fosse obtida

uma linha de base. Após as 20 primeiras imagens foi adicionado a LAAO-*BI* (50µg/mL). Os experimentos foram desenvolvidos com números de imagens variados, intervalo de 6 segundos entre as imagens e 100 milissegundos de tempo de exposição das células à luz fluorescente. Foi usada a objetiva de 40x e resolução de 2 bins. Em alguns experimentos foi feito o estudo da LAAO-*BI* na presença de diferentes antagonistas que foram incubados por diferentes períodos antes do início dos experimentos. Para tanto, foram utilizados: tapsigargina, rianodina e 2-APB.

A tapsigargina, que inibe a atividade da SERCA presente no RE, foi incubada na concentração de 2 µM em lamínulas por 20 minutos a temperatura ambiente.

A rianodina, que inibe a atividade do receptor de rianodina (RyR) presente no retículo endoplasmático, foi incubada na concentração de 20 µM em lamínulas por 20 minutos a temperatura ambiente em tampão de fluorescência.

O 2-APB, antagonista do receptor de IP3 (IP3R) presente no retículo endoplasmático, foi incubado na concentração de 100 µM em lamínulas por 10 minutos a temperatura ambiente em tampão fluorescência.

Após esse tempo de incubação, as lamínulas foram adaptadas ao microscópio. Para cada antagonista foi feita, primeiramente, a medida da razão de fluorescência por estímulo único das células sem adição da LAAO-*BI* para, assim, verificar o efeito de cada antagonista sobre as células, e em seguida foi adicionada a LAAO na concentração de 50µg/mL.

## **4.7 Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)**

### **4.7.1 Princípio do método**

As espécies reativas de oxigênio (EROS) geradas intracelularmente foram avaliadas utilizando 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA), o qual se difunde através das membranas celulares e é facilmente hidrolisado por esterases intracelulares para formar o DCFH (não fluorescente), que depois é rapidamente oxidado ao DCF (2'7'- diclorohidrofluoresceína), altamente fluorescente, por uma ampla diversidade de EROS. A intensidade de fluorescência do DCF é proporcional à quantidade de EROs formadas intracelularmente (TOR *et al.*, 2015).

### Protocolo experimental

As células MDCK foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com LAAO- *Bl* (50 µg/mL) por 12 h. Após este período foram recolhidas e colocadas em frascos de citômetro, centrifugadas e o precipitado ressuspenso em 200µL de PBS contendo o DCFH na concentração de 5µM por 30 minutos a 37°C. Tert-Butyl hidroperóxido (t-BHP, 5 µM) foi utilizada como controle positivo. Os resultados foram analisados utilizando citometria de fluxo com comprimento de onda de excitação e emissão de 490 e 530 nm, respectivamente.

## **4.8 Ensaio de ativação da caspase 3 e 7**

### **4.8.1 Princípio do método**

Para a determinação da atividade da caspase 3/7 utilizamos um ensaio fluorimétrico (FEARNHEAD, 2001). As caspases são cisteína-proteases caracterizadas por apresentar um resíduo de cisteína que atua na ruptura de outras proteínas em um resíduo de aspartato. Neste ensaio, a caspase - 3/7 proveniente do lisado celular hidroliza o substrato Acetil-Asp-Glu-Val-Asp- 7-amino-trifluorometil-coumarina (Ac-DEVD-AFC), liberando o AFC, que é um marcador fluorogénico. A liberação do AFC em função do tempo nos permite avaliar a atividade da caspase -3/-7 em cada amostra.

### Protocolo experimental

Para realizar este ensaio as células foram plaqueadas em placas de 6 poços. Após 24 horas, foram tratadas com LAAO-*Bl*. Depois de 12 horas de tratamento, as células foram descoladas da placa pela adição de 5 mM de EDTA/PBS. O precipitado celular foi lavado com PBS frio, ressuspendido com 30 µL de tampão de extração (50 mM PIPES pH 7.0, 50 mM KCl, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>), e incubado durante 5 minutos no gelo. Este tampão hipotônico permite liberar o conteúdo citosólico sem romper completamente as células. Após esta incubação, realizaram-se 3 rondas de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido/água fria, com agitação em um vibromixer depois de cada ronda. Após centrifugar a 13.200 rpm durante 7 minutos a

4°C, o extrato citosólico (sobrenadante) foi recolhido. Foi quantificada a concentração protéica total do sobrenadante mediante o método colorimétrico do ácido bicinconinico (*BCA, Pierce BCA Protein Assay Kit*) de acordo com as instruções do fabricante. Como proteína padrão utilizaram-se concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA). Em placas de 96 poços de fundo plano negro, adicionou-se 40 µg de proteína, completando com tampão de extração até alcançar um volume final de 30 µL. Adicionou-se 200 µL de 2 µL/mL de Ac- DEVD-AFC diluído em 10% glicerol em PBS com 2mM de DTT. Analisou-se a liberação de AFC, usando o espectrofluorímetro Wallac Victor 1420; utilizando longitudes de onda de excitação/emissão de 390/510 nm, em um ensaio cinético que se avaliou durante 1 hora a 37°C.

#### **4.9 Análise de proteínas por western blott**

##### **4.9.1 Extratos proteicos totais**

Depois de 12 horas de tratamento, as células MDCK e HK2 foram despregadas da placa mediante tratamento com tripsina e após centrifugação o sedimento celular foi lavado com PBS frio e resuspenso em solução de lise (25mM de TrisHCl, 1mM de EDTA, 1mM de EGTA, 1% de SDS, 10 µg/mL leupeptina, 100 µM fluoreto de fenilmetilsulfonio PMSF e 10 µg/ml de pepstatina A). Os extratos foram incubados durante 10 minutos no gelo e a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente, foram centrifugados a 13.000 rpm durante 10 minutos para eliminar restos celulares. O sobrenadante desta centrifugação representa o extrato proteico. A concentração de proteína total foi determinada mediante o método colorimétrico de BCA.

##### **4.9.2 Eletroforese das proteínas em SDS-PAGE**

Os extratos proteicos obtidos na solução de lise (80 µg de proteína) foram suspensos em tampão de carga (60 mM de Tris, 10% de glicerol, 2% de SDS, 5% de 2-mercaptoetanol e 1 mL de 1% de azul de bromofenol, pH 6,8), aquecidos durante 5 minutos a 95°C, e por último foram centrifugados a 13.000 rpm durante 1 minuto.

As proteínas foram separadas mediante eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE, 10-12%), utilizando o sistema de eletroforese vertical (Mini Protean-3, Bio-Rad Laboratories) e um tampão formado por 25 mM de Tris, 200 mM de glicina e 0,1% de SDS. Utilizou-se um marcador de peso molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas).

#### **4.9.3 Imunodeteção de proteínas (Western blot)**

As proteínas separadas nos géis de SDS-PAGE foram transferidas eletroforeticamente a membranas de nitrocelulose (Nitrocellulose Membranes, 0.45 µm, Bio-Rad) utilizando o sistema Mini-Transblot (Bio-Rad). O tampão de transferência é composto por 25 mM de Tris, 192 mM glicina e 20% de metanol. As membranas foram bloqueadas durante 1 hora com 5% de leite em TBS-T (Tris-Buffered Saline) composto por 20 mM de Tris, 500 mM de NaCl, 0,1% de Tween-20). A incubação das membranas com o anticorpo primário realizou-se com a solução de bloqueio a 4°C durante toda a noite. Após lavar as membranas 3 vezes com TBS-T, foram incubadas com o correspondente anticorpo secundário conjugado a peroxidase em solução de bloqueio durante 1 hora a temperatura ambiente. Depois de lavar 3 vezes com TBS-T, revelou-se o Western blot mediante ECL seguindo as instruções do fabricante (ECL Western Blotting Detection Reagents), e as membranas foram expostas a uma película Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare). Os anticorpos utilizados foram anti-caspase 3 (#96615), anti-caspase 7 (#9492) e anti-Bax (Sc 493). As amostras foram também incubadas com anticorpo anti-  $\alpha$ -tubulina (#T8203) para quantificação. Os filmes foram digitalizados e analisados densitometricamente.

#### **4.10 Ensaio de liberação de citocromo c**

##### **4.10.1 Princípio do método**

O citocromo c é uma proteína que se encontra normalmente associada à membrana mitocondrial interna e no espaço intermembrana mitocondrial, participando no transporte de elétrons durante a respiração mitocondrial. No entanto, na presença de determinados sinais pró-apoptóticos, o citocromo c é liberado para o espaço citosólico onde interage com outras proteínas, desencadeando o processo de

apoptose (JEONG *et al.*, 2015). Por tanto, a aparição do citocromo c no citoplasma é considerada como marcador apoptótico, indicando também uma participação mitocondrial no processo.

### Protocolo experimental

As células HK2 foram plaqueadas em placas de 6 poços contendo lamínulas (coverslips), previamente lavadas com água destilada e autoclavadas. Após 24 horas, foram tratadas com LAAO-*BI* (50 e 25 µg/mL). Após 6 horas de tratamento, as células foram lavadas com PBS e posteriormente fixadas com 4% de paraformaldeído, permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100, e bloqueadas com gelatina a 2% em PBS. As células foram marcadas com um anticorpo primário contra Citocromo c (SC13561; Santa Cruz), seguido de anti-IgG de rato conjugado com FITC (Jackson ImmunoResearch). As imagens foram obtidas usando o microscópio Leica DM 6000 (câmera Leica DC500) com uma objetiva de 20X. As células foram classificadas de acordo com a localização de Citocromo c, na mitocôndria (morfologia tubular) ou no citosol (padrão difuso).

## **4.11 Perfusão de rim isolado**

### **4.11.1 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 250 e 300g, obtidos do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, climatizados entre  $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , luminosidade (12 horas de ciclo claro/escuro), umidade e circulação de ar controlados, recebendo ração padrão (Biotec®) e água “ad libitum”. Os mesmos foram mantidos em jejum cerca de 8 a 12 horas antes dos experimentos de perfusão renal apenas com água “ad libitum”.

### **4.11.2 Sistema utilizado**

A necessidade do conhecimento dos mecanismos de controle da função renal levou inúmeros pesquisadores a desenvolverem a técnica de perfusão de rim isolado.

O nosso sistema consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (Fonteles et al., 1983) com dois subsistemas, um in situ e outro em circuito fechado, para perfusão in vitro, mantidos ambos à mesma temperatura de 37 °C (Figura 11 e 12). Este sistema apresenta a vantagem da manutenção constante de parâmetros funcionais renais com utilização de albumina na solução perfusora, em menor volume, mantendo constantes as substâncias dialisáveis com oxigenação adaptada ao próprio sistema.



Figura 11: Foto do sistema de perfusão de rim isolado. (Fonte: LAFAVET – UFC)

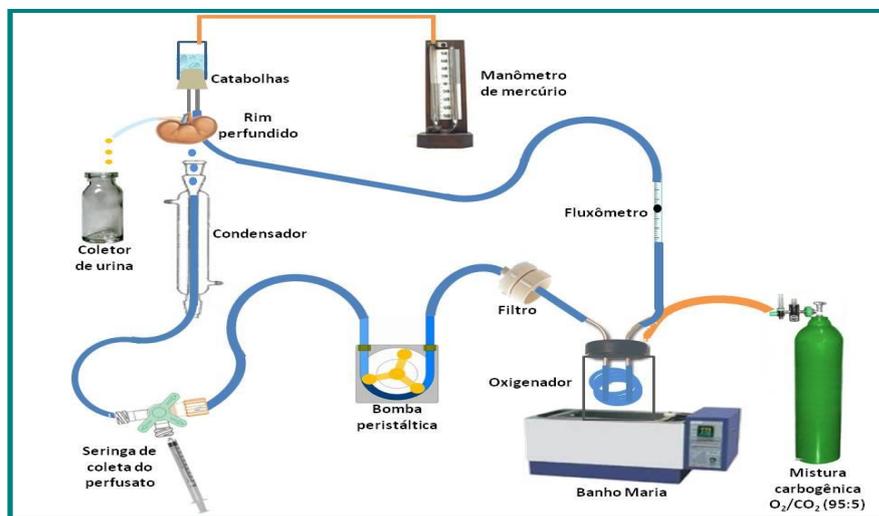


Figura 12 : Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado. (Fonte: LAFAVET –UFC).

#### 4.11.2.1 Calibração do sistema

O sistema foi calibrado sempre antes do início dos experimentos com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% mantida a 37°C. Foi avaliado em cada uma das bombas (1,2,3,4,5) a pressão de perfusão (PP) em mmHg, o fluxo urinário (L/min) e o

volume de urina coletado em um minuto (mL/min). Para uma melhor adaptação do sistema às unidades, a coleta de dados foi realizada em intervalos de 2 minutos. As figuras 13, 14 e 15 mostram que o sistema manteve-se constante em todos os grupos experimentais.

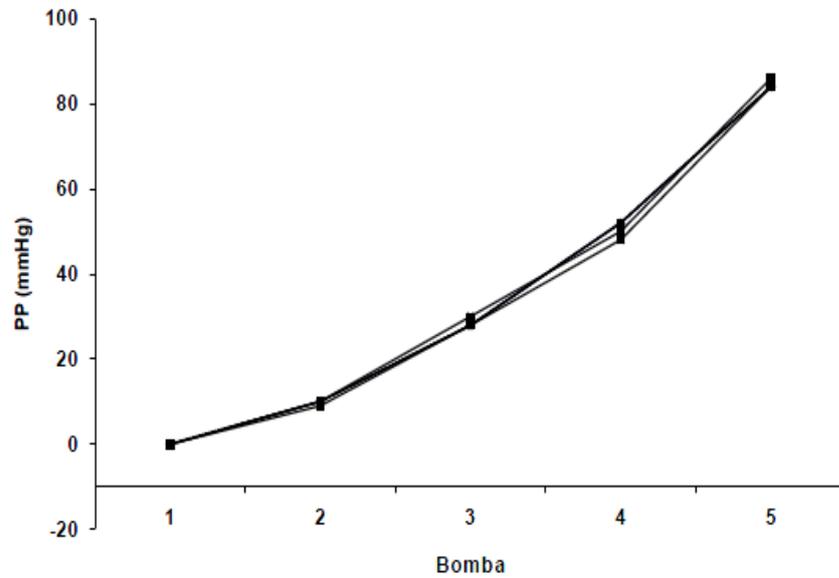


Figura 13: Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n = 6).

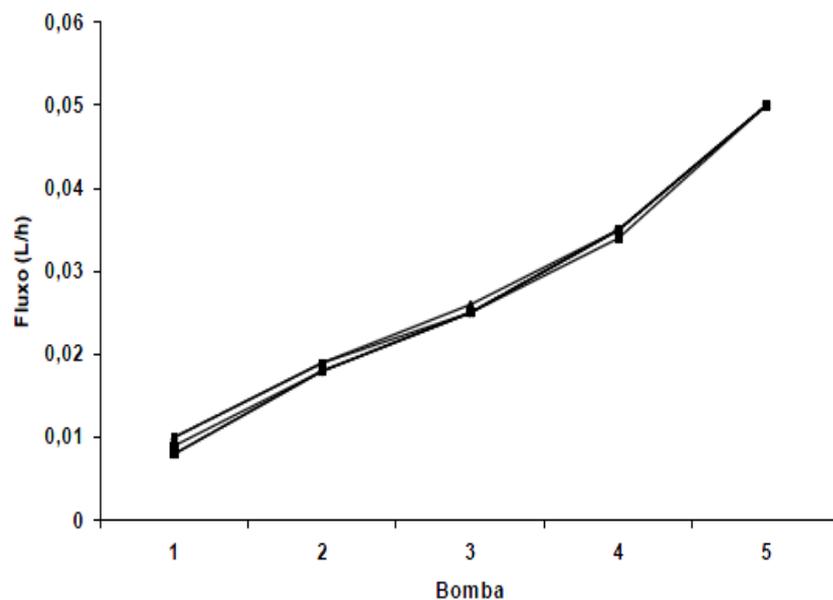


Figura 14: Valores registrados pelo fluxômetro (L/min) durante a calibração do sistema (n=6).

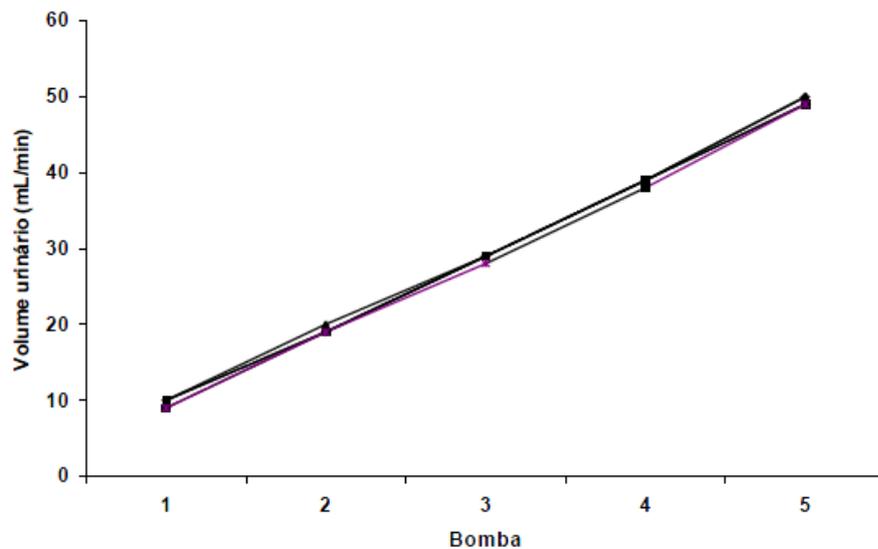


Figura 15: Valores de volume urinário (mL/min) registrados durante a calibração do sistema (n = 6).

A solução de Krebs-Henseleit modificada, concentrada 20 vezes, continha NaCl = 138g; KCl = 7g; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O = 3,2g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O = 5,8g e Ureia = 10g. Quarenta e oito horas antes dos experimentos, 100 mL desta solução foram separados e acrescidos de NaHCO<sub>3</sub> = 4,2g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O = 0,74g; glicose = 2g e penicilina G potássica cristalina = 0,05g. Em seguida, o volume foi completado para 2000 mL com água bidestilada. Foram retirados 300 mL desta solução, volume ao qual se adicionou albumina bovina (6g%). Esta solução final foi dializada com a albumina, auxiliada por um homogeneizador. A diálise teve como objetivo retirar substâncias contaminantes como piruvatos, citratos e lactatos (COHEN; KOOK; LITTLE, 1977; ROSS, 1978).

A solução de Krebs-Henseleit modificada para diálise foi trocada com 24 horas. No final, após 48 horas de diálise, a solução perfusora foi acrescida com 0,15g de inulina. O pH da solução perfusora foi ainda ajustado entre os valores de 7,3 a 7,4.

### Protocolo experimental

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50mg/Kg de peso corporal. As cirurgias foram realizadas segundo o método descrito por BALHLAMANN, GIEBISCH e OCHWADT (1967), ROSS (1978). Inicialmente, a veia femoral foi isolada e manitol (100mg/mL–3mL) foi administrado a fim de facilitar a visualização e a fixação da cânula ao ureter.

Após assepsia da parede abdominal, procedeu-se uma incisão mediana e duas incisões perpendiculares à linha alba para uma melhor observação das estruturas anatômicas. Com uma lupa o ureter foi identificado, dissecado e canulado com um tubo de polietileno PE-30. A artéria renal foi isolada e canulada através da artéria mesentérica superior. Durante o procedimento cirúrgico, uma parte da solução já oxigenada (40 mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim ainda *in vivo*, evitando qualquer isquemia ao órgão. Finalmente, o rim foi transportado para o sistema de perfusão *in vitro*, sem a interrupção do fluxo (figura 16).



Figura 16: Fotografia do rim de rato isolado no sistema de perfusão.  
(Fonte: LAFAVET –UFC).

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. Os 30 min iniciais foram utilizados como controle interno. A cada cinco minutos foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão em manômetro e fluxômetro, respectivamente, em um período total de 120 min. Amostras do perfusato e da urina foram coletadas a cada dez minutos e depois congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e osmolaridade, importantes na determinação dos seguintes parâmetros de função renal: pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), ritmo de filtração glomerular (RFG), fluxo urinário (FU) e transporte tubular de sódio ( $\%TNa^{+}$ ), potássio ( $\%TK^{+}$ ) e cloreto ( $\%TCl^{-}$ ).

### 4.11.3 Análises bioquímicas

Nas amostras de urina e perfusato foram realizadas dosagens de sódio, potássio e cloreto utilizando aparelho de íons eletrodos seletivos (RapidChem 744 – Bayer® diagnostica). A inulina do perfusato e da urina foi determinada por hidrólise direta, conforme Walser, Davidson e Orloff (1955) e Fonteles *et al.* (1983) com modificações que reduziram as quantidades de amostras e reagentes utilizados. Para tanto, foram realizadas leituras fotométricas em espectrofotômetro e a osmolaridade determinada através de osmômetro (*Vapor pressure osmometer* – modelo 5520 ESCOR).

### 4.11.4 Cálculo dos parâmetros funcionais renais

O quadro 1 apresenta as fórmulas utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais (MARTINEZ-MALDONADO *et al.*, 1978).

**Quadro 1** : Fórmulas utilizadas para determinação dos parâmetros renais

Parâmetros renais	Fórmula
1. <b>PP</b> (mmHg)- Pressão de Perfusão	Leitura em manômetro
2. <b>FU</b> (mL.g <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> ) – Fluxo Urinário	<b>FU</b> = Peso do volume urinário/ peso do rim esquerdo x 10
3. <b>RFG</b> (mL .g <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> ) – Ritmo de Filtração Glomerular	<b>RFG</b> = (DOU <sub>in</sub> / DOP <sub>in</sub> x FU) sendo DOU <sub>in</sub> = densidade ótica da inulina na urina e DOP <sub>in</sub> = densidade ótica da inulina no perfusato.
4. <b>FPR</b> (mL .g <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> ) – Fluxo de perfusão renal	Registrado a cada 10 min/peso do rim/intervalo de tempo

5.	<b>RVR</b> ( $\text{mmHg/mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) – Resistência vascular renal.	<b>RVR</b> = PP (mmHg) / FPR
6.	<b>FNa<sup>+</sup></b> ( $\mu\text{Eq.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) – Sódio filtrado	<b>FNa<sup>+</sup></b> = RFG x PNa <sup>+</sup>
7.	<b>ENa<sup>+</sup></b> ( $\mu\text{Eq.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) – Sódio excretado	<b>ENa<sup>+</sup></b> = FU x UNa <sup>+</sup>
8.	<b>TNa<sup>+</sup></b> ( $\mu\text{Eq.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) - Sódio transportado	<b>TNa<sup>+</sup></b> = FNa <sup>+</sup> - ENa <sup>+</sup>
9.	<b>%TNa<sup>+</sup></b> - Percentual de sódio transportado	<b>%TNa<sup>+</sup></b> = TNa <sup>+</sup> x 100/ FNa <sup>+</sup>
10.	<b>FKa<sup>+</sup></b> ( $\mu\text{Eq.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) – Potássio filtrado	<b>FKa<sup>+</sup></b> = RFG x PKa <sup>+</sup>
11.	<b>EK<sup>+</sup></b> ( $\mu\text{Eq.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) – Potássio excretado	<b>EK<sup>+</sup></b> = FU x UKa <sup>+</sup>
12.	<b>TK<sup>+</sup></b> ( $\mu\text{Eq.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) – Potássio transportado	<b>TK<sup>+</sup></b> = FK <sup>+</sup> - EK <sup>+</sup>
13.	<b>%TK<sup>+</sup></b> - Percentual de potássio transportado	<b>%TK<sup>+</sup></b> = TK <sup>+</sup> x 100/ FK <sup>+</sup>
14.	<b>TCI<sup>-</sup></b> ( $\mu\text{Eq.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) – Cloreto transportado	<b>TCI<sup>-</sup></b> = FCI <sup>-</sup> - ECI <sup>-</sup>
15.	<b>%TCI<sup>-</sup></b> - Percentual de cloreto transportado	<b>%TCI<sup>-</sup></b> = TCI <sup>-</sup> x 100/ FCI <sup>-</sup>
16.	<b>FCI<sup>-</sup></b> ( $\mu\text{Eq.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) – Cloreto filtrado	<b>FCI<sup>-</sup></b> = RFG x PCI <sup>-</sup>
17.	<b>ECI<sup>-</sup></b> ( $\mu\text{Eq.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) – Cloreto excretado	<b>ECI<sup>-</sup></b> = FU x UCI <sup>-</sup>

#### 4.12 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e submetidos à análise estatística através da análise de variância Anova de uma via, seguido do pós-teste de Dunnett para comparações com experimento controle, Bonferroni para comparações entre pares de grupos. Valores de p menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados estatisticamente significativos.

#### **4.13 Comitê de Ética**

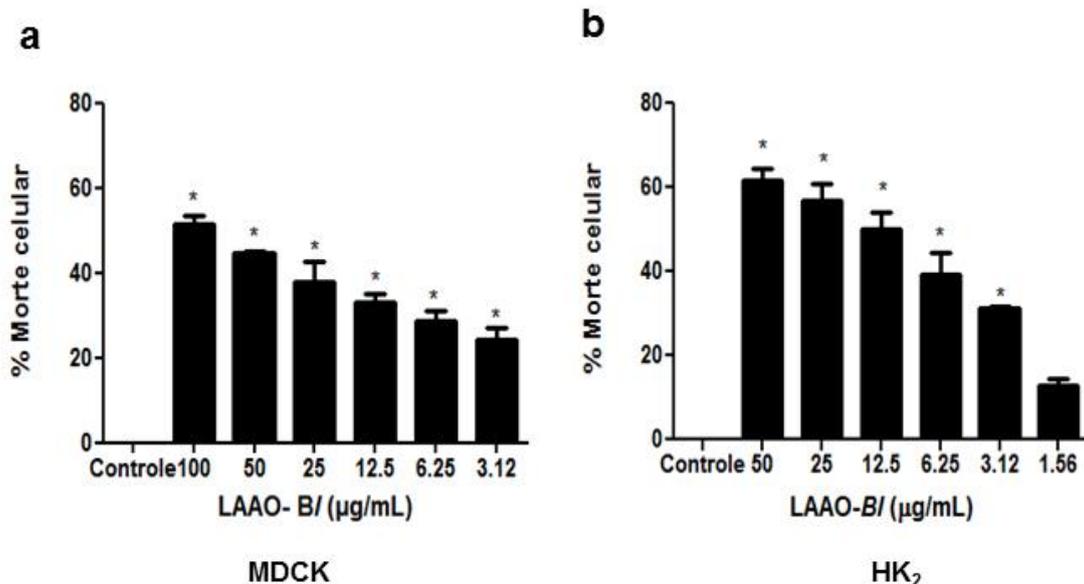
Todos os nossos experimentos que foram utilizados animais foram feitos de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (número de protocolo 79/08).

## ***RESULTADOS***

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Efeito da LAAO-*Bl* sobre a indução de morte nas células tubulares renais (MDCK e HK2).

A citotoxicidade da LAAO-*Bl* foi avaliada em células tubulares renais (MDCK e HK2) após 12 horas de exposição a diferentes concentrações da toxina através do teste do MTT. Como mostrado na Fig. 17, LAAO-*Bl* induziu significativa morte celular de maneira concentração dependente ( $p < 0.05$ ) em ambas as linhagens celulares.

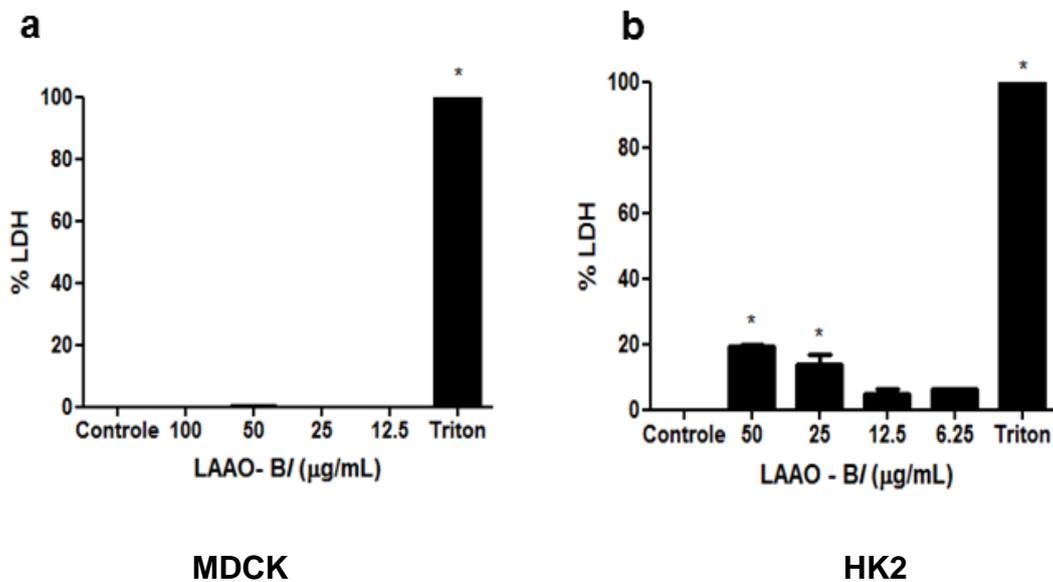


**Figura 17: Efeito da LAAO-*Bl* sobre a viabilidade de células tubulares renais ensaio com MTT.** As células foram tratadas com diferentes concentrações de LAAO-*Bl* por 12 h. Os resultados se expressam como porcentagem de morte celular das amostras tratadas comparadas com as amostras controle. Valores foram dados como média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (teste Anova One-way, seguido do pós-teste de Dunnett).

### 5.2 Efeito da LAAO-*Bl* sobre a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH).

Para avaliar se a morte celular por necrose está implicada na diminuição da viabilidade celular, o sobrenadante de cultivo dos poços tratados com LAAO-*Bl* foi

removido para determinação dos níveis de LDH, uma enzima citoplasmática presente em todas as células e liberada quando a integridade da membrana é rompida. Como podemos observar na figura 18, nas células MDCK não foi observado liberação de LDH após 12 horas de tratamento com LAAO-*B1* (Fig 18a). LAAO-*B1* induziu ruptura da membrana nas células HK2 nas maiores concentrações estudadas (50 e 25  $\mu\text{g/mL}$ ) em relação ao controle não tratado (Fig 18b).

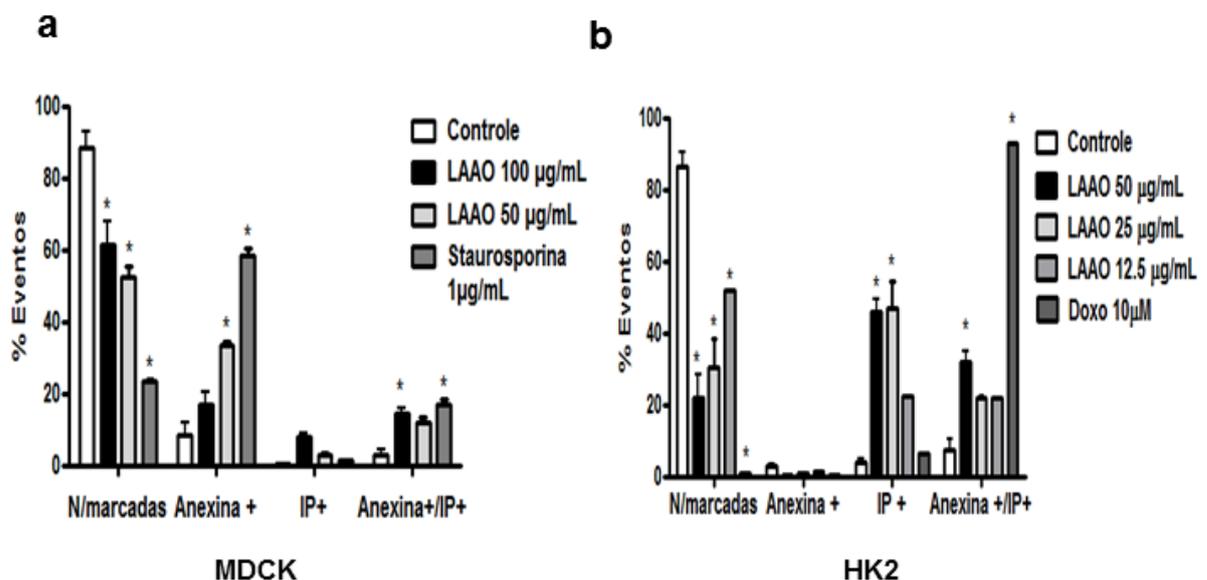


**Figura 18: Efeito da LAAO-*B1* sobre a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH).** Liberação percentual da enzima lactato desidrogenase (LDH) nas células MDCK (a) e HK2 (b) induzidas pelo tratamento com LAAO-*B1* por 12 horas. Valores foram dados como média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (teste Anova One-way, seguido do pós-teste de Dunnett).

### 5.3 Análise do tipo de morte celular por citometria de fluxo

Com o objetivo de identificar as modalidades de morte celular envolvidas nos nossos resultados, analisamos diferentes marcadores de apoptose e necrose. A exposição da fosfatidilserina (PS) no folheto exterior da membrana plasmática é geralmente considerada uma característica de apoptose. Assim, a coloração de células com FITC anexina V, que se liga a PS, é considerada um marcador de apoptose precoce. O iodeto de propídio (IP) é um agente de intercalação do DNA que pode ser incorporado nas células apenas depois de grandes danos da membrana celular (IP). Assim, a coloração de anexina V/IP foi utilizada para detectar

células apoptóticas / necróticas após tratamento com LAAO-*Bl*. Nas células MDCK, LAAO-*Bl* significativamente aumentou a porcentagem de células em apoptose (Anexina-V<sup>+</sup>, IP<sup>-</sup>), necrose (Anexina-V<sup>-</sup>, IP<sup>+</sup>) e necrose secundária (Anexina-V<sup>+</sup>, IP<sup>+</sup>) quando comparado ao grupo controle sem tratamento (Fig. 19a). Nas células HK-2, corroborando com os dados obtidos da liberação de LDH, Anexina-V- IP demonstrou um aumento na porcentagem de células em necrose (células IP<sup>+</sup>) e em necrose secundária (Anexina-V<sup>+</sup>, IP<sup>+</sup>) de maneira concentração dependente (Fig. 19b). O tratamento com estaurosporina (1 µg/mL) e doxorubicina (10 µM) por 12 horas foi usado como controle positivo.

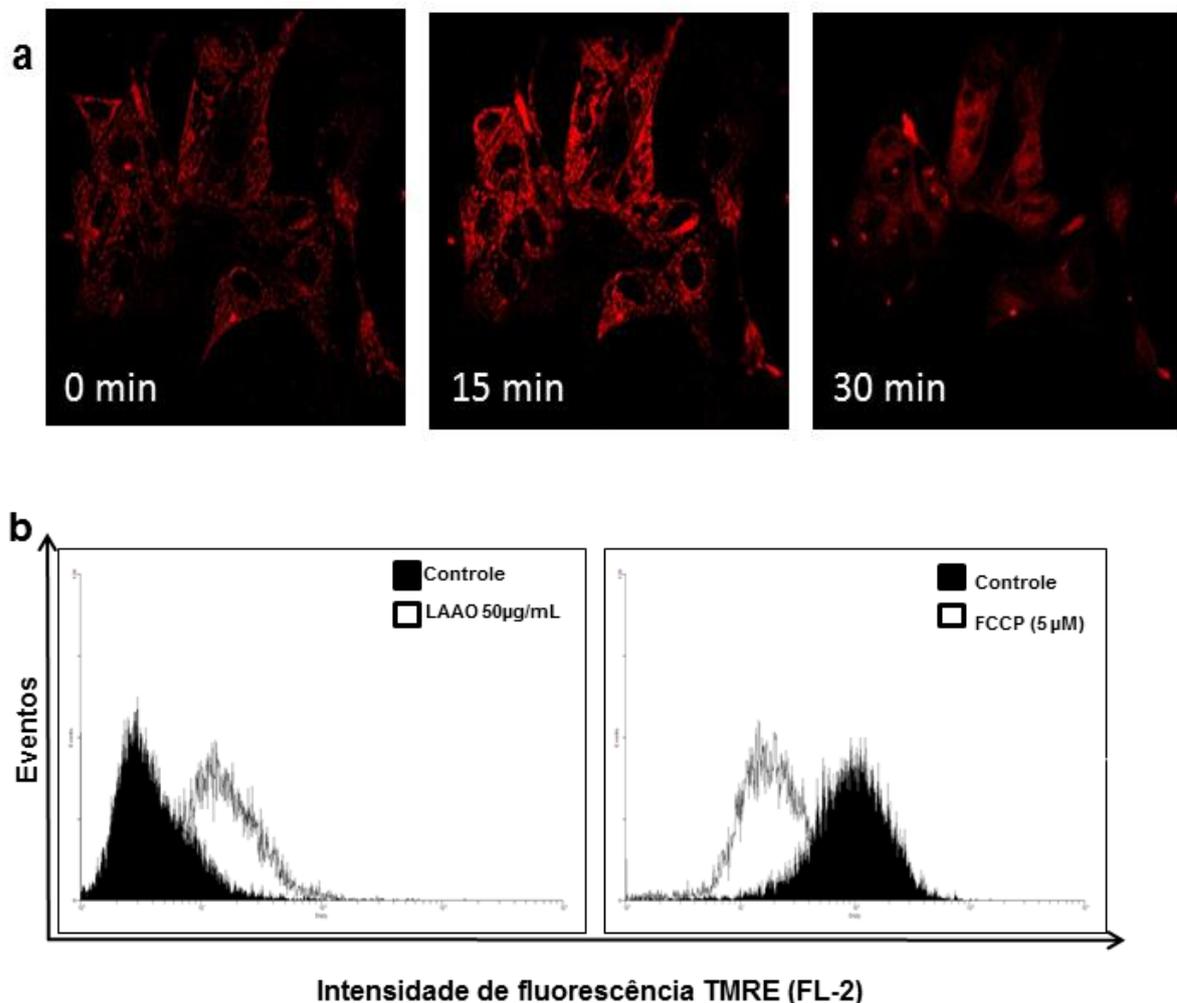


**Figura 19: Análise do tipo de morte celular por citometria de fluxo:** Quantificação do tipo de morte celular (Apoptose/Necrose) utilizando marcação de fluorescência com Anexina V e Iodeto de Propídeo (IP) nas células MDCK (a) e HK2 (b) expostas a diferentes concentrações de LAAO-*Bl* por um período de 12h. Cinco mil eventos foram considerados em cada experimento. Estaurosporina (1 µg/mL) e Doxorubicina (10 µM) foram usadas como controle positivo. Valores foram dados como média ± EPM de três experimentos independentes. \* p < 0,05 comparado ao grupo controle (teste Anova One-way, seguido do pós-teste de Dunnett).

#### 5.4 Efeito da LAAO-*Bl* sobre o potencial de membrana mitocondrial nas células MDCK

Para verificar o efeito de LAAO-*Bl* sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), a intensidade de fluorescência do tetrametilrodamina etil ester (TMRE) foi mensurada, o qual indicou o  $\Delta\Psi_m$  usando experimentos em tempo real (50 µg/mL, 30 min) ou citometria de fluxo (50 µg/mL, 12h). Foi demonstrado após

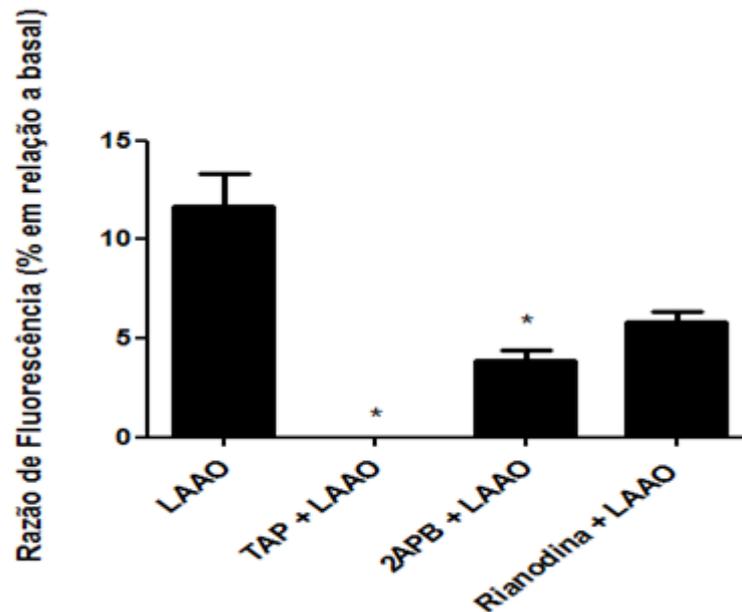
tratamento com LAAO-*BI* (15 min) que o sinal de fluorescência das células MDCK aumentou rapidamente (hiperpolarização) (Fig 20a). Os dados foram confirmados por citometria de fluxo, LAAO-*BI* induziu um aumento na fluorescência do TMRE indicando que o  $\Delta\Psi_m$  também aumentou quando as células MDCK foram expostas a LAAO-*BI* (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 12 horas (Fig 20b). Para testar a sensibilidade do TMRE, FCCP, um desacoplador da fosforilação oxidativa, foi adicionado às células com TMRE. Após adição de FCCP, a fluorescência do TMRE diminuiu imediatamente indicando despolarização mitocondrial (30 Min).



**Figura 20: Medida do  $\Delta\Psi_m$  nas células MDCK:** As células MDCK foram marcadas com TMRE 50 nM por 15 min, 37 °C, antes e após a adição de LAAO-*BI* (a) A aquisição das imagens foi feita em microscópio confocal. 0 min : Células marcadas com TMRE- 15 min : após a exposição com LAAO-*BI* que mostra o aumento do  $\Delta\Psi_m$  nas células MDCK em relação aos níveis basais. 30 min: Células foram tratadas com o desacoplador FCCP (5  $\mu\text{M}$ ) usado como controlo positivo (b) histogramas representativos obtidos a partir de células MDCK marcadas com TMRE, expostas a LAAO-*BI* (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e analisadas por citometria de fluxo.

### 5.5 Efeito da LAAO-*Bl* na mobilização de cálcio citosólico nas células MDCK.

Nosso próximo objetivo foi avaliar a mobilização de cálcio citosólico induzida por LAAO-*Bl* nas células MDCK. Para tanto, as células foram incubadas com o indicador de cálcio citosólico Fura-2 AM. A aquisição das imagens foi feita em tempo e espaço reais, por meio de um microscópio de fluorescência Nikon TE300 (Nikon Osaka, Japão) acoplado a uma câmera digital CoolSnap (Roper Sci, Princeton Instruments, USA), de alta resolução com sistema de resfriamento para diminuição de ruídos e aumento da resolução. Podemos observar na figura 21 que LAAO-*Bl* (50µg/mL) induziu um aumento significativo de  $Ca^{2+}$  citosólico. Como o retículo endoplasmático (RE) é a principal organela responsável pela liberação de cálcio citosólico, pré tratamos as células com tapsigargina (2 µM), que inibe a atividade da SERCA presente no RE, e avaliamos a resposta de LAAO-*Bl* (50µg/mL). Notavelmente, a mobilização de  $Ca^{2+}$  por LAAO-*Bl* foi diminuída nesta condição devido à inibição da bomba de cálcio do retículo (SERCA). Para definir o mecanismo que LAAO-*Bl* promove a liberação de  $Ca^{2+}$  a partir do retículo, e elucidar o possível envolvimento dos canais de  $Ca^{2+}$  nessas respostas, as células MDCK foram pré tratadas com diferentes inibidores dos canais de  $Ca^{2+}$  do retículo, tais como rianodina (20 µM, 20 min) e 2-APB (100 uM, 10 min), que inibem a liberação de  $Ca^{2+}$  do receptor de rianodina e IP3, respectivamente. Os nossos resultados mostraram que rianodina e 2-APB foram capazes de diminuir a resposta de LAAO-*Bl* na mobilização de  $Ca^{2+}$  do retículo, sugerindo uma regulação desses canais na mobilização de cálcio intracelular induzida por LAAO-*Bl*. Os valores médios do aumento de  $Ca^{2+}$  citosólico, obtidos a partir destes experimentos, estão graficamente representados na figura 21. Os resultados representam a média de pelo menos três experimentos, com número de células variado.

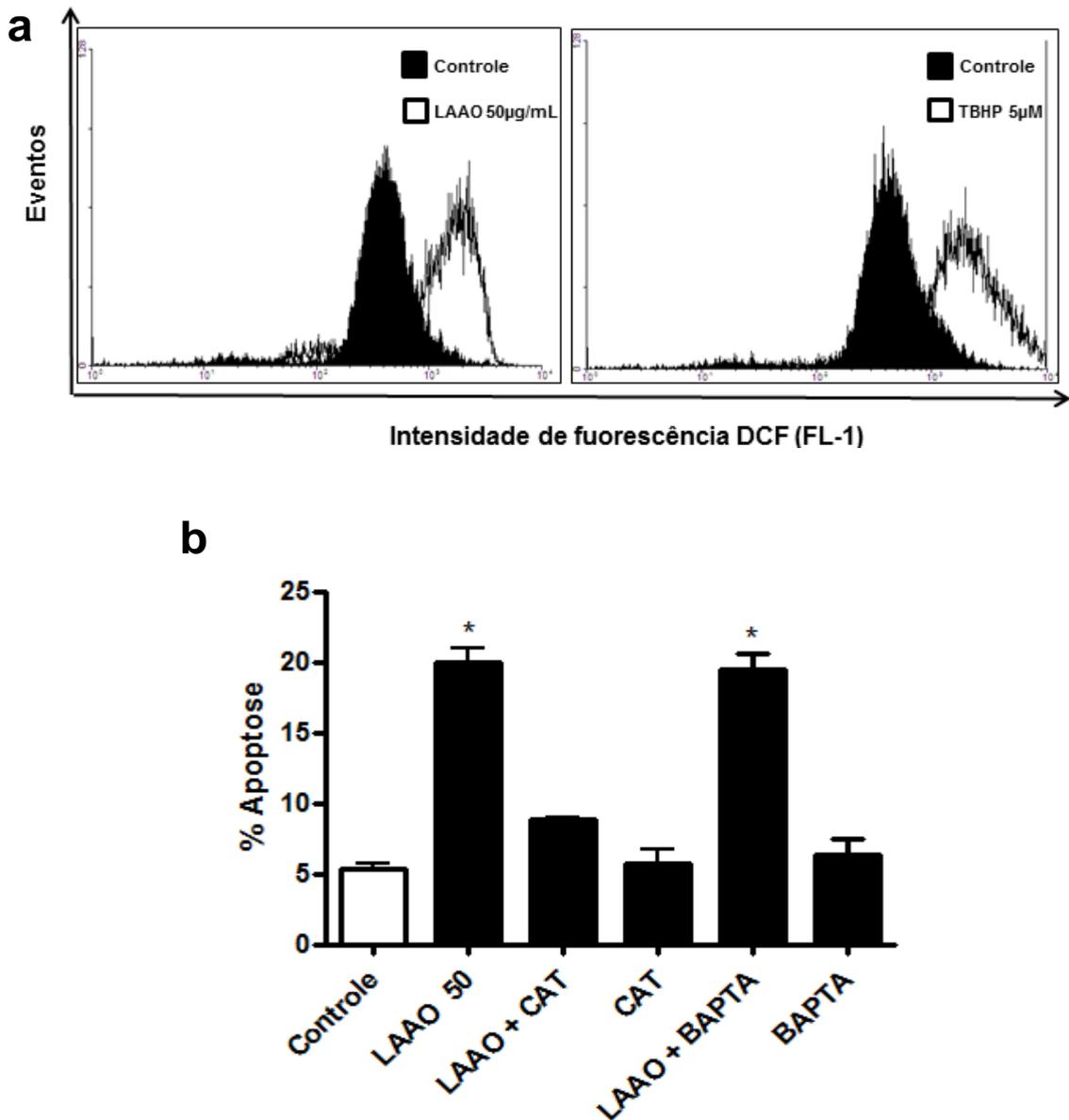


**Figura 21: Efeito da LAAO-*Bl* na mobilização de cálcio citosólico nas células MDCK:** Gráfico de colunas representando os efeitos máximos do aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico em relação ao basal (considerado como valor zero), nas células MDCK. As células MDCK foram carregadas com Fura-2 AM e as respostas máximas de cálcio promovidas pela adição de LAAO-*Bl* (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) na presença de diferentes antagonistas: tapsigargina (TAP, 2  $\mu\text{M}$ , 20 min), 2-APB (100  $\mu\text{M}$ , 10 min) e rianodina (20  $\mu\text{M}$ , 20 min). \* representa as diferenças entre LAAO x (TAP+LAAO, 2APB+LAAO). Diferença considerada quando  $p < 0,05$  (one-way ANOVA; pós-teste: Tukey).

## 5.6 Estresse oxidativo induzido por LAAO-*Bl* nas células MDCK

Para investigar o possível envolvimento da produção de EROS no mecanismo de citotoxicidade de LAAO-*Bl*, analisamos os níveis de EROS nas células MDCK após exposição a LAAO-*Bl* (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Para este efeito, as células foram marcadas com diacetato de 7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) um marcador não-fluorescente de células-permeáveis que se transforma em altamente fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína após oxidação. As alterações na fluorescência foram analisadas por citometria de fluxo. LAAO-*Bl* induziu um aumento dos níveis de EROS intracelulares observado através da mudança significativa do pico (mudança na intensidade de fluorescência relativa), quando comparado com o grupo controle sem tratamento (Fig. 22a). O agente oxidante tercbutilhidroperóxido- (t-BHP) foi usado como controle positivo. Para melhor avaliar o papel do aumento do cálcio e do estresse oxidativo na sinalização da apoptose induzida por LAAO-*Bl*, as células MDCK foram pré tratadas com BAPTA-AM (20  $\mu\text{M}$ , 30 min), um quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ , e

catalase (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30 min) que bloqueia a ação do peróxido. Nossos resultados mostraram que apoptose induzida por LAAO-*Bl* nas células MDCK não foi revertida quando bloqueamos a ação do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Por outro lado, ao bloquear a ação do peróxido de hidrogênio, houve uma redução significativa na apoptose induzida por LAAO-*Bl*, confirmando a importância da produção de EROS na sinalização da apoptose induzida por LAAO-*Bl* (Fig. 22b)

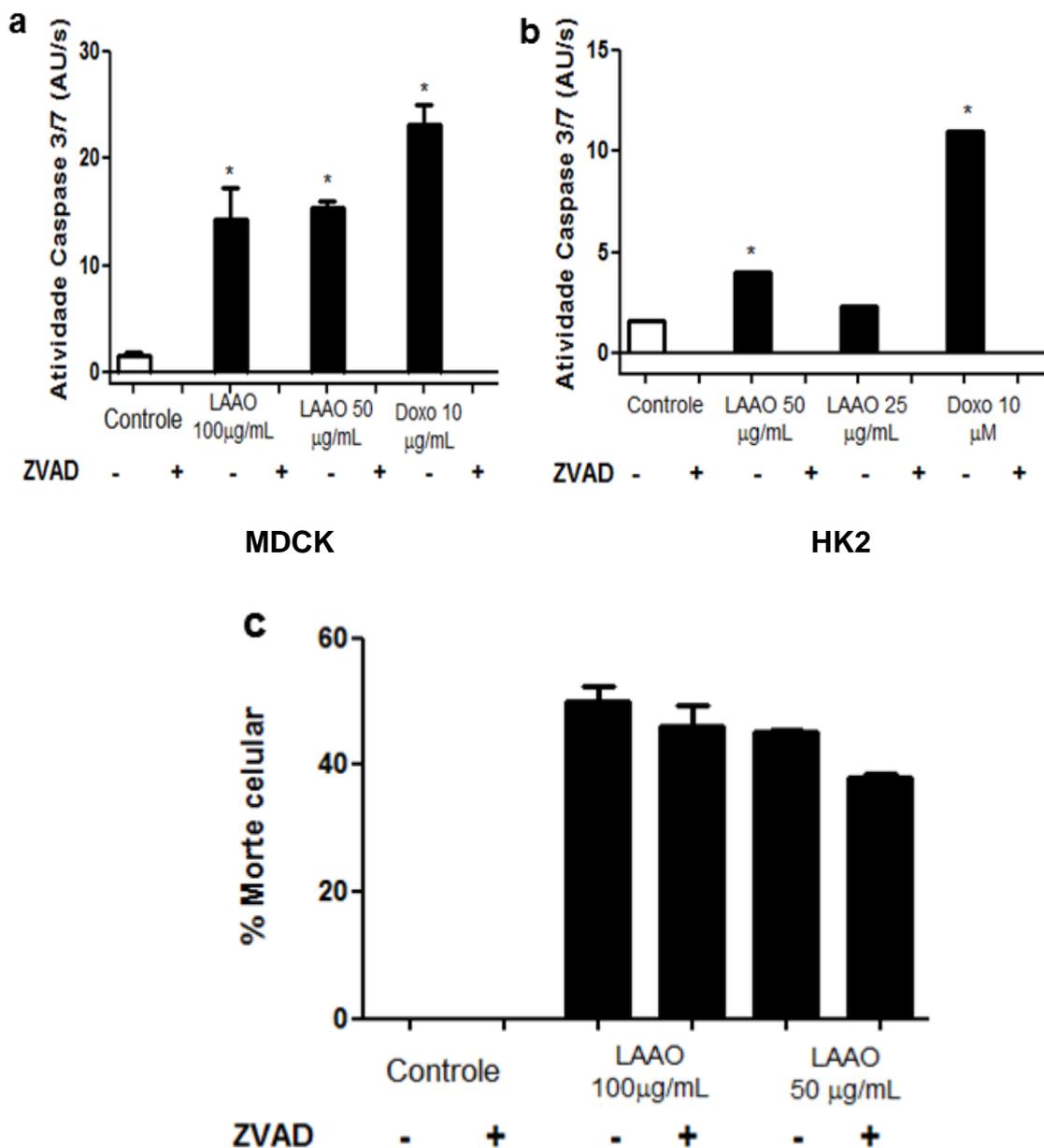


**Figura 22: Determinação do aumento intracelular de EROS nas células MDCK: (a)** As células MDCK foram tratadas com LAAO-*Bl* (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 12h e foram incubadas com DCFH-DA (5  $\mu\text{M}$ , 30 min a 37°C), em seguida, examinadas por citometria de fluxo. Geração de ROS foi expressa como uma proporção da intensidade de fluorescência relativa em comparação com o grupo controle. Foi utilizado t-BHP (5  $\mu\text{M}$ ) como controle positivo. **(b)** Análise quantitativa do percentual de apoptose por citometria de fluxo de células marcadas com iodeto de propídio (IP, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) após tratamento com LAAO-*Bl* (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 12 horas, na presença ou ausência de catalase (CAT- 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou

BAPTA-AM (20  $\mu$ M). Os dados representam a média  $\pm$  SEM de pelo menos três experimentos independentes. \* Diferença considerada quando  $p < 0,05$  (one-way ANOVA; pós-teste: Dunnett).

### **5.7 Avaliação da ativação de caspases efetoras do processo de morte celular por apoptose.**

A fim de confirmar o efeito apoptótico da LAAO-*BI* nas células tubulares renais (MDCK e HK2), avaliamos a ativação da via das caspases. Para tanto, medimos a atividade destas enzimas sobre substratos específicos. O substrato Ac-DEVD-afc foi usado para avaliar a atividade da caspase efetora 3 (ou 7, pois o substrato seria o mesmo), chave no processo de apoptose, sendo responsável por clivar e iniciar a degradação da grande maioria das proteínas celulares. A figura 23a mostra que nas células MDCK houve ativação da caspase 3 e 7 nas concentrações de 100 e 50  $\mu$ g/mL e nas células HK2 na concentração de 50  $\mu$ g/mL de LAAO-*BI* (Fig 23b). Este resultado de ativação da via das caspases indica um envolvimento desta via na toxicidade de LAAO-*BI* em ambas as linhagens celulares. Para melhor avaliarmos a atividade das caspases, tratamos as células com inibidores específicos das caspases estudadas (ZVAD- 10  $\mu$ M). Verificamos que a atividade da caspase 3/7 é inibida pelo pré tratamento das células com ZVAD (Fig 23ab). Este resultado demonstra que o inibidor específico da caspase 3/7 leva a interrupção do sinal apoptótico no final da via das caspases, e não ocorre a clivagem de pró-caspase 3 em caspase 3 ativa. Porém a interrupção do sinal apoptótico por ZVAD foi incapaz de proteger as células MDCK da toxicidade induzida por LAAO-*BI* (Fig 23c)

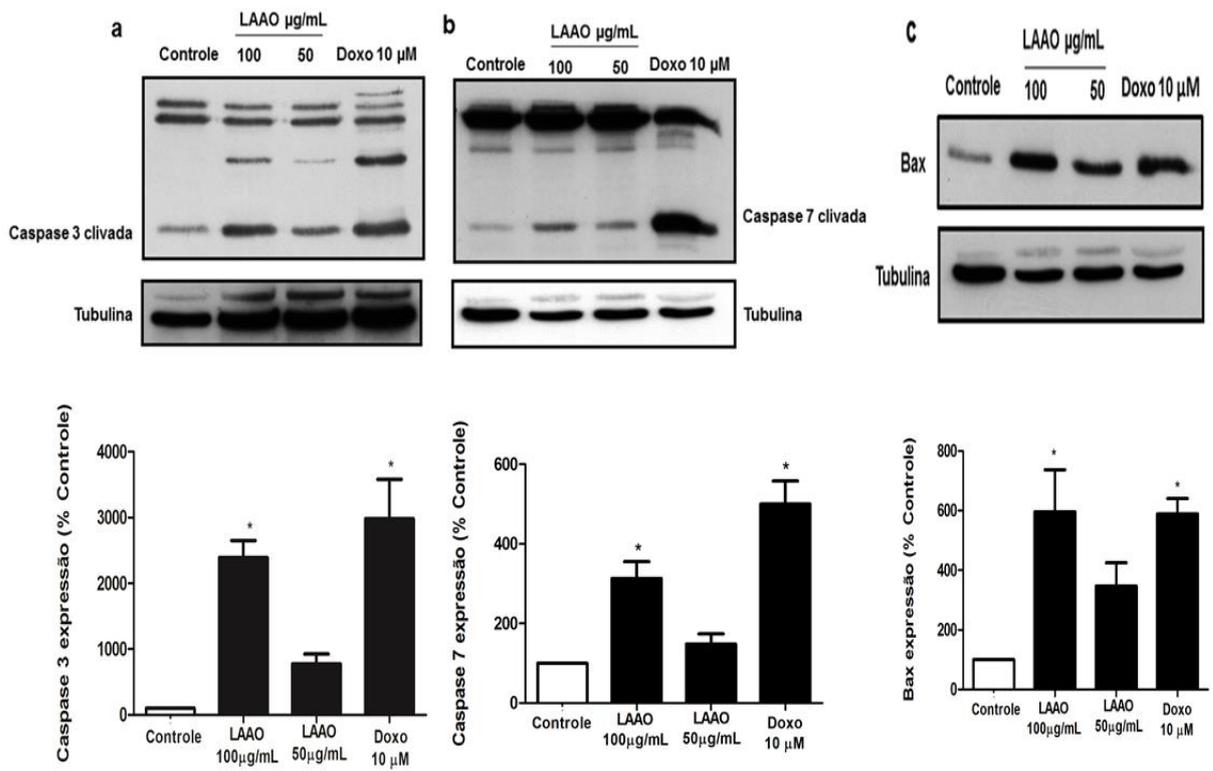


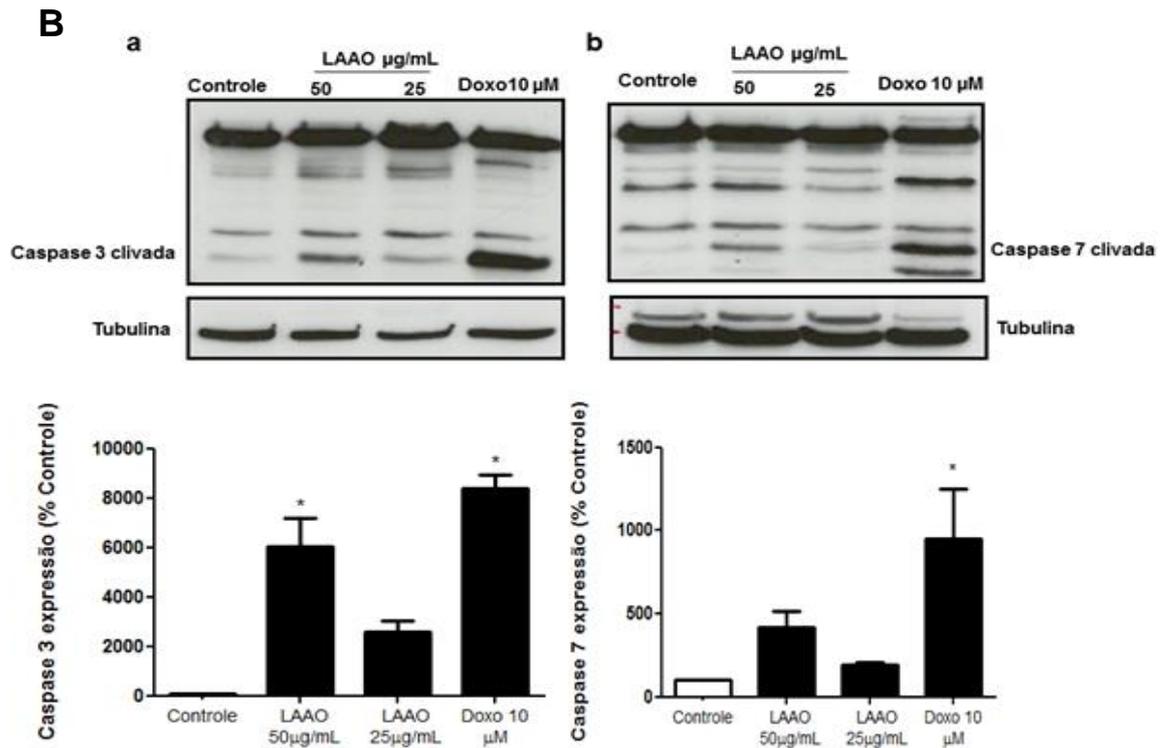
**Figura 23: Avaliação da ativação de caspases executoras:** A atividade da caspase-3/7 foi determinada na presença do substrato Ac-DEVD-AFC fluorogênico após o tratamento com LAAO-*Bl* (12 h) na presença ou ausência de zVAD (10 µM) nas células MDCK **(a)** e HK-2 **(b)**. Diferença considerada quando  $p < 0,05$  (one-way ANOVA; pós-teste: Dunnet). **(c)** Porcentagem de morte celular induzida por LAAO-*Bl* na presença ou ausência de ZVAD (10 µM), ensaio realizado pelo teste do MTT.

Para confirmar o mecanismo envolvido na apoptose induzida por LAAO-*Bl* nós analisamos a expressão de proteínas pró apoptóticas e de caspases executoras da apoptose. Como mostrado na figura 24A- abc, nas células MDCK o tratamento com LAAO-*Bl* induziu aumento de expressão da caspase 3 e 7 clivada e da proteína pró apoptótica Bax após 12 horas de tratamento. Nas células HK2 LAAO-*Bl* (50

$\mu\text{g/mL}$ ) induziu aumento da expressão da caspase 3 e 7 clivada (Fig 24B-ab). Como controle interno foi utilizada a proteína tubulina. Doxorrubicina (Doxo)  $10 \mu\text{M}$  foi usada como controle positivo

## A



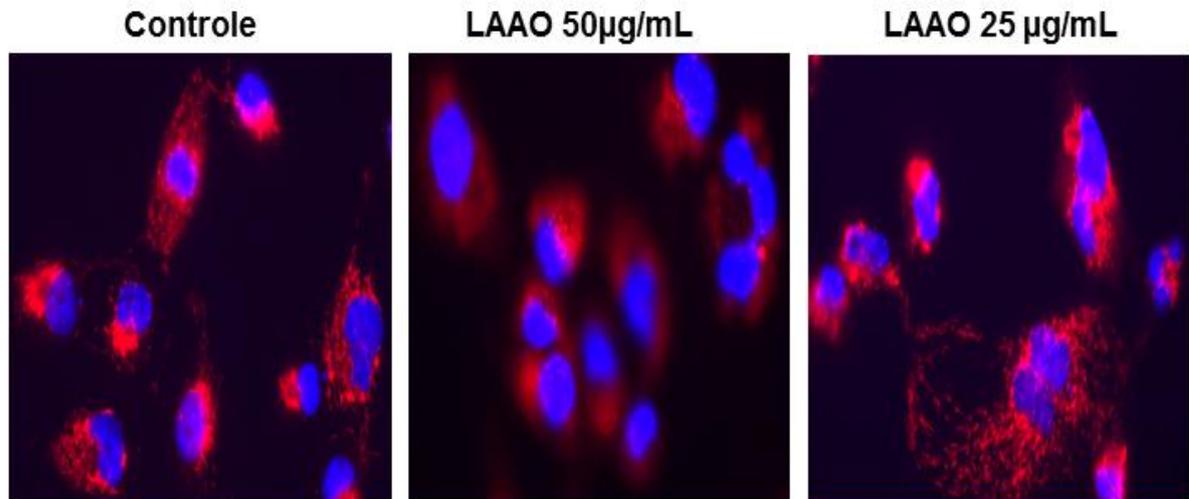


**Figura 24: Western blotting das proteínas envolvidas na morte celular por apoptose.** As células MDCK e HK2 foram tratadas com LAAO-*Bl* por 12 horas nas concentrações indicadas na figura. **A (a)** caspase 3, **(b)** caspase 7, **(c)** Bax nas células MDCK. **B (a)** caspase 3, **(b)** caspase 7 nas células HK2. As figuras mostradas são representativas de 2 experimentos independentes. As bandas de proteínas foram analisadas e normalizadas para os valores densitométricos de Tubulina: Controle interno. Doxorubicina (Doxo 10  $\mu\text{M}$ ) controle positivo.

### 5.8 Avaliação da liberação de citocromo c induzido por LAAO-*Bl* nas células HK2

Uma vez que verificamos ativação da via das caspases e, na tentativa de elucidar se a apoptose induzida nas células HK2 por LAAO-*Bl* envolve a via mitocondrial, realizamos o ensaio de liberação do citocromo c por imunofluorescência. O citocromo c uma vez liberado, induz a formação dos apoptossomos, contendo Apaf-1 (Apoptosis Protease-activating Factor-1), o iniciador pró-caspase 9 e o próprio citocromo c. Este complexo leva à clivagem de pró-caspase 9 e inicia a cascata de caspases efetoras 3 e 7 (YANG *et al.*, 2015). Para avaliar a liberação de citocromo c, as células HK2 foram tratadas com LAAO-*Bl* nas concentrações de 50 e 25  $\mu\text{g/mL}$  pelo tempo de 6 horas. Os resultados obtidos estão demonstrados na figura 25. Observa-se no controle o padrão de localização do

citocromo c (morfologia tubular) e nas células que foram tratadas com LAAO-*B1* verifica-se um padrão difuso, indicando que houve a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol.

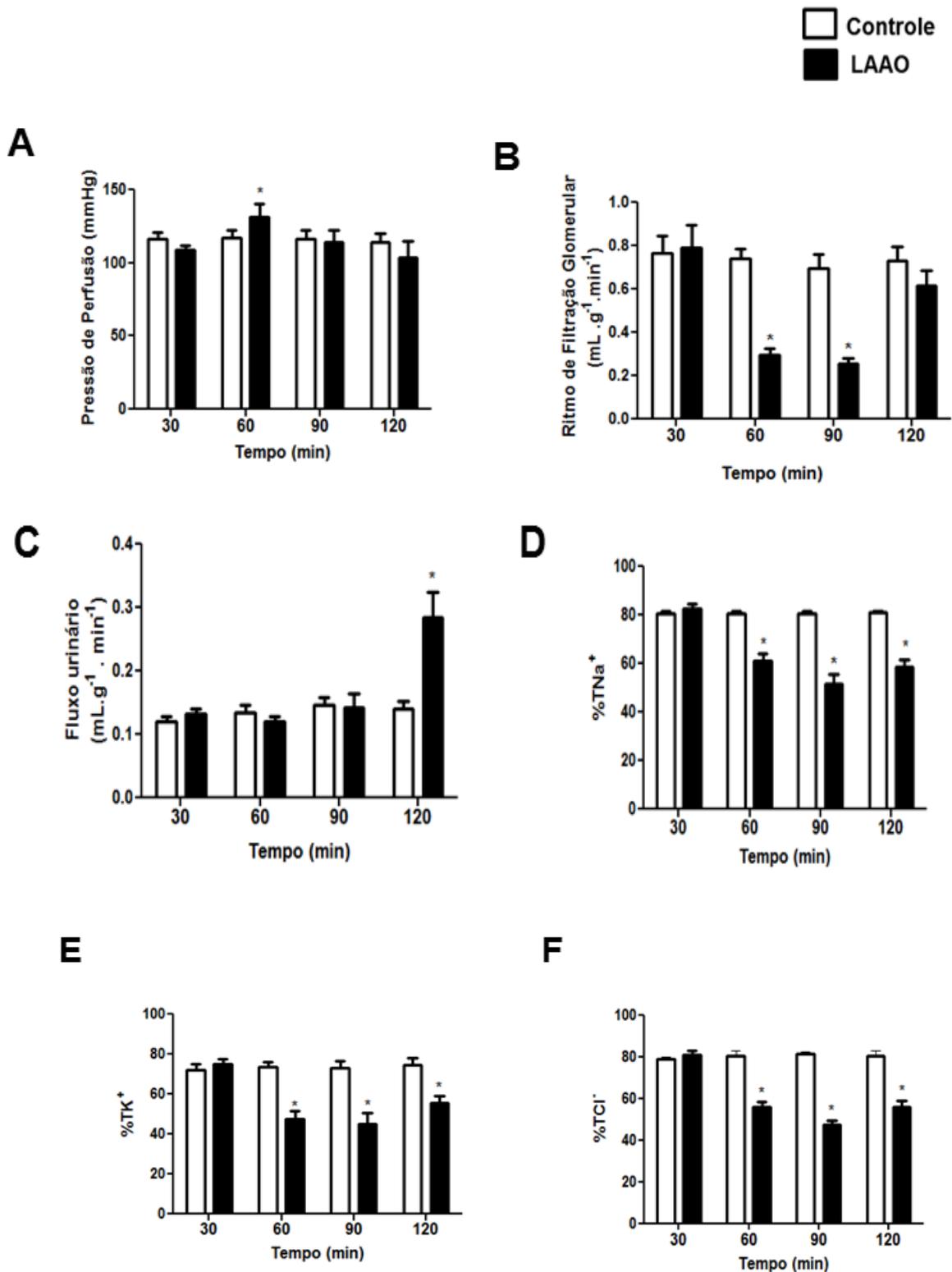


**Figura 25: Efeito da LAAO-*B1* na liberação de citocromo c no citosol nas células HK2:** As células HK2 foram tratadas com LAAO-*B1* por 6 horas nas concentrações indicadas na figura. As células foram marcadas com um anticorpo primário contra Citocromo c (SC13561; Santa Cruz), seguido de anti-IgG de rato conjugado com FITC (Jackson ImmunoResearch). As imagens foram obtidas usando o microscópio Leica DM 6000 (câmera Leica DC500) com uma objetiva de 20X

### 5.9 Efeitos da LAAO-*Bl* em rim isolado de rato

LAAO-*Bl* foi administrada ao sistema de perfusão de rim isolado 30 minutos após o início dos experimentos. Os 30 minutos iniciais foram considerados como controle interno de cada experimento. Os grupos tratados foram comparados a um grupo controle, onde os rins foram perfundidos apenas com a solução de Krebs-Heinselet.

LAAO-*Bl* (10 µg/mL) induziu alterações significativas nos parâmetros fisiológicos renais. A Pressão de Perfusão (PP) aumentou aos 60 min e retornou ao normal aos 90 min de perfusão (Fig. 26A). Não houve diferença significativa na Resistência Vascular Renal (RVR) quando comparado ao grupo controle. O Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) diminuiu aos 60 e 90 min de perfusão e normalizou aos 120 min (Fig. 26B). O Fluxo Urinário (FU) aumentou aos 120 minutos (Fig. 26C). Houve redução significativa nos transportes tubular de Sódio, Potássio e Cloreto nos períodos de 60, 90 e 120 min de perfusão (Fig 26. D, E, F).



**Figura 26: Efeitos da LAAO-BI em rim isolado de rato:** Efeitos de LAAO-BI (10 µg/mL) sobre Pressão de Perfusão (A), Ritmo de Filtração Glomerular (B), Fluxo urinário (C), Porcentagem de Transporte tubular de sódio, potássio e cloreto (D, E, F). Os dados são expressos como (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando  $p < 0,05$ . LAAO foi adicionada ao sistema 30 minutos após o início de cada perfusão.

***DISCUSSÃO***

## 6. DISCUSSÃO

A serpente *B. leucurus* é endêmica no Nordeste do Brasil, sendo responsável por acidentes ofídicos graves notificados nesta região. O quadro clínico do envenenamento por *B. leucurus* tem perfil semelhante àqueles apresentados por outras serpentes do gênero *Bothrops* (SANCHEZ *et al.*, 1992), ou seja, importantes efeitos locais como dor, edema e necrose tecidual e efeitos sistêmicos graves como hemorragia e insuficiência renal aguda (LIRA-DA SILVA., 2009; SATURNINO-OLIVEIRA *et al.*, 2014).

À semelhança das outras espécies do gênero *Bothrops*, a peçonha de *B. leucurus* contém uma variedade de proteínas e enzimas (CECILIO *et al.*, 2013), várias das quais foram isoladas e caracterizadas, incluindo L-amino ácido oxidase (NAUMAN *et al.*, 2011), metaloproteinases (BELLO *et al.*, 2006, SANCHEZ *et al.*, 2007, FERREIRA *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2011; HIGUCHI *et al.*, 2011), Fosfolipases A<sub>2</sub> (HIGUCHI *et al.*, 2007; CECILIO *et al.*, 2013; MARANGONI *et al.*, 2013).

O maior componente protéico do veneno de *Bothrops leucurus* é a enzima L-aminoácido oxidase. Naumann e colaboradores (2011) estudaram vários aspectos da LAAO isolada do veneno de *Bothrops leucurus*, concluindo que essa enzima, apresenta características de uma citotoxina. Entretanto, o mecanismo funcional e a correspondente base estrutural da atividade dessa flavoproteína ainda requerem estudos aprofundados. O conhecimento do mecanismo de ação dessa e de outras toxinas animais nos dá uma melhor compreensão dos mecanismos de envenenamento.

Recentemente, observamos que o veneno de *Bothrops leucurus* induziu nefrotoxicidade no rim isolado de rato, associado com citotoxicidade em células tubulares renais (DE MORAIS *et al.*, 2013). A fim de melhorar o entendimento sobre esse efeito biológico, investigamos o papel da LAAO na nefrotoxicidade do veneno.

Com o objetivo de esclarecer os mecanismos moleculares pelos quais LAAO-*B/* induz nefrotoxicidade avaliamos seu potencial citotóxico em linhagens de células tubulares epiteliais renais. MDCK, isolada do túbulo distal canino (COLLARES-

BUZATO *et al.*, 2002) e HK-2 isolada do túbulo proximal humano (LIN *et al.*, 2014). Nossos resultados mostraram que LAAO-*B* induziu morte celular de maneira concentração dependente em ambas as linhagens. Ensaio de liberação de LDH e marcação com Anexina V/IP sugerem que a morte celular ocorreu por necrose e apoptose.

Existem muitos trabalhos na literatura mostrando que LAAO isolada de outros venenos de serpentes induz apoptose e necrose em diferentes tipos celulares (TORRI *et al.*, 2000; SUN *et al.*, 2003; CISOTTO *et al.*, 2009; NAUMAN *et al.*, 2011; MARCUSSI *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2014). Dentre estes trabalhos, foi observado que LAAO induziu citotoxicidade via apoptose em células endoteliais, células embrionárias renais, células da linhagem monocítica e células cancerígenas (ALI *et al.*, 2000; TORRI *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2002). LAAO isolada de *B. leucurus* induziu morte por apoptose em linhagens de células de câncer de estômago, adenocarcinoma, colorretal e células de fibroblastos humanos (NAUMAN *et al.*, 2011).

O mecanismo de citotoxicidade desencadeado por esta classe de enzimas ainda não está completamente esclarecido. Hipóteses postulam que LAAO liga-se diretamente a superfície da célula, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberado é então acumulado nesta área em uma concentração relativa mais elevada, e a apoptose é desencadeada pela oxidação de membrana. No entanto, evidências experimentais sugerem que o mecanismo de apoptose induzido por LAAO é distinto daquela causada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno (CHUNMEI *et al.*, 2012).

As células tubulares epiteliais são os principais alvos dos efeitos tóxicos dos venenos (MARROTA *et al.*, 2006; SITPRIJA e SITPRIJA, 2012). A apoptose nessas células é responsável pela perda da função renal e pode ser induzida por vários estímulos, incluindo, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, distúrbio na sinalização do Ca<sup>2+</sup> e privação de energia (LIN *et al.*, 2014). Alguns estudos sugerem que a apoptose induzida por LAAO, pode ser sinalizada através da via mitocondrial ou pela via do receptor de morte consequente a um efeito secundário da produção do peróxido (WEI *et al.*, 2009; DEOLINDO *et al.*, 2010) .

Na via intrínseca, ou via mitocondrial, os estímulos gerados no interior da célula levam a ativação de proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak e tBid). Em seguida,

ocorre a ruptura do potencial transmembrânico mitocondrial, fazendo com que ocorra um influxo de íons e ao mesmo tempo a liberação de proteínas pró-apoptóticas como o citocromo c para o citosol. Uma vez liberado, o citocromo c se liga a APAF-1 que facilita a ligação de dATP e a procaspase 9, formando o apoptossomo. O apoptossomo ativa as caspases 3 e 7, que por sua vez vão clivar os substratos protéicos das células, resultando no processo apoptótico (JEONG *et al.*, 2015).

A via extrínseca é deflagrada por estímulos externos que ativam os receptores de morte na superfície celular (TNF, CD95/Fas e TRAIL). Após a ligação do ligante os receptores oligomerizam-se e se ligam à proteína adaptadora FADD (*Fas associated death domain*) presente no citoplasma. Este complexo molecular se liga à pró-caspase-8, resultando na formação do complexo DISC (*Death Inducing Signalling Complex*), onde ocorre a ativação (dimerização/clivagem) da pró-caspase-8, resultando na ativação da caspase-3 efetora, o que culmina na morte celular (CHABANE *et al.*, 2013).

Uma importante característica associada ao dano celular é o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Alterações no potencial de membrana mitocondrial, que pode ser consequência do aumento de espécies reativas de oxigênio ou aumento de  $[Ca^{2+}]_c$ , é considerado um indicador de dano mitocondrial e é geralmente definido como um estágio inicial de apoptose (SMAILI *et al.*, 2003). Assim no presente trabalho, decidimos investigar se LAAO-*BI* seria capaz de sensibilizar as mitocôndrias. Nossos dados mostraram que LAAO-*BI* (50 $\mu$ g/mL) induziu hiperpolarização mitocondrial nas células MDCK. Alguns trabalhos sugerem que o potencial de membrana mitocondrial aumenta após indução de apoptose, iniciada por EROS, cálcio, Bax e ceramidas (LIU *et al.*, 2013).

As espécies reativas de oxigênio são indispensáveis para as vias de transdução de sinais que regulam a morte celular e o estado redox da célula. Sua produção excessiva pode danificar lipídios, proteínas e DNA. Estresse oxidativo em células tubulares renais tem emergido como a maior causa de dano renal em diferentes condições fisiopatológicas, como falência renal crônica, hipertensão e diabetes (VERZOLA *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2015).

Neste estudo a geração de espécies reativas de oxigênio e peróxido de hidrogênio foi monitorada com DCFH-DA e nossos resultados mostraram que LAAO-*Bl* (50µg/mL) induziu o aumento de espécies reativas de oxigênio nas células MDCK. Ao remover o peróxido do meio, pela adição de catalase, verificamos que aproximadamente 50% do efeito apoptótico foi abolido, sugerindo que o peróxido inicia um importante papel na indução de apoptose em células renais por LAAO-*Bl*.

Como mencionado anteriormente, apoptose induzida por sv-LAAOs é principalmente atribuída à formação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e conseqüentemente ao estresse oxidativo causado pelo aumento do peróxido (SUN *et al.*, 2003; SAMEL *et al.*, 2006; TOYAMA *et al.*, 2006; ZHANG; WEI., 2007; ALVES *et al.*, 2008). Stabeli *et al.*, (2007) também demonstraram inibição dos efeitos tóxicos de LAAO isolada de *Bothrops moojeni* quando os efeitos do peróxido foram bloqueados pela catalase. No entanto, as características morfológicas das células em processo de apoptose induzido por LAAO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno são diferentes. Antioxidante e catalase podem abolir a apoptose induzida por LAAO, mas não inibem a apoptose induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno. Em outras palavras, apoptose induzida por LAAO isolada de venenos de serpentes não é apenas desencadeada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido pela reação enzimática (KANZAWA *et al.*, 2004).

O Ca<sup>2+</sup> é o mais versátil dos mensageiros intracelulares, sabe-se que a homeostase do íon Ca<sup>2+</sup> é de fundamental importância para a regulação das diversas atividades fisiológicas da célula, bem como para a sobrevivência celular. Pesquisas recentes mostram que a sobrecarga celular de Ca<sup>2+</sup>, ou alteração da compartimentalização do Ca<sup>2+</sup> intracelular, pode induzir citotoxicidade ou acionar a morte celular por apoptose ou necrose (PATERGNANI *et al.*, 2015). O aumento da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> ocorre não somente pelo influxo do íon a partir do meio extracelular, mas também pelo esvaziamento de estoques intracelulares, tais como retículo endoplasmático (RE) e mitocôndria (SMAILI *et al.*, 2008). A saída de Ca<sup>2+</sup> do RE se dá principalmente através dos receptores de IP3 (IP3Rs) e dos receptores de rianodina (RyRs), ambos localizados na membrana desta organela (BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003).

Uma vez que verificamos o aumento da concentração citosólica de cálcio na morte celular induzida pelo veneno de *B. leucurus* (De MORAIS *et al.*, 2013) e dada

à participação crucial do cálcio na sinalização da morte celular por necrose e apoptose, nosso próximo objetivo foi estudar o envolvimento do íon cálcio na toxicidade induzida por LAAO-*Bl* nas células MDCK. LAAO-*Bl* (50µg/mL) induziu aumento significativo de Ca<sup>2+</sup> citosólico. O principal estoque de cálcio envolvido foi o do retículo endoplasmático (RE) via receptores de IP3. A função do RE é prejudicada principalmente pelo estresse oxidativo, o qual é a maior causa de liberação de seus estoques de cálcio (CAO *et al.*, 2014). Embora o Ca<sup>2+</sup> participe do efeito de LAAO-*Bl* no dano celular, apoptose induzida por LAAO nas células MDCK não foi revertida quando o Ca<sup>2+</sup> citosólico foi quelado.

As células em processo de apoptose apresentam alterações morfológicas que são resultado final da ativação de enzimas específicas denominadas caspases. Estas enzimas modulam o processo apoptótico e servem como marcadores primários nos ensaios de apoptose antes mesmo que os sinais morfológicos estejam evidentes. As caspases são responsáveis pela clivagem de substratos que contenham resíduos de ácido aspártico, como a enzima poli-ADP-ribose-polimerase, proteínas reguladoras de ciclo celular, proteínas estruturais, como laminina e actina, dentre outras (FERREIRA *et al.*, 2010). Caspases relacionadas a apoptose são classificadas em dois grandes grupos, as caspases iniciadoras, consistindo em caspase 8, 9 e 10 e as efetoras que são as caspases 3, 6 e 7 (WU *et al.*, 2014).

Os resultados deste trabalho mostraram que LAAO-*Bl* desencadeou ativação de caspase 3 e 7 nas células MDCK e HK2, e que o tratamento com LAAO-*Bl* aumentou a expressão da proteína pró apoptótica Bax nas células MDCK. Através destes resultados, concluímos que LAAO-*Bl* induziu morte celular através de caspases mediando apoptose via mitocondrial nas células MDCK. É importante mencionar que em ambas as vias, a ativação da caspase-3 é o ponto crucial e irreversível do fenômeno de morte celular, portanto, neste estágio, mesmo que a atividade da caspase 3 esteja inibida, não há mecanismos que possam reverter a apoptose. Outros trabalhos mostraram que LAAO induziu apoptose através de ativação de caspases (ZHANG ; CUI; 2007; ALVES *et al.*, 2008; ZHANG; WU, 2008; LEE *et al.*, 2014).

O desarranjo mitocondrial pode facilitar a liberação de citocromo c para o citoplasma, onde o mesmo forma complexo com o fator de ativação associado à

apoptose-1 (APAF-1) e caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa, que é capaz de ativar a caspase-3 e provocar a apoptose (WU *et al.*, 2014). Os nossos resultados mostraram que LAAO-*Bl* induziu liberação de citocromo c nas células HK2, evidenciando que neste tipo celular LAAO-*Bl* induz apoptose via mitocondrial.

Nós usamos o modelo de perfusão de rim isolado de rato a fim de estudar o potencial nefrotóxico de LAAO-*Bl* e esclarecer o seu envolvimento nos efeitos renais induzidos pelo veneno de *B. leucurus*. LAAO- *Bl* induziu um aumento na pressão de perfusão e fluxo urinário, sem nenhum efeito na resistência vascular renal. Observamos uma diminuição significativa no ritmo de filtração glomerular e nos transportes tubulares de sódio, potássio e cloreto. A perda da função das células tubulares epiteliais induzida por LAAO-*Bl* pode explicar alguns dos efeitos renais observados neste estudo, como o aumento do fluxo urinário e a redução do transporte de eletrólitos. Usando este mesmo modelo, nós mostramos que o veneno de *Bothrops leucurus* também reduziu o ritmo de filtração glomerular e os transportes tubulares de sódio e potássio, contudo causou diminuição na pressão de perfusão e no fluxo urinário (DE MORAIS *et al.*, 2013)

A excreção de sódio encontra-se aumentada na maioria dos venenos estudados no sistema de perfusão de rim isolado, refletindo uma diminuição na reabsorção tubular de sódio (MARTINS *et al.*, 2005; HAVT *et al.*, 2005., EVANGELISTA *et al.*, 2010). Com relação à diminuição do ritmo de filtração glomerular pode ser devido à diminuição no coeficiente de filtração glomerular o que possivelmente reflete o efeito do veneno/toxina em células mesangiais (SITPRIJA e SITPRIJA, 2012).

Vários componentes proteicos presentes no veneno de serpentes do gênero *Bothrops* contribuem para toxicidade renal. Em estudos de perfusão de rim isolado de rato foi observado que LAAO (BRAGA *et al.*, 2008), lectinas tipo C (HAVT *et al.*, 2005, BRAGA *et al.*, 2006), fosfolipase A2 (PLA2), (BRAGA *et al.*, 2006) miotoxinas (BARBOSA *et al.*, 2005) e enzimas trombina-like (BARBOSA *et al.*, 2006) induziram efeitos nefrotóxicos diretos. LAAO pode causar injúria renal através da geração do peróxido de hidrogênio, o qual pode induzir injúria endotelial, agregação plaquetária e apoptose (NAUMAN *et al.*, 2011; MORAIS *et al.*, 2015).

Através dos resultados obtidos neste estudo, verificamos que LAAO-*Bl* é capaz de causar alterações nos parâmetros fisiológicos renais no modelo de perfusão de rim isolado de rato. Esses efeitos observados no rim isolado podem estar associados com a perda da função das células tubulares, uma vez que demonstramos que LAAO-*Bl* induziu apoptose via estresse oxidativo nas células tubulares renais.

Nossos resultados ajudarão a compreender o mecanismo de nefrotoxicidade desencadeado por LAAO isolada do veneno de *B. leucurus*. Conhecer os eventos moleculares responsáveis pela insuficiência renal aguda causada por ofidismo, poderá contribuir para o conhecimento da patofisiologia renal e ajudar no desenvolvimento de fármacos e estratégias terapêuticas mais efetivas.

***CONCLUSÕES***

## 7. CONCLUSÕES

- ✓ LAAO-*BI* induziu morte celular de maneira concentração dependente nas células tubulares epiteliais renais (MDCK e HK2).
- ✓ LAAO-*BI* induziu morte por necrose e apoptose em ambas as linhagens celulares. Nas células MDCK o tipo de morte predominante foi por apoptose e nas células HK2 por necrose.
- ✓ Nas células MDCK, LAAO-*BI* induziu ativação e aumento de expressão das caspases 3 e 7. Também induziu aumento de expressão da proteína pró apoptótica Bax, confirmando o envolvimento da via intrínseca no efeito apoptótico de LAAO-*BI*.
- ✓ Nas células HK2, LAAO-*BI* também induziu ativação e aumento de expressão da caspase 3 e 7. Verificamos também que LAAO induziu a liberação de citocromo c, evidenciando a ativação da via intrínseca no efeito apoptótico de LAAO-*BI*.
- ✓ LAAO-*BI* aumentou os níveis de cálcio citosólico nas células MDCK. O aumento do cálcio foi correlacionado a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  de estoques sensíveis a tapsigargina e rianodiana, como o retículo endoplasmático.
- ✓ LAAO-*BI* aumentou os níveis de espécies reativas de oxigênio nas células MDCK.
- ✓ Catalase bloqueou a apoptose induzida por LAAO-*BI* nas células MDCK, confirmando a participação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  no efeito apoptótico de LAAO-*BI*.
- ✓ LAAO-*BI* promoveu alterações na fisiologia renal avaliados no sistema de perfusão de rim isolado de rato.

## ***REFERÊNCIAS***

## REFERÊNCIAS

- ACHÊ, D.C. et al. Biochemical properties of a new PI SVMP from *Bothrops pauloensis*: inhibition of cell adhesion and angiogenesis. **Int J Biol Macromol**, v. 72, 445-53, 2015.
- ACOSTA, A.R. et al. Hemostatic properties of Venezuelan *Bothrops* snake venoms with special reference to *Bothrops isabelae* venom. **Toxicon**, v. 56, p. 926-935, 2010.
- ALBUQUERQUE, H. N. de.; COSTA, T. B. G. da.; CAVALCANTE, M. L. F. Estudo dos acidentes ofídicos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* no Estado da Paraíba. **Revista de Biologia e ciências da terra**, v. 5, n.1, 2004.
- ALI, S.A. et al. Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 384, p. 216–226, 2000.
- ALVES, R.M. et al. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 4, p. 542-550, 2008.
- ARAKI, S., MASUDA, S., MAEDA, H., YING, M.J., HAYASHI, H. Involvement of specific integrins in apoptosis induced by vascular apoptosis-inducing protein 1. **Toxicon**, v. 40, p. 535-542, 2002.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M. de.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes peçonhentas. **Medicina**, v. 36, p. 480-489, 2003.
- BALHLMANN, J.; GIEBISCH, G.; OCHWADT, B. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 212, p. 77-82, 1967.
- BARBOSA, P.S. et al. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. **Toxicon**, v. 4, p. 376-386, 2005.
- BELLO, C.A. et al. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 88, p. 189-200, 2006.
- BERNADONI, J. L. et al. Functional variability of snake venom metalloproteinases: adaptive advantages in targeting different prey and implications for human envenomation. **PLoS One**, v.9, n. 10, p. e109651, 2014.
- Bérnils, R. S. e H. C. Costa (org.) 2012. Répteis brasileiros: Lista de espécies. Versão 2012.1. Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acessada em 15/07/15.
- BERRIDGE, M.J., BOOTMAN, M.D., RODERICK, H.L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, p. 517–529, 2003.

BOWMAN, R.H. Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney. **J.Biol. Chem**, v. 245, p. 1604–1612. (1970).

BRAGA M.D et al Purification and renal effects of phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 51, p. 181–190, 2006.

BRAGA, M. D. et al. Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 8, p. 859-867, 2006.

BRAGA, M. D. M. **Avaliação dos efeitos vasculares e renais do veneno da *Bothrops insularis* e de frações isoladas**. 2006. 238 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, 2006.

BRAGA, M.D. et al. Purification and biological effects of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 2, p. 199-207, 2008.

BRASIL. Ministério as Saúde. Portal da Saúde. **Acidentes por animais peçonhentos: serpentes**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/>

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, p. 851-859, 2000.

CALDERON, L. A, et al. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. **Biomed Res Int.**, n. 2014, 2014.

CAMPOS, L. B. et al. In vitro comparison of enzymatic effects among Brazilian *Bothrops* spp. venoms. **Toxicon**, v. 76, p. 1-10, 2013.

CAO, S.S.; KAUFMA, R. J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 3, p. 396-413, 2014.

CARRASCO P.A.; MATTONI, C.I.; LEYNAUD, G.C.; SCROCCHI, G.J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica scripta**, v. 41, n. 6, p. 1-15, 2012.

CASTRO, I.; BURDMANN, E. A.; SEGURO, A. C.; YU, L. *Bothrops* venom induces direct tubular renal injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. **Toxicon**, v. 43, p. 833-839, 2004.

CECILIO, A.B et al. Molecular characterization of Lys49 and Asp49 phospholipases A<sub>2</sub> from snake venom and their antiviral activities against Dengue virus. **Toxins (Basel)**, v.5, p. 1780-98, 2013.

CHABANE, W.; USER, S.D.; EL-GAZZAH, M.; JAKSIK, R.; SAJJADI, E.; RZESZOWSKA-WOLNY, J.; LOS, M.J. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer, **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 61, 43-58, 2013.

CHAN, F.K.; MORIWAK, K.; DE ROSA, M.J. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. **Methods Mol Biol**, v. 979, p. 65-70, 2013.

CHEN, Y.; ZOU, Z.; WU, Z.; ZHAO, Z.; LUO, X.; XIE, C.; LIANG, Y. TNF- $\alpha$ -induced programmed cell death in the pathogenesis of acquired aplastic anemia. **Expert Rev Hematol**, v. 8, p. 516-26, 2015.

CHIEN, C.M., YANG, S.H., YANG, C.C., CHANG, L.S., LIN, S.R. Cardiotoxin III induces c-jun Nterminal kinase-dependent apoptosis in HL-60 human leukaemia cells. **Cell Biochem. Funct**, v. 26, p. 111-118, 2008.

CHUNMEI, G . et al. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 60, p. 302–311, 2012.

CISOTTO, P et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an l-amino acid oxidase isolated from Bothrops jararaca snake venom. **Toxicon**, v. 53, p. 330–341, 2009.

CLEMETSON, K.J.; LU, Q.; CLEMETSON, J.M., Snake C-type lectin-like proteins and platelet receptors, **Pathophysiol. Haemost. Thromb**, v. 34, p. 150–155, 2005.

COHEN, J. J.; KOOK, Y. J.; LITTLE, J. R. Substrate-limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidney: effects of lactate and glucose. **J. Physiol.**, v. 266, n. 1, p. 103–121, 1977.

COLLARES-BUZATO, C.B.; LE SUEUR, L.P.; CRUZ- HOFLING. M.A. Impairment of the Cell-to-Matrix Adhesion and Cytotoxicity Induced by Bothrops moojeni Snake Venom in Cultured Renal Tubular Epithelia. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 181, p. 124–132, 2002.

COMINETTI, M.R., RIBEIRO, J.U., FOX, J.W., SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the Bothrops alternatus snake venom that interacts with  $\alpha 5\beta 1$  integrin. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 416, p. 171-179, 2003.

DE MARCO, A. F, DE CASTRO, P. A.M, OLIVEIRA, M.C, DE LIMA M.E. Venoms, toxins and derivatives from the Brazilian fauna: valuable sources for drug discovery. **Sheng Li Xue Bao**. v. 67, n .3, p. 261-70. 2015.

DE MORAIS, I. C. et al. Bothrops leucurus venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. **Toxicon**, v. 61, p. 38-46, 2013.

DE PAULA, F.F. et al. Molecular characterization of metalloproteases from Bothrops alternatus snake venom. **Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics**. v. 12, p. 74-83, 2014.

DE TONI, L.G et al. Inflammatory mediators involved in the paw edema and hyperalgesia induced by Batroxase, a metalloproteinase isolated from Bothrops atrox snake venom. **Int Immunopharmacol**, v. 28, n.1, p. 199-207, 2015.

DEOLINDO, P., TEIXEIRA-FERREIRA, A.S., DAMATTA, R.A., ALVES, E.W., Lamino acid oxidase activity present in fractions of Bothrops jararaca venom is responsible for the induction of programmed cell death in Trypanosoma cruzi. **Toxicon**, v. 56, p. 944–955, 2010.

DHANANJAYA, B.L.;SIVASHANKARI, P. R. Snake venom derived molecules in tumor angiogenesis and its application in cancer therapy; an overview. **Curr Top Med Chem**, v. 15. n. 7 , p. 649-57, 2015.

DONG, Z.; SAIKUMAR, P.; WEINBERG, J.M.; VENKATACHALAM, M.A. Calcium in cell injury and death. **Annu Rev Pathol Mech Dis**, v. 1, p. 405-434, 2006.

DU, XY e CLEMETSON, KJ. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659-65, 2002.

ENGELAND, M.V.; NIELAND, L.J.W.; RAMAEKERS, F.C.S.; SCHUTTE, B.; REUTELONGSPERGER, C.M. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, p. 1-9, 1998.

EVANGELISTA, I.L. Renal and cardiovascular effects of Bothrops marajoensis venom and phospholipase A2. **Toxicon**, v.55, 1061-70.

FEARNHEAD, H.O. Cell-free systems to study apoptosis. **Methods Cell Biol**, v. 66, p. 167-85, 2001.

FENWICK, A.M.; GUTBERLET, J.R.R.; EVANS, J.A.; PARKINSON,C.L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera Bothrops, Bothriopsis, and Bothrocophias (Serpentes: Viperidae). *Zool J Linn Soc*, v. 156, p. 617-640, 2009.

FERREIRA, B.F. et al. Molecular Cloning and Pharmacological Properties of an Acidic PLA2 from Bothrops pauloensis Snake Venom. **Toxins**, v. 5, p. 2403-2419, 2013.

FERREIRA, C.S. et al. melatonina: modulador de morte celular. **Rev Assoc Med Bras**, v. 56, p. 715-8, 2010.

FERREIRA, R. N. et al. Complete amino-acid sequence, crystallization and preliminary Xray diffraction studies of leucurolysin-a, a nonhaemorrhagic metalloproteinase from Bothrops leucurus snake venom. **Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.**, v. 65, p.798-801, 2009.

FONTELES, M. C.; GANAPATHY, V.; PASHLEY, D. H.; LEIBACH, F. H. Dipeptide metabolism in the isolated perfused rat kidney. **Life Sci**, v. 33, n. 5, p. 431-436, 1983.

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. In: CARDOSO, L. C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clinica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003, cap. 6, p. 72-86.

GABRIEL, L. M. et al. Tumor cytotoxicity of leucurolysin-B, a P-III snake venom metalloproteinase from Bothrops leucurus. **J. Venomous Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v.18, p. 24-33, 2012.

GALLUZZI, L.; BLONGREN, K.; KROEMER, G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, p. 481-9, 2009.

GARCIA-DENEGRI, M. E et al. Neutralisation of the pharmacological activities of *Bothrops alternatus* venom by anti-PLA2 IgGs. **Toxicon**, v. 86, p. 89-95, 2014.

GHAZARYAN, N.A. et al. Phospholipases a2 from Viperidae snakes: Differences in membranotropic activity between enzymatically active toxin and its inactive isoforms. **Biochim Biophys Acta**, v. 1848, p. 463-82, 2015.

GOMES, M. S. R. et al. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 153(C), p. 290-300, 2011.

GOMES, M.S et al. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 153, p. 290-300, 2011.

GREMSKI, L.H.; CHAIM, O.M.; PALUDO, K.S.; SADE, Y.B.; OTUKI, M.F.; RICHARDSON, M.; GREMSKI, W.; SANCHEZ, E.F.; VEIGA, S.S. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. **Toxicon**, v. 50, p. 120-135. 2007.

GUARNIERI M.C.; SOUTO, A. S.; DUARTE, M. T. L. First record of *Bothrops leucurus* (Snakes: Viperidae) in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. **Anais da Reunião Científica Anual do Instituto Butantan**, p. 129-129, 2000.

GUTIÉRREZ, J. M. Current challenges for confronting the public health problem of snakebite envenoming in Central America. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 20, 2014.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T. Snake venom metalloproteinases. Biological roles and participation in the pathology of envenomation In: MACKESSY, S.P. ed. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, p. 115-138, 2009.

HAVT, A. et al. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, p. 130-41, 2005.

HEINRICH, E.L.; WELTY, L.A.Y.; BANNER, R.R.; OPPENHEIMER, S.B.; Direct targeting of cancer cells: A multiparameter approach. **Acta histochemia**, v. 107, p. 335-344, 2005.

HIGUCHI, D.A et al. Leucurogin, a new recombinant disintegrin cloned from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) with potent activity upon platelet aggregation and tumor growth. **Toxicon**, v. 58, p. 123-9, 2011.

HIGUCHI, D.A. et al. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 89, p. 319 - 328, 2007.

HUTTON, R.A., WARRELL, D.A. Action of snake venom components on the haemostatic system. **Blood Reviews**, v.7, p.176-189, 1993.

- JEONG, J.W. Pachymic Acid Induces Apoptosis of EJ Bladder Cancer Cells by DR5 Up-Regulation, ROS Generation, Modulation of Bcl-2 and IAP Family Members. **Phytother Res.** 2015.
- JORGE, R. J. B. et al. Venomics and antivenomics of Bothrops erythromelas from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. **Journal of Proteomics (Print)**, v. 114, p. 93-114, 2014.
- KANZAWA, N. et al. Achacin induces cell death in HeLa cells through two different mechanisms. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 422, 103–109, 2004.
- LEE, M. L. et al. 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**, v. 6, p. 593-60, 2014.
- LEITE, R. S. et al. Epidemiology of snakebite accidents in the municipalities of the state of Paraíba, Brazil. **Cien Saude Colet.** v. 18, n. 5, p. 1463-71, 2013.
- LIMA-DUARTE, M. T. et al. Bothrops leucurus (white-tailed lancehead) Brazil: Pernambuco. **Herpethological Review**, v. 34, n. 2, p. 168-168, 2003.
- LIN, M.; LI, L.; ZHANG, Y.; ZHENG, L.; XU, M.; RONG, R.; ZHU, T. Baicalin ameliorates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced cytotoxicity in HK-2 cells through the inhibition of ER stress and the activation of Nrf2 signaling. **Int J Mol Sci**, v. 7, p. 12507-12522, 2014.
- LIRA-DA-SILVA, M.R.; MISE, Y.F.; BRAZIL, T.K.; CASAIS-E-SILVA, L.L.; CARVALHO, F.M. Morbimortalidade por ofidismo no nordeste do Brasil (1999-2003). **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, p. 21-25, 2009.
- LIRA-DA-SILVA, R.M. Bothrops leucurus wagler, 1824 (serpentes; viperidae): natural history, venom and envenomation. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, p. 56-65, 2009.
- LIU, D.; YANG, J.; LI, Y.; ZHANG, M.; WANG, L. Cd-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in the hepatopancreas of the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. **PLoS One**, v. 22, p. e68770, 2013.
- 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.**, p. 305–310, 2002.
- LUCENA, S. et al. Inhibition of pancreatic tumoral cells by snake venom disintegrins. **Toxicon**, v. 93, 136-43, 2015.
- MAGALHÃES, A. et al. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, p. 565-575. 2007.
- MARANGONI, F.A, PONCE-SOTO, L.A, MARANGONI, S, LANDUCCI, E. C. Unmasking snake venom of *Bothrops leucurus*: purification and pharmacological and structural characterization of new PLA2 Bleu TX-III. **Biomed Res Int**, 2013.

- MARCUSSI, S et al Genotoxic effect of Bothrops snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA. **Toxicon**, v. 65, p. 9-14, 2013.
- MARROTTA, A. M. M.; ALENCAR, M. R. P.; ANDRADE, T. A.; XAGORARIS, M.; RUIVO, G. F. Insuficiência renal aguda após acidente botrópico: um relato de caso. **Rev. Biociência**, v. 12, n. 1-2, p. 88-93, 2006.
- MARTINES MS, MENDES MM, SHIMIZU MH, MELO RODRIGUES V, DE CASTRO I *et al.* Effects of Schizolobium parahyba extract on experimental Bothrops venom-induced acute kidney injury. **PLoS One**, v. 14, n. 9, p. e86828, 2014.
- MARTINEZ-MALDONADO, M.; OPVA-STITZER, R. Free water clearance curves during saline, mannitol, glucose and urea diuresis. **J. Physiol.**, v. 280, p. 487-497, 1978
- MARTINS, A. M. C et al. Action of anti-bothropic factor isolated from Didelphis marsupialis on renal effects of Bothrops erythromelas venom. **Toxicon**, v. 46, p. 595-599, 2005.
- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom protease affecting hemostasis and thrombosis. **Biochem Biophys Acta**, v1477, p146-156, 2000.
- MELGAVAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, Luiz da Costa et al. Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003, cap. 4, p. 33, 468p.
- MELLO, C.P et al. Bothropoides insularis venom cytotoxicity in renal tubular epithelia cells. **Toxicon**, v. 88, p. 107-114, 2014.
- MITRA, K.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ. J. Analysis of mitochondrial dynamics and functions using imaging approaches. **Curr Protoc Cell Biol**, v. 25, p. 1-21, 2010.
- MORA, R., VALVERDE, B., DIAZ, C., LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J.M. A Lys49 phospholipase A2 homologue from Bothrops asper snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. **Toxicon**, v. 45, p. 651-660, 2005.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n.1/2, p. 55-63, 1983.
- MOURA-DA-SILVA, A.M.; BALDO, C. Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from Bothrops jararaca. **Toxicon**, v. 60, p. 280-9, 2012.
- NASCIMENTO, J.M. **Caracterização da dnase da peçonha da serpente bothrops alternatus: comparação com a dnase ácida de mamíferos envolvida em apoptose.** 2008. 198 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia., 2008.
- NASCIMENTO, J.M.; FRANCHI JR, G.C.; NOWILL, A.E.; COLLARES-BUZATO, C.B.; HYSOP, S. Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by Bothrops alternatus snake venom in cultured Madin–Darby canine kidney cells. **Biochem. Cell Biol**, v. 85, p. 591–605 , 2007.

- NAUMANN, G. B. et al. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an lamino acid oxidase from Bothrops leucurus venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1810, p. 683-694, 2011.
- NUNES, D. C. O. et al. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A2 from Bothrops leucurus snake venom, **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 154, p. 226-233, 2011.
- NUNES, E. S. et al. Cytotoxic effect and apoptosis induction by Bothrops leucurus venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**, v. 59, p. 667-671, 2012b.
- NUNES, E. S. et al. Inactivation and fragmentation of lectin from Bothrops leucurus venom by gamma irradiation. **Rad. Phys. Chem.**, v. 8, p. 484-487, 2012a.
- OGUIURA, N. et al. An alternative micromethod to access the procoagulant activity of Bothrops jararaca venom and the efficacy of antivenom. **Toxicon**, v 90, p. 148-54, 2014.
- OLIVEIRA, F.N.; BRITO, M.T.; MORAIS, I.C.O.; FOOK, S.M.L.; ALBUQUERQUE, H.N. Accidents caused by Bothrops and Bothropoides in the State of Paraiba: epidemiological and clinical aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, 2010.
- ORRENIUS, S., GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 460, p. 72-81, 2015.
- PATERGNANI, S. et al. The endoplasmic reticulum mitochondrial calcium cross talk is downregulated in malignant pleural mesothelioma cells and plays a critical role in apoptosis inhibition. **Oncotarget**, 2015.
- PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24–9, 2001.
- PORTO, M., TEIXEIRA, D.M. Bothrops leucurus (White-tailed lancehead). **Herpetological Review**, v.26, p.156, 1995.
- RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A; JEYASEELAN, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflamation. **Toxicon**, v. 44, p. 1-17, 2004.
- RANA, A.; SATHIANARA, P.; LIEBERTHAL, W. Role of apoptosis on renal tubular cells in acute renal failure: Therapeutic implications. **Apoptosis**, v. 6, p. 83-102, 2001.
- ROMITI, N. et al. P-Glycoprotein inhibitory activity of lipophilic constituents of Echinacea pallida roots in a human proximal tubular cell line. **Planta Med**, v. 74, p. 264-6, 2008
- ROSS, B. D. The isolated perfused rat kidney. **Clin. Sci. Mol. Med. Suppl.**, v. 55, n. 6, p. 513-521, 1978.

SAKAMAKI, K.; IMAI, K2.; TOMII, K2.; MILLER, D.J. Evolutionary analyses of caspase-8 and its paralogs: Deep origins of the apoptotic signaling pathways. **Bioessays**, v. 37, p. 767-76, 2015.

SAMEL, M.; VIJA, H.; RONNHOLM, G.; SIIGUR, J.; KALKKINER, N.; SIIGUR, E. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. **Biochim Biophys Acta**, v. 4, p. 707-714, 2006.

SANCHEZ, E.F.; FREITAS, T.V.; FERREIRA-ALVES, D.L.; VELARDE, D.T.; DINIZ, M.R.; CORDEIRO, M.N.; AGOSTINI-COTTA, G.; DINIZ, C.R. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**, v. 30, p. 95–103, 1992.

SANCHEZ, E.F.M. et al. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 468, p. 193-204, 2007.

SARTIM, M. A. Moojenactivase, a novel pro-coagulant PIIId metalloprotease isolated from *Bothrops moojeni* snake venom, activates coagulation factors II and X and induces tissue factor up-regulation in leukocytes. **Arch Toxicol**, 2015.

SATURNINO- OLIVEIRA, J et al. Abarema cochliacarpus extract decreases the inflammatory process and skeletal muscle injury induced by *Bothrops leucurus* venom. **Biomed Res Int.**, v. 2014, p. 820761, 2014.

SHAKHMAN, O. et al. Induction by beta-bungarotoxin of apoptosis in cultured hippocampal neurons is mediated by Ca<sup>2+</sup>-dependent formation of reactive oxygen species. **J. Neurochem**, v. 87, p. 598–608, 2003.

SILVA, E. F. et al. Biochemical properties of an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca). **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 148, S105, 2007.

SINAN, Sistema de informações de agravos de notificação. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em 20 de julho de 2015.

SITPRIJA, V.; SITPRIJA, S. Renal effects and injury induced by animal toxins. **Toxicon**, v. 5, p. 943-953, 2012.

SMAILI, S.S et al. Calcium and cell death signaling in neurodegeneration and aging. **Ann Acad Brás Cienc**, v. 81, 2008.

SMAILI, S.S.; CARVALHO, A.C.P.; ROSENSTOCK, T.R.; SHARPE, J.C.; YOULE, R.J. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 183-190, 2003.

SOUSA, L.F. et al., Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of bothrops complex. **PLoS Negl Trop Di**, v. 7, n. 9, p. e2442, 2013.

STABELI, R. G, et al. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. **Int. J. Biol. Macromol**, v. 41, p. 132–140, 2007.

STUQUI, B, et al. Ac2-26 Mimetic Peptide of Annexin A1 Inhibits Local and Systemic Inflammatory Processes Induced by *Bothrops moojeni* Venom and the Lys-49 Phospholipase A2 in a Rat Model. **PLoS One.**, v. 10, n. 7, p. e0130803, 2015.

SUN, L.K et al. Apoptotic effect in the glioma cells induced by specific protein extracted from Okinawa Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom in relation to oxidative stress. **Toxicol. In Vitro**, v. 2, p. 169–177, 2003.

SUN, M.Z.; GUO, C.; TIAN, Y.; CHEN, D.; GREENAWAY F.T.; LUI, S Biochemical, functional and structural characterization of Akbu-LAAO: a novel snake venom L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Biochimie**, v. 92, p. 343–349, 2010.

TAN NH, FUNG SY (2009) Snake venom L-amino acid oxidase. In: Mackessy, S. (Ed.), *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. pp. 219-232.

TONELLO, F. et al. A Lys49-PLA2 myotoxin of *Bothrops asper* triggers a rapid death of macrophages that involves autocrine purinergic receptor signaling. **Cell Death Dis**, v. 3, e343, 2012.

TOR, Y.S et al. Induction of Apoptosis in MCF-7 Cells via Oxidative Stress Generation, Mitochondria-Dependent and Caspase-Independent Pathway by Ethyl Acetate Extract of *Dillenia suffruticosa* and Its Chemical Profile. **PLoS One**, v. 10, p. e0127441, 2015.

TORRES, A.F.C. et al. Dantas RT, Menezes RRPPB, Toyama MH, Filho ED, Oliveira MF, Nogueira NAP, Oliveira MR, Monteiro HSA, Martins AMC Antimicrobial activity of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops leucurus* snake venom. **J. Venom. Anim. Toxins incl.** v.16, p. 614-622, 2010.

TORREZ, P.P, SAID, R, QUIROGA M.M, DUARTE, M.R, FRANÇA, F.O. Forest pit viper (*Bothriopsis bilineata bilineata*) bite in the Brazilian Amazon with acute kidney injury and persistent thrombocytopenia. **Toxicon**, v.85, p. 27-30, 2014.

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

TOYAMA, M. H. et al. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 47, p. 47–57, 2006.

ULLOA, J. et al. Nova Ocorrência da serpente *Bothrops leucurus* (SERPENTES; VIPERIDAE) na região de Caatinga de Poções e Brumado do estado da Bahia, Brasil. CD Room do I Congresso Brasileiro de Herpetologia. Curitiba, 2004.

VERZOLA, D.; RATTO, E.; VILLAGGIO, B.; PARODI, E.L.; PONTREMOLI, R.; GARIBOTTO, G.; VIAZZI, F. Uric acid promotes apoptosis in human proximal tubule

cells by oxidative stress and the activation of NADPH oxidase NOX 4. **PLoS One**, v. 9, p. e115210, 2014.

WEI, J.F., YANG, H.W., WEI, X.L., QIAO, L.Y., WANG, W.Y., HE, S.H. Purification, characterization and biological activities of the L-amino acid oxidase from Bungarus fasciatus snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 262– 271, 2009.

WHO (2009) Neglected tropical diseases: snakebite. [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/snakebites/en/index.html](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/index.html). Acesso em 31 de julho de 2015.

WU, H. et al. Caspases: a molecular switch node in the crosstalk between autophagy and apoptosis. **Int J Biol Sci**, v. 10, p. 1072-83, 2014.

WÜSTER, W.; SALOMAO, M.G.; THORPE, R.S.; PUORTO, G.; FURTADO, M.F.D., HOGE, S.A, Systematics of the Bothrops atrox complex: new insights from multivariate analysis and mitochondrial DNA sequence information. In: Thorpe, R.S., W. Wüster & A. Malhotra (eds.), **Venomous Snakes. Ecology, Evolution and Snakebite, Symp. zool. Soc. Lond**, p 99-113. 1997.

YAMASHITA, K, M. et al. Bothrops jararaca Venom Metalloproteinases Are Essential for Coagulopathy and Increase Plasma Tissue Factor Levels during Envenomation. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, v. 65, p. 798-801, 2015.

YANG, P.Y.; HU, D.N.; LIN, I. C.; LIU, F.S. Butein Shows Cytotoxic Effects and Induces Apoptosis in Human Ovarian Cancer Cells. **Am J Chin Med**, v. 28, p. 1-14, 2015.

ZAQUEO, K.D et al. Isolation and biochemical characterization of a new thrombin-like serine protease from Bothrops pirajai snake venom. **Biomed Res Int**, v. 2014, 2014.

ZHANG, L., CUI, L., A cytotoxin isolated from Agkistrodon acutus snake venom induces apoptosis via Fas pathway in A549 cells. **Toxicol. In Vitro**, v. 21, p. 1095– 1103, 2007.

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

ZHANG, L.; WU, W. T. Isolation and characterization of ACTX-6: a cytotoxic L-amino acid oxidase from Agkistrodon acutus snake venom. **Nat. Prod. Res**, V. 22, p. 554– 563, 2008.

ZHAO, Q., ARAKI, S., ZHANG, S., MIAO, J. Rattlesnake venom induces apoptosis by stimulating PC-PLC and upregulating the expression of integrin 4, p53 in vascular endothelial cells. **Toxicon**, v. 44, p. 161-168, 2004.

ZHU, X. et al. Upconversion nanoparticle-mediated photodynamic therapy induces THP-1 macrophage apoptosis via ROS bursts and activation of the mitochondrial caspase pathway. **Int J Nanomedicine**, v. 10, p. 3719-36, 2015.