



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CLARISSA PERDIGÃO MELLO

**ESTUDO *IN VITRO* DA NEFROTOXICIDADE DO VENENO TOTAL E
FRAÇÃO FOSFOLIPASE A₂ DA SERPENTE *Bothropoides insularis*
(AMARAL, 1921).**

Fortaleza

2011

CLARISSA PERDIGÃO MELLO

**ESTUDO *IN VITRO* DA NEFROTOXICIDADE DO VENENO TOTAL E
FRAÇÃO FOSFOLIPASE A₂ DA SERPENTE *Bothropoides insularis*
(AMARAL, 1921).**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Farmácia

Orientadora: Prof^ª. Dra. Alice Maria Costa Martins

Fortaleza
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- M477e Mello, Clarissa Perdigão
Estudo in vitro da nefrotoxicidade do veneno total e fração fosfolipase A₂ da serpente *Bothropoides insularis* (AMARAL, 1921)/ Clarissa Perdigão Mello. – 2011.
100 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2011.
Orientação: Profª. Dra. Alice Maria Costa Martins
1. Morte Celular 2. Rim 3. Bothrops I. Título.

CDD 615.942

CLARISSA PERDIGÃO MELLO

**ESTUDO *IN VITRO* DA NEFROTOXICIDADE DO VENENO TOTAL E
FRAÇÃO FOSFOLIPASE A₂ DA SERPENTE *Bothropoides insularis*
(AMARAL, 1921).**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Janáina Serra Azul Monteiro Evangelista
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Prof.^a. Dr.^a. Romélia Pinheiro Gonçalves
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dra. Alice Maria Costa Martins (orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Dedico essa dissertação a Deus, que sempre me dá força e coragem para trilhar os caminhos em busca dos meus objetivos. E ao meu pai, que mesmo com a ausência física, está presente todos os dias em meus pensamentos e no meu coração, sendo uma constante inspiração nas minhas realizações.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente em minha vida, nos momentos difíceis, dando força e coragem para superar os obstáculos. E nos momentos de alegria, me mostrando o quanto sou abençoada por ele e por sua mãe Maria.

Ao meu pai, Jorge, por todos os ensinamentos, amor e carinho dedicados em vida.

À minha mãe, Liana, minha melhor amiga, pelo amor incondicional, apoio, educação, exemplo, confiança e incentivo durante minha vida. Sem ela com certeza eu não teria chegado até aqui!

Ao meu marido, Daniel, por ser um companheiro extremamente dedicado, atencioso e paciente, que torce e se orgulha pelo meu sucesso acima de tudo.

Aos meus sogros, Marcondes e Tânia, pelo constante incentivo e por compreenderem muitas vezes minha ausência.

À minha cunhada, Camila, por me apoiar e me ajudar todas as vezes que precisei e pelos 20 anos de uma amizade tão verdadeira.

À família PERDIGÃO, meus tios e primos, por toda a alegria e apoio que trazem a minha vida, sendo fundamentais para a realização dos meus sonhos. Muito obrigada por sempre acreditarem e torcerem por mim!

À professora Dra. Alice Costa Martins, pela oportunidade, confiança, paciência, dedicação, apoio e pelos valiosos ensinamentos.

À professora Dra. Goretti Queiroz, pela ajuda sempre que precisei e por ter me apresentado a minha orientadora.

Aos amigos Alba Torres e Ramon Róseo, por todo o incentivo, confiança, pelas orientações quando me senti sem rumo, e acima de tudo pela paciência e ajuda na realização desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Cultivo Celular (LCC): Ticiano Praciano, Alba Fabíola, Isabel Oliveira, Rodrigo Tavares, Ramon Róseo, Patrícia Magalhães, Dânya Bandeira, Kamila Soares, Thiala Josino, Gdaylon Cavalcante, Marcus Felipe, Louise Donadello e Jáder Canuto, pela ajuda nos experimentos, pelos ensinamentos, e a acima pela amizade construída ao longo desses dois anos.

A todos os meus amigos pessoais, especialmente a Isabel Cristina Bandeira, Aline Parente, Lucilla Maia e Mariana Cavalcante, pelo apoio constante e por trazerem tanta alegria a minha vida.

Às minhas amigas e companheiras de mestrado Mariana Brito Larissa Queiroz e Vanessa Vieira, muito obrigada pela amizade, carinho, apoio, confiança, cumplicidade, pelos encontros e risadas.

Aos amigos Jamile Magalhães, Daniel Freire e Thamires Fontenele, por toda a ajuda e apoio em todos os momentos que precisei.

Ao Gustavo José da Silva Pereira, muito obrigada pela ajuda na realização dos experimentos em São Paulo.

Ao professor Dr. Marcos Toyama, por gentilmente cedeu as substâncias de trabalho.

Ao Dr. Alex Havt, pela ajuda na realização dos experimentos de biologia molecular.

À Josiane Kutz, pela ajuda na realização dos experimentos de citometria de fluxo.

Aos professores Carlos Couto e Nádia Accioly pela disponibilidade e ajuda na obtenção do reagente RPE necessários para a realização da Biologia molecular.

À Banca examinadora, pelo aceite ao convite.

A todos os professores e funcionários que, juntos, compõem o curso de pós graduação em Ciências Farmacêuticas da UFC, obrigado pela dedicação e ensinamentos.

A todos meus sinceros agradecimentos

“Não esperar”

E assim, depois de muito esperar, num dia como outro qualquer, decidi triunfar...

Decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesmo buscá-las.

Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar uma solução.

Decidi ver cada deserto como uma possibilidade de encontrar um oásis.

Decidi ver cada noite como um mistério a resolver.

Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz.

Naquele dia descobri que meu único rival não era mais que minhas próprias limitações e que enfrentá-las era a única e melhor forma de as superar.

Naquele dia, descobri que eu não era o melhor e que talvez eu nunca tenha sido.

Deixei de me importar com quem ganha ou perde, agora, importa-me simplesmente saber melhor o que fazer.

Aprendi que o difícil não é chegar lá em cima, e sim deixar de subir.

Aprendi que o melhor triunfo que posso ter, é ter o direito de chamar a alguém de ‘Amigo’.

Descobri que o amor é mais que um simples estado de enamoramento, ‘o amor é uma filosofia de vida’.

Naquele dia, deixei de ser um reflexo dos meus escassos triunfos passados e passei a ser a minha própria tênue luz deste presente.

Aprendi que de nada serve ser luz se não vai iluminar o caminho dos demais.

Naquele dia, decidi trocar tantas coisas...

Naquele dia, aprendi que os sonhos são somente para fazer-se realidade.

E desde aquele dia já não durmo para descansar...

Agora simplesmente durmo para sonhar.

(Walter Elias Disney)

RESUMO

Os produtos naturais e seus derivados têm sido as fontes mais comuns na obtenção de agentes terapêuticos inovadores, além de fornecerem ferramentas para estudos fisiopatológicos e farmacológicos. Os venenos de serpentes exibem uma infinidade de atividades farmacológicas, por serem formados por uma mistura complexa de substâncias ativas, principalmente peptídeos e proteínas, capazes de interferir com muitos processos fisiológicos. As serpentes *Bothrops* e *Bothropoides* são responsáveis por 70% dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil. A serpente *Bothropoides insularis* (jarara ilhoa), é uma espécie endêmica nativa da ilha de Queimada Grande na costa Sul do Estado de São Paulo, seu veneno apresenta características semelhantes aos das outras serpentes do gênero *Bothrops*, como atividade coagulante, hemorrágica, fibrinolítica e insuficiência renal *in vivo*. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do veneno total da *Bothropoides insularis* e sua fração fosfolipase A₂ em culturas de células tubulares renais do tipo MDCK (Madin-Darby canine kidney). Células MDCK foram cultivadas em garrafas plásticas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, com meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal a 10%. O tratamento com veneno total da *B.insularis* causou diminuição da viabilidade celular em todas as concentrações (200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL) estudadas com um IC₅₀ de 9 µg /mL. A integridade da membrana celular foi avaliada pelo método de determinação da enzima lactato desidrogenase, e após a exposição das células ao veneno houve um aumento significativo da enzima. Nos ensaios de citometria de fluxo com anexina V-FITC e iodeto de propídio foi observada a morte celular nas menores concentrações (18 e 36 µg/mL) estudadas com o veneno total e ocorreu predominantemente por apoptose. No entanto na maior concentração (72µg/mL) estudada, foi observado além da morte por apoptose, um aumento de células em apoptose tardia. Nos ensaios com rodamina 123, o tratamento com o veneno total da *B.insularis* (36 µg/ mL) levou a despolarização significativa do potencial de membrana mitocondrial. Não houve expressão significativa de genes envolvidos na morte celular por apoptose. Ensaios de viabilidade celular e integridade de membrana foram realizados com a fração fosfolipase A₂ do veneno da *B.insularis*, em várias concentrações (200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL), não apresentando resultados significativos em nenhum dos experimentos. Esses resultados demonstram a citotoxicidade do veneno de *B. insularis* em culturas de células tubulares renais (MDCK), e sugerem morte celular predominantemente por apoptose.

Palavras- chave: Morte Celular, Rim, *Bothrops insularis*.

ABSTRACT

Natural products and their derivatives are currently the most important source of novel therapeutic agents and provide useful tools for studies in physiopathology and pharmacology. Snake venoms display a wide array of pharmacological properties due to their complex combinations of active substances, especially peptides and proteins, capable of interfering with physiological processes. Snakes of the genera *Bothrops* and *Bothropoides* accounted for 70% of snake bites reported in Brazil. The *Bothropoides insularis* (golden lancehead) is endemic to Queimada Grande, an island off the state of São Paulo. Like the venom of other *Bothrops* species, the venom of *B. insularis* has coagulant, hemorrhagic and fibrinolytic properties and is known to cause kidney failure *in vivo*. The objective of the study was to evaluate of whole venom of *B. insularis* and its phospholipase A2 fraction in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell culture tubes. The cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum in plastic vials with an atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. Treatment with whole venom reduced cell viability at all the concentrations tested (200, 100, 50, 25, 12.5 and 6.25 µg/mL) and yielded an IC₅₀ of 9 µg/mL. Cell membrane integrity during the process of cell death from whole venom was evaluated by LDH enzyme assay, indicating enzyme release at all concentrations. Flow cytometry with Annexin V-FITC and propidium iodide revealed that cell death at the lowest concentrations (18 and 36 µg/mL) of whole venom occurred predominantly by apoptosis. However, at the highest concentration (72 µg/mL), in addition to death by apoptosis, an increased number of cells in late apoptosis was observed. In the Rhodamine 123 assay the treatment with whole venom (36 µg/mL) induced significant depolarization of the mitochondrial membrane potential. The expression of genes involved in cell death by apoptosis did not show any significant results, when tested with whole venom in 24h. The phospholipase A2 fraction was also submitted to cell viability and membrane integrity assays at several concentrations (200, 100, 50, 25, 12.5 and 6.25 µg/mL), with no significant results in any of the experiments. Taken together, our results indicate that the venom of *B. insularis* is cytotoxic in MDCK cell culture and that cell death occurs predominantly by apoptosis.

Key words: Cell Death, Kidney, *Bothropoides insularis*.

LISTA DE FIGURAS

1	Animais que possuem toxinas de valor biológico.	17
2	Exemplos de Serpentes da fauna brasileira pertencentes a diferentes gêneros.	20
3	Exemplos de Serpentes do gênero <i>Bothrops</i> e <i>Bothropoides</i>	21
4	<i>Bothropoides insularis</i> com sua coloração amarelo claro e no seu habitat arborícola.	22
5	Localização da Ilha de Queimada Grande - São Paulo.	23
6	Porcentagens de produtos tóxicos estudados em uma análise transcriptômica do veneno da <i>bothropoides insularis</i> .	26
7	Estrutura tridimensional de vPLA ₂ s pertencentes aos grupos I (notexina: <i>Notechis scutatus</i> , cataliticamente ativa, grupo IA), II (K-49 miotoxina II: <i>Bothrops godmani</i>) e III.	28
8	Patogênese da nefropatia induzida pelo veneno botrópico	31
9	Alterações de morte celular por apoptose e necrose.	33
10	Via extrínseca da apoptose.	34
11	Via intrínseca da apoptose; 2-Formação do apoptossomo.	35
12	Esquema simplificado do cultivo de células tubulares renais MDCK.	42
13	Ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT .	44
14	Ensaio de integridade de membrana pelo método da detecção da enzima Lactato desidrogenase.	46
15	Ensaio de detecção da externalização de fosfatidilserina por citometria de fluxo, utilizando anexina V marcada com FITC e iodeto de propídio (PI).	48
16	Ensaio de detecção do potencial transmembrânico por citometria de fluxo, utilizando anexina V marcada com FITC e iodeto de propídio (PI).	50
17	Efeito citotóxico do veneno total da serpente <i>Bothropoides insularis</i> (200; 100; 50; 25;	54

- 12,5 e 6,25 µg/mL) sobre células MDCK, pelo método do MTT.
- 18** Fotomicrografia das células tubulares renais MDCK em microscópio invertido, após exposição com diferentes concentrações (1/2 IC₅₀; IC₅₀; 2x IC₅₀; 4x IC₅₀; 8x IC₅₀) do veneno total da *B.insularis*, com visíveis alterações morfológicas, tais como agregados celulares e citoplasma granuloso. **55**
- 19** Porcentagem de liberação da enzima Lactato Desidrogenase de células MDCK induzida pelo veneno total da serpente *Bothropoides insularis* (200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL). **57**
- 20** Avaliação do potencial apoptótico do veneno da serpente *Bothropoides insularis* sobre células MDCK. Representação da marcação simultânea de Anexina V- FITC e iodeto de propídio. Quadrante inferior esquerdo: células viáveis (não- marcadas); quadrante inferior direito: células marcadas com Anexina V; quadrante superior esquerdo: células marcadas apenas com PI; quadrante superior direito: células marcadas duplamente com PI e Anexina V-FITC. Controle positivo foi tratado com ciclofosfamida 200µg/mL. **59**
- 21** A) Porcentagem de marcação das células MDCK com Iodeto de propídio. B) Porcentagem de marcação de células marcadas com Anexina V-FITC. C) Porcentagem de células marcadas com Anexina V-FITC + PI. Os dados foram expressos como média + E.P.M. (n=5) e analisado por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student, *p < 0,05. **60**
- 22** Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial em células MDCK tratadas com veneno da serpente *Bothropoides insularis*. À esquerda: Características de tamanho (FSC) e de complexidade interna ou granulosidade (SSC) dos diferentes grupos experimentais; à direita: Representação da emissão de fluorescência dos diferentes grupos experimentais. A) Grupo controle negativo (células tratadas com PBS). B) Grupo tratado com 36 µg/mL de veneno de *Bothropoides insularis*. C) Grupo controle positivo, tratado com doxorubicina (3,12 µg/mL). A análise estatística dos dados qualitativos é feita segundo modelo estatístico de Kolmogorov-Smirnov **62**
- 23** Efeito do veneno total da serpente *Bothropoides insularis* sobre a expressão relativa da caspase - 3 em células MDCK em 24 horas. O grupo controle positivo foi tratado com doxorubicina (3,12 µg/mL). **63**
- 24** Efeito do veneno total da serpente *Bothropoides insularis* sobre a expressão relativa da caspase - 8 em células MDCK em 24 horas. O grupo controle positivo foi tratado com doxorubicina (3,12 µg/mL). **64**

LISTA DE TABELAS

1. Exemplos medicamentos desenvolvidos a partir de venenos animais 18
2. Efeito do veneno total (BiVT) e fração fosfolipase A₂ (BiPLA₂) da serpente *Bothropoides insularis* sobre a viabilidade de células tubulares renais MDCK em diferentes concentrações. Valores expressos em média ± Erro padrão médio. 56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Aspectos gerais sobre efeitos biológicos de venenos animais	15
1.2	Serpentes da fauna Brasileira	19
1.3	<i>Gênero Bothros</i>	20
1.3.1	<i>Bothropoides insularis</i>	21
1.4	Composição dos venenos botrópicos	23
1.4.1	Fosfolipase A ₂	27
1.5	Complicações dos acidentes botrópicos	28
1.5.1	Insuficiência Renal Aguda (IRA)	29
1.6	Alterações celulares envolvidas na Insuficiência Renal Aguda	31
2	JUSTIFICATIVA	36
3	OBJETIVO	38
3.1	Objetivo Geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	Veneno e fração fosfolopase A₂	41
4.2	Linhagem celular	41
4.3	Cultivo e manutenção das células MDCK	41
4.4	Estudo do efeito do veneno e fração fosfolipase A₂ da <i>Bothropoides insularis</i> sobre células renais	43
4.4.1	Ensaio de viabilidade celular	43
4.4.1.1	Ensaio de redução do MTT	43
4.4.1.1.1	Protocolo experimental	43
4.4.1.1.2	Análise estatística	44
4.4.1.1.3	Estudo das alterações morfológicas em células MDCK	44
4.4.1.2	Ensaio de liberação de Lactato desidrogenase	45
4.4.1.2.1	Protocolo experimental	45

4.4.1.2.2	Análise estatística	46
4.5	Avaliação do tipo de morte celular	46
4.5.1.	Detecção da externalização de fosfatidilserina e da perda de permeabilidade de membrana	47
4.5.1.1	Protocolo experimental	48
4.5.1.2	Análise estatística	48
4.5.2	Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial	49
4.5.2.1	Protocolo experimental	49
4.5.2.2	Análise estatística	50
4.6	Ensaio para avaliação da expressão gênica	50
4.6.1	Reação de transcriptase reversa	50
4.6.2.	Reação de polimerase de cadeia de tempo real (qPCR)	50
4.6.3	Protocolo experimental	51
4.6.4	Análise estatística	52
5	RESULTADOS	53
5.1	Ensaio de viabilidade celular	54
5.1.1	Ensaio de redução do MTT	54
5.1.2	Ensaio de liberação de Lactato desidrogenase	56
5.2	Avaliação do tipo de morte celular	57
5.2.1	Detecção da externalização de fosfatidilserina e da perda de permeabilidade de membrana	58
5.2.2	Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial	61
5.3	Avaliação da expressão gênica	63
6	DISCUSSÃO	65
7	CONCLUSÃO	76
8	REFERÊNCIAS	77



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais sobre efeitos biológicos de venenos animais

Os produtos naturais e seus derivados têm sido as fontes mais comuns na obtenção de agentes terapêuticos inovadores (KIRKPATRICK, 2002), além de fornecerem ferramentas para estudos fisiopatológicos e farmacológicos (CLARDY; WALSH, 2004). Pode-se dizer que a utilização de produtos naturais com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (JÚNIOR *et.al.*, 2005).

A pesquisa por novos fármacos cresceu bastante nos últimos anos, principalmente a partir de substâncias bioativas derivadas de plantas, fungos, organismos marinhos, moluscos e animais. As toxinas naturais extraídas desses organismos são responsáveis direta ou indiretamente no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e também têm contribuído muito na compreensão de mecanismos fisiológicos de doenças (KAPOOR , 2010). As toxinas podem ser classificadas com base na sua natureza química (proteínas, glicoproteínas, peptídeos, alcalóides, poliaminas, aminas biogênicas e outros), nos seus efeitos farmacológicos ou biológicos (neurotoxinas, miotoxinas, peptídeos vasoativos, hemolíticos, citolíticos, necróticos, hemorrágicos, antiinflamatórios, antitumorais, analgésicos, antimicrobiana e outros), nos seus efeitos a nível molecular (ligantes de canal iônico, agonistas ou antagonistas de receptores ionotrópicos ou metabotrópicos, enzimas, inibidores enzimáticos), dentre outras classificações (PIMENTA; LIMA, 2005).

O estudo do potencial terapêutico dessas toxinas vem conquistando espaço e despertando grandes interesses da comunidade científica, devido aos seus efeitos biológicos. Elas têm sido utilizadas como ferramenta para elucidar mecanismos fisiopatológicos, desde que Claude Barnard, em 1850 ,verificou que o veneno utilizado nas pontas das flechas por índios continha tubocurarinas, conhecidas durante muito tempo, como um alcalóide letal, sendo o primeiro relaxante muscular, introduzido na prática anestésica (Atracurium® - Wellcome). Desde então vários laboratórios farmacêuticos e comunidades científicas têm se utilizado de toxinas naturais como modelos moleculares para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (HARVEY , 2000; MORTARI *et al.*, 2007 ;PALMA *et al.*, 2007).

Recentemente, foi identificado na saliva do réptil monstro de gila, (*Heloderma suspectum*) uma espécie venenosa da América do Norte, um peptídeo, Extendin-4, sintetizado em laboratório, dando origem ao princípio ativo Exenatide, que em 2005 recebeu a licença para

ser comercializado (Byetta®, Lilly, Indiana, USA) no tratamento do diabetes mellitus tipo 2 (KAPOOR, 2010).

Da secreção cutânea da (*Phyllomedusa hypocondrialis*), uma perereca, encontrada no Nordeste e Sudeste brasileiro, foram extraídos peptídeos antimicrobianos (PS-7 e DH-1) capazes de inibir o crescimento de diversas bactérias (CONCEIÇÃO *et al.*, 2006) e também um peptídeo potenciador de bradicinina (Phypo Xa) com significativa ação hipotensora (CONCEIÇÃO *et al.*, 2007).

Previamente, foi demonstrado que o escorpião amarelo, (*Tityus serrulatus*), comum nas grandes cidades, apresenta, em seu veneno peptídeos com ação hipotensora, denominadas hipotensinas, os quais também exercem efeito por meio da potencialização da ação da bradicinina (VERANO-BRAGA *et al.*, 2008).

O carrapato estrela, (*Amblyomma cajennense*), encontrado em diversas regiões do Brasil, possui, em sua saliva, substâncias anticoagulantes (BATISTA *et al.*, 2008) e proteínas, que conseguem matar células tumorais *in vitro* (GIRARDI, 2007).

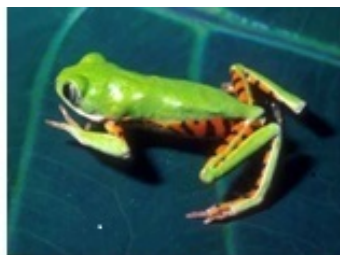
Em Estudos prévios com o veneno da taturana, (*Lonomia obliqua*), encontrada na região Sudeste do Brasil, foi isolado do extrato de suas cerdas, uma protease ativadora de protrombina (Lopap), capaz de provocar formação de trombos e depleção de fibrinogênio (REIS *et al.*, 2001; FRITZEN *et al.*, 2005). Outros estudos também mostraram que o Lopap interage com alguns receptores de células endoteliais, aumentando a expressão superficial de moléculas de adesão (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.*, 2001). Além disso, o Lopap também modula moléculas envolvidas na regulação do tônus vascular e inibidores da ação plaquetária, como óxido nítrico (NO) e prostaglandina I₂ (PGI₂) (REIS *et al.*, 2001).

Venenos ofídicos são uma fonte abundante de anticoagulantes e trombolíticos, que incluem desintegrinas, inibidores diretos da trombina, compostos fibrinolíticos e ativadores de plasminogênio. Integrilin®, cujo princípio ativo é o eptifibatide, foi obtido a partir do veneno da cascavel Pigmeu (*Sistrurus miliaris barbouri*), uma desintegrina que inibe agregação plaquetária por ligação com alta afinidade ao receptor fibrinogênio (integrina α IIb β 3) por meio de um reconhecimento da seqüência Lys-Gly-Asp, a qual foi aprovada, em 1998, por Food and Drug Administration (FDA), para uso como anticoagulante em pacientes com síndrome coronariana aguda e para os pacientes submetidos à angioplastia. Várias outras drogas anticoagulantes também foram obtidas por meio do veneno de serpentes, como Salmosin (*Agkistrodon halys brevacaudus*), Crotavirin (*Crotalus viridis*), Drenoaspin (*Dendroaspis jamesoni kaimose*), dentre outros (BEETON; GUTMAN; CHANDY, 2006).

Do veneno da serpente *Bothrops jararaca* foi isolado o peptídeo potencializador de bradicinina, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) que origina angiotensina II, um hormônio que causa vasoconstrição e aumento da pressão arterial. Este peptídeo inibidor liga-se ao sítio ativo da ECA da mesma forma que os substratos naturais, reduzindo, assim, a pressão arterial. O captopril, que é amplamente utilizado para tratar a hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva, foi desenvolvido após estudos de modelagem molecular a partir deste peptídeo isolado (FERREIRA, 1965; CUSHMAN; ONDETTI, 1999). Algumas toxinas de serpentes têm efeitos antinociceptivo. Previamente, foi demonstrado que a crotamina, isolada do veneno da *Crotalus durissus terrificus*, produz efeito analgésico em pequenas doses, sem qualquer aparente toxicidade in vivo. Seu efeito analgésico é cerca de 30 vezes mais potente do que o da morfina (RAJENDRA; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2004).



Escorpião amarelo
Tityus serrulatus



Phyllomedusa hypocondrialis



Crotalus durissus terrificus



Carrapato estrela
Amblyomma cajennense



Monstro de gila
Heloderma suspectum



Bothropoides jararaca

Figura 1- Animais que possuem toxinas de valor biológico.

Fonte: www.fiocruz.br; www.animalworld.com.br; www.biologados.com.br; www.cobrasbrasileiras.com.br ; www.mostrdegila.blogspot.com .

O Brasil, com suas características climáticas e geográficas muito variadas, vem sendo considerado um dos países mais rico em biodiversidade, apresentando-se como um rico ambiente para estudos com produtos naturais (MITTERMEIER *et al.*, 2005). Este imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos na qual reside sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003). A razão dessa afirmação é facilmente comprovada quando se analisa o número de medicamentos obtidos, direta ou indiretamente, a partir de produtos naturais (**Tabela 1**). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais. Somente no período entre 1983-1994, das 520 novas drogas aprovadas pela agência americana de controle de medicamentos e alimentos (FDA), 220 (39%) foram desenvolvidas a partir de produtos naturais (HARVEY, 2000).

Entretanto, é importante ressaltar que essa biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão, dada sua grande complexidade (SIMÕES; SCHENKEL, 2002). Por esse fato, muitos desses produtos naturais, sejam de origem vegetal ou animal, ainda não possuem estudos que comprovem seu mecanismo de ação (MATOS, 2002; SILVA *et al.*, 2006). Desta forma, pesquisas com toxinas de origem animal e vegetal são de extrema relevância para obtenção de futuros agentes terapêuticos e compreensão de mecanismos fisiopatológicos de diversas doenças (MORTARI *et al.*, 2007).

TABELA 1 - EXEMPLOS DE MEDICAMENTOS DESENVOLVIDOS A PARTIR DE VENENOS ANIMAIS

Fármaco	Uso terapêutico	Fonte
Eptifibatide (Integrilin®)	Anticoagulante	Serpente <i>Sistrurus miliaris barbour</i>
Echistatin	Anticoagulante	Serpente <i>Echis carinatus</i>
Captopril	Antihipertensivo	Serpente <i>Bothrops jararaca</i>
Ranatensin	Antihipertensivo	Sapo do Gênero Rana
Ancrod (Viperinex™)	Anticoagulante para acidente vascular cerebral isquêmico agudo	Serpente <i>Calloselasma rhodostoma</i>
Ziconotida (Prialt®)	Tratamento da dor crônica	Molusco marinho <i>Conus magus</i>
Exenatida	Diabetes Melitus tipo 2	Réptil <i>Heloderma suspectus</i>

Fonte: Adaptado de Beeton, Gutman e Chandy (2006).

1.2 Serpentes da Fauna Brasileira

As serpentes são classificadas na classe *Reptilia*, subclasse *lepidosauria*, ordem *squamata*, subordem *serpentes*. Existem serpentes em quase todos os ambientes do globo terrestre, estes animais são muito bem adaptados e abundantes, somando aproximadamente 3 mil espécies no mundo, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias (HICKMAM; ROBERTS; LARSON, 2004). Destas, aproximadamente 410 são venenosas e classificadas de acordo com suas características morfológicas, compreendendo cinco famílias, a saber: Crotalidae, Viperidae, Elapidae, Hydrophiidae e Colubridae (BARRAVIERA, 1994; MATSUI *et al.*, 2000; DE CASTRO, 2006).

A real incidência mundial de acidentes por animais peçonhentos e sua gravidade permanecem desconhecidos. Estimativas recentes sugerem que em todo o mundo ocorram cerca de 3 a 5.4 milhões de acidentes por serpentes anualmente resultando em cerca de 2,5 milhões de envenenamentos e 125 a 150 mil mortes em humanos (BARONE *et al.*, 2011). No Brasil, em 2009, foram notificados pelo Sistema Nacional de Notificação de Agravos (SINAN), 29.485 casos de acidentes ofídicos. As serpentes do gênero *bothrops* e *bothropoides* responderam por 73,2% dos casos notificados neste período, enquanto as do gênero *crotalus* foram responsáveis por 10% dos acidentes. Com relação aos dados da Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica (RENACIAT) publicados no anuário estatístico do Sistema Nacional de Informação Tóxico Farmacológicas (SINITOX), em 2009, foram notificados 4.900 casos de acidentes por serpentes. A região com o maior número de casos foi à região Sul com 1383 (28,22%) casos, seguida pela região Sudeste com 1324 (27,02%) casos (LEMOS *et al.*, 2009). No estado do Ceará o registro de casos é irregular e poucos trabalhos foram publicados relativos à epidemiologia dos acidentes ofídicos. O levantamento mais recente foi realizado no período de 2001 a 2007, onde foram notificados 3877 casos de acidentes por serpentes peçonhentas, sendo o gênero *Bothrops* responsável pelo maior número de casos (ROCHA, 2008).

O Brasil, como quase toda a América, é abundante em serpentes. Existem cerca de 260 espécies de serpentes, classificadas dentro de uns 73 gêneros, em nove famílias (BARRAVIERA, 1995; DE CASTRO, 2006). Destas, apenas duas famílias (*Elapidae* e *Viperidae*) congregam as espécies peçonhentas, ou seja, àquelas que produzem toxinas em glândulas especializadas e têm aparelhos apropriados para inoculá-las. As serpentes peçonhentas no Brasil são agrupadas em quatro gêneros: *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* (Figura 2), sendo as três primeiras pertencentes à família *Viperidae* e a última à família *Elapidae* (CARDOSO *et al.*, 2003; BÉRNILS, 2010).

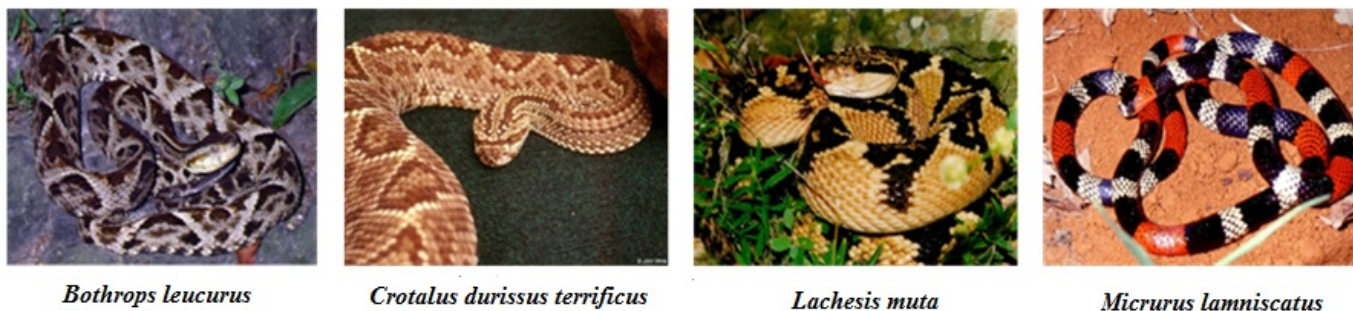


Figura 2 – Exemplos de Serpentes da fauna brasileira pertencentes a diferentes gêneros.

Fonte: <http://www.ivb.rj.gov.br>; www.latoxan.com; www.static.hsw.com.br; www.fiocruz.com.br.

1.3 Gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops*, juntamente aos recém criados *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides* e *Rhinocerothis*, pertencem à família *Viperidae* e são popularmente conhecidas como jararacas. Possui ampla distribuição e corresponde ao grupo de serpentes peçonhentas mais importantes em número de espécies e densidade populacional, com aproximadamente 30 espécies catalogadas. (PINHO; PEREIRA, 2001; QUEIROZ *et al.*, 2008).

As serpentes *Bothrops* e *Bothropoides* são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Essas serpentes são caracterizadas por possuírem a cauda sem maiores modificações, geralmente com escamas subcaudais em pares, aparelho inoculador do tipo solenóglifo, cabeça triangular e fossetas laterais. Habitam, preferencialmente, os ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas. Possuem hábitos noturnos ou crepusculares e são consideradas muito agressivas, podendo a atacar sem causar ruídos (MELGAVAREJO, 2003; ALBUQUERQUE, 2004). Ocorrem na América Central e na América do Sul, ocupando todo território brasileiro.

Em virtude do número de espécies, há grande dificuldade na sua identificação por nome popular em todo o território nacional (BÉNIS, 2010). Recentemente, considerando o parafiletismo de *Bothrops*, dados morfológicos e moleculares sugeriram a criação de uma nova espécie e a reclassificação de algumas espécies anteriormente pertencentes ao gênero *Bothrops*, este gênero foi nomeado *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 (**Figura 3**) apresentam maior importância devido à sua ampla distribuição geográfica, como: *B. atrox*, encontradas no Norte do Brasil; *B. jararaca*, distribuída nas regiões 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). No entanto, existem espécies importantes limitadas a regiões específicas como a *Bothropoides insulararis*, encontrada exclusivamente na ilha da Queimada Grande, na costa do Estado de São Paulo (SGRIGNOLLI *et al.*, 2011).



Figura 3 – Exemplos de Serpentes do gênero *Bothrops* e *Bothropoides*

Fonte: <http://www.ivb.rj.gov.br>; www.latoxan.com; www.static.hsw.com.br; www.fiocruz.com.br

1.3.1 *Bothropoides insularis*

A serpente *Bothropoide insularis* (jarara ilha) (**figura 4**), que foi descrita em 1921, pelo herpetólogo Afrânio do Amaral (1894-1982) (SIMIONI; D'ABREU, 2001), é uma espécie endêmica nativa da ilha de Queimada Grande (**figura 5**) situada a 35 km da costa sul do Estado de São Paulo, no município de Itanhaém (MARQUES *et al.*, 2002; VALENTE *et al.*, 2009). Essa

espécie, embora seja eventualmente encontrada em áreas cobertas por capim, ocorre principalmente na Mata Atlântica, que cobre boa parte da ilha.

Essas jararacas têm coloração amarelo claro, que as tornam adaptáveis ao ambiente em que vivem, facilitando a caça as suas presas. Além disso, têm hábitos diurnos, e geralmente são arborícolas. A dieta de adultos é baseada em pássaros migratórios, que são capturados tanto no chão, como nas árvores. Os jovens alimentam-se de anfíbios, lagartos e centopéias. Seu veneno é considerado muito mais tóxico em aves do que o da *B.jararaca* (Amaral, 1920) (Wüster *et al.*, 2005).

Expedições recentes à ilha indicam que há uma população em torno de 1.500 a 2.000 serpentes do gênero, nos 30 hectares de florestas da ilha, o que representa uma densidade de aproximadamente 50 a 70 serpentes por hectare (MARQUES; SAZIMA, 2009).



Figura 4. *Bothropoides insularis* com sua coloração amarelo claro e no seu habitat arborícola.

Fonte: www.biologados.com



Figura 5. Localização da Ilha de Queimada Grande - São Paulo.

Fonte: www.conservando.wordpress.com

1.4 Composição dos venenos botrópicos

Venenos de serpentes são investigados em muitos laboratórios biomédicos em todo o mundo, tendo como foco dois temas principais: a melhoria de anti-venenos para salvar a vida humana após um acidente por animal peçonhento, e descoberta de novos componentes que podem ter uma aplicação na terapêutica de uma variedade de doenças (HYNES, 2002). As toxinas de serpentes exibem uma infinidade de atividades farmacológicas, como miotóxica, neurotóxica, anticoagulante, hipotensora, hemolítica, inibidora da agregação plaquetária, bactericida e atividades pró-inflamatórias (AIRD, 2002).

Os venenos de serpentes constituem misturas complexas contendo componentes protéicos e não protéicos com diferentes estruturas e funções (PAL et al., 2002; PORTO *et al.*, 2007). Os componentes protéicos constituem enzimas e proteínas não enzimáticas, além de polipeptídeos. Enquanto os componentes não protéicos incluem constituintes orgânicos e não orgânicos (TU, 1996; MATSUI *et al.*, 2000; RAJENDRA *et al.*, 2004). Muitos desses componentes são moléculas biologicamente ativas com função de imobilizar e matar a presa, além de desempenham função no processo digestivo (QUEIROZ *et al.*, 2008).

Mais de 1000 proteínas têm sido caracterizadas, e essas toxinas protéicas estão agrupadas em famílias bem reconhecidas: 1) inibidores de serina proteinases; 2) lectinas; 3) sarafatoxinas; 4) fatores de crescimento nervoso; 5) peptídeos natriuréticos; 6) peptídeos potenciadores de bradicinina; 7) desintegrinas; entre outros (MCLANE *et al.*, 1998; KINI, 2002; YAMAZAKI *et al.*, 2003a, 2003b). Os membros de cada família de proteínas têm um padrão molecular semelhante, mas eles exibem múltiplas funções (TORRES *et al.*, 2003).

Dentre os constituintes não orgânicos conhecidos destacam-se: Cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e o zinco (FRIEDERICH; TU, 1971). Entre os componentes orgânicos não protéicos, encontramos os aminoácidos livres e os pequenos peptídeos, carboidratos, lipídios, principalmente fosfolipídios, e aminas biogênicas (VARANDA; GIANINI, 1994).

As composições dos venenos de serpentes podem exibir variações associadas com a origem geográfica, ao habitat, às variações climáticas, à dieta, a idade e ao gênero (FURTADO *et al.*, 2006).

Os venenos das serpentes da família *Viperidae* são os tipos mais estudados de toxinas animais e são mais complexos que os pertencentes a outras famílias (CALVETE *et al.*, 2009). A composição protéica do veneno Bothrópico, que corresponde 90-95% do peso seco dos venenos, é responsável por quase totalidade dos efeitos biológicos encontrados (BON, 1997).

As principais substâncias protéicas desses venenos são as proteases, metaloproteases, fosfolipases A₂ (PLA₂), nucleotidasas, L-aminoácido oxidase (LAAO), hialuronidasas, neurotoxinas, cardiotoxinas, lecitinas, desintegrinas, peptídeos natriuréticos, peptídeos potenciadores de bradicinina e alguns fatores específicos de crescimento (PAL *et al.*, 2002; KINI, 2006; VALENTE *et al.*, 2009). Essas substâncias protéicas são as responsáveis pela indução de vários efeitos farmacológicos, incluindo o efeito neurotóxico, miotóxico, cardiotoxico, hemorrágico, hemolítico, pró-coagulante e o anticoagulante (KINI, 1997; BAILEY; WILCE, 2001).

O veneno botrópico, inicialmente no local da picada, pode causar uma ação proteolítica intensa com subsequente processo inflamatório generalizado, ocasionando edema e até necrose local (CASTRO, 2004; LIRA *et al.*, 2007)

A jararacina e outras metaloproteinasas respondem por essa ação proteolítica (COSTA *et al.*, 2002), que também conta com a ação miotóxica típica da PLA₂ (BONFIM *et al.*, 2001). Além da ação local, o veneno também possui ação direta sobre a parede dos vasos, causando desde um aumento maior na permeabilidade até a sua ruptura. A hemorragia decorrente da ruptura dos vasos é dependente da concentração de veneno inoculada, podendo ocorrer até mesmo distante do local da picada. As serinas proteases, juntamente com às SVMPs (Metaloproteases de venenos de serpente), desintegrinas e lectinas do tipo C, são exemplos de enzimas que afetam a função plaquetária e/ou fatores da cascata de coagulação ativando, inibindo ou degradando algumas proteínas homeostase da coagulação, podendo gerar distúrbios da coagulação sanguínea, que, associados à ação proteolítica e miotóxicas, geram quadros hemorrágicos (PIRKLE, 1998; QUEIROZ, 2008). Além dos eventos já citados, hipotensão e

excreção de sódio na urina ocorrem pela ação de peptídeos potenciadores de bradicinina e peptídeos natriuréticos (CARVALHO *et al.*, 2008).

O veneno da *B. insularis* apresenta características semelhantes aos das outras serpentes do gênero *Bothrops* e *Bothropoides*, causando danos locais e injúrias sistêmicas (VALENTE *et al.*, 2009) com potência cinco vezes maior que o de outras espécies do gênero (MARQUES *et al.*, 2002).

Em comparação com outras espécies do mesmo gênero, a toxicologia e o mecanismo celular completo de produção, estocagem e secreção das proteínas do veneno da *B.insularis* ainda são pouco estudados. Curiosamente, essa serpente tem uma dieta restrita, composta principalmente de aves, uma condição imposta pelo isolamento físico. Portanto, o veneno *B.insularis* pode constituir uma valiosa fonte de proteína para o estudo da relação estrutura-atividade das moléculas envolvidas no processo de envenenamento das presas (JUNQUEIRA DE AZEVEDO, 2002).

Recentemente, diferentes autores vêm explorando o veneno da *B.insularis* por meio de análise transcriptômica e proteômica, a fim de ter um maior entendimento dos compostos presentes no veneno, como também um melhor entendimento sobre a ação tóxica do mesmo em suas presas (BAZZA *et al.*, 2005; GUERCIO *et al.*, 2006; VALENTE *et al.*, 2009).

Valente *et al.* (2009) descreveram que o veneno é composto em sua maioria de frações tóxicas (**Figura 6**), e, dentro dessa fração, foram observados 11 constituintes principais (**figura 6**) como, metaloproteases (SVMP), peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP), lectinas do tipo C, serina protease, fosfolipases A₂ (PLA₂), fatores de crescimento do endotélio vascular (svVEGF), L- amino oxidase (LAAO), proteínas secretórias de cisteína (CRISPs), proteínas G10 e fatores de crescimento neurotróficos.

O veneno da *B.insularis*, pode apresentar ação coagulante e atividade hemolítica. Barbosa *et al.* (2003) mostrou que a formação de edema é induzida pela liberação de histamina, geração de óxido nítrico e produtos da cicloxigenase (COX) devido à ação de proteases e fosfolipase A₂ (PLA₂) presentes no veneno.

A PLA₂ também é responsável pela atividade neuromuscular, gerando perda de equilíbrio, paralisia e convulsões na presa. A ação neurotóxica é acentuada na espécie *B.insularis*, sendo essa ação mais potente em aves do que em camudongos. É importante ressaltar que tal ação não é marcante em outras espécies do gênero (COGO *et al.*, 1993; GUERCIO *et al.*, 2006).

Alguns trabalhos foram realizados no sentido de avaliar a necrose, o edema associado e a toxicidade do veneno total e de suas frações (BARBOSA *et al.*, 2002) principalmente em órgãos específicos como rim e fígado (DA CRUZ HOFLING *et al.*, 2001; BRAGA, 2006).

Braga (2006) demonstrou, em seus estudos que o veneno total da *B.insularis* apresentou alterações dos parâmetros funcionais renais, com alterações no transporte de eletrólitos e no clearance osmótico. Estudos posteriores de Braga *et al.* (2007; 2008) com as frações Lectina, Trombina símile, L-amino oxidase (LAAO) e Fosfolipase A₂ (PLA₂) do veneno demonstraram atividade semelhante à observada no veneno total da *B.insularis*.

Oliveira-Carvalho *et al.*, (2008) demonstrou em seus estudos que o veneno da *B.insularis* age diretamente em fatores da coagulação, apresentando atividade hemorrágica. Atividade hipotensora também foi observada utilizando o veneno dessa serpente (VALENTE *et al.*, 2009).

Muita atenção também tem sido dada à atividade pré-sináptica da fração PLA₂ por meio de estudos *in vitro*. Tal fato, reflete a maior toxicidade do veneno dessa espécie que contém uma PLA₂ com atividade neurotóxica quando comparada a outras espécies do mesmo gênero, que apesar de possuírem essa fração em seus venenos, não apresentam em mesma intensidade a atividade neurotóxica (COGO, 1998).

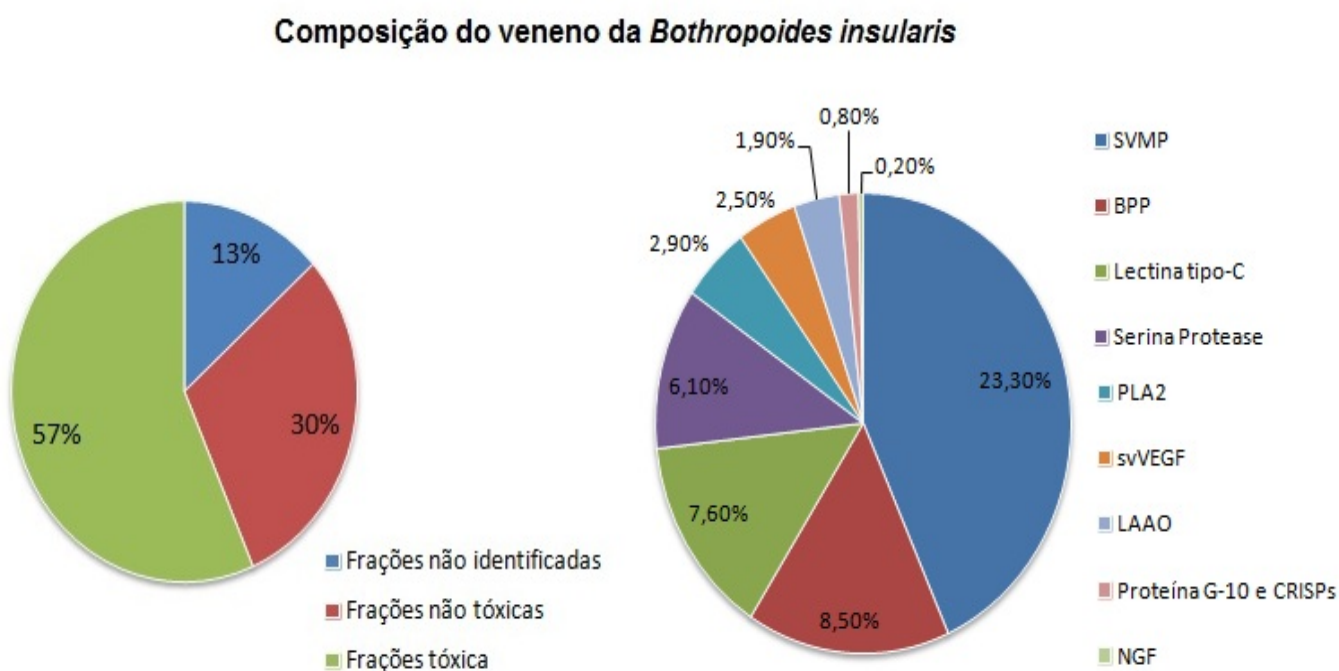


Figura 6. Porcentagens de produtos tóxicos estudados em uma análise transcriptômica do veneno de *bothropoides insularis*.

Fonte: Adaptado de VALENTE, 2009.

1.4.1 Fosfolipase A₂

As fosfolipases A₂ (PLA₂) constituem uma superfamília de enzimas encontradas em diversos tecidos de mamíferos e também em venenos de serpentes, escorpiões e abelhas (NICOLAS et al., 1997). Elas catalisam a hidrólise de glicerofosfolípídios na posição *sn*-2 da cadeia principal do glicerol, liberando lisofosfolípídios e ácidos graxos (VERHEIJN et al., 1980; KINI, 2003). Segundo Chakraborti (2003) e Balsinde et al. (2006), elas podem ser classificadas em intracelular ou citosólicas (cPLA₂) e extracelular ou secretórias (sPLA₂). Essas formas podem também ser subdivididas em dependente e independente de Ca⁺². As PLA₂ independentes de Ca⁺² (iPLA₂) apresentam elevado peso molecular (~85kDa) e são encontradas no citosol (BALSINDE; DENNIS, 1997).

De acordo com a estrutura primária e a localização celular, as fosfolipases (PLA₂s) extracelulares podem ser subdivididas em tipo I, II e III (DENNIS, 1994) (**Figura 9**). As PLA₂s do tipo I estão presentes em pâncreas de mamíferos e venenos de serpentes pertencentes à família *Elapidae* e *Hydrophidae*; As PLA₂s do tipo II pertencem à família *Crotalidae* e *Viperidae* e as PLA₂s do tipo III têm sido isoladas dos venenos de abelhas (*Apis mellifera*) (DENNIS, 1994; LANDUCCI et al., 2000). Apesar das diferenças estruturais, as fosfolipases apresentam uma seqüência similar de ligação com cálcio e com regiões de sítio ativo (YANG et al., 1994).

As fosfolipases de venenos de serpentes (svPLA₂) possuem várias bioatividades, como indução da motilidade de células endoteliais, atividade antimicrobiana, anticoagulante, antitumor, inibição da agregação plaquetária, neurotoxicidade pré e pós-sináptica, miotoxicidade, cardiotoxicidade, podendo ainda, apresentar efeitos convulsivantes, hipotensivos e pró-inflamatórios (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; OWNBY, 1998; SOARES et al., 1998; OWNBY et al., 1999; SOARES et al., 2003; XU et al., 2007). Portanto, as svPLA₂ podem exibir uma grande variedade de efeitos farmacológicos, interferindo nos processos fisiológicos normais. Atuam, por exemplo, sobre a cascata de eventos inflamatórios, conduzindo o aumento da permeabilidade microvascular e a formação de edema, o recrutamento de leucócitos para os tecidos e a liberação de mediadores que produzem desordens inflamatórias locais e sistêmicas (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; KOH et al., 2006). Diversas PLA₂s extraídas de venenos de serpentes têm demonstrado potencial em provocar lesão renal em perfusão de rim isolado, em particular aquelas extraídas de serpentes do gênero *Bothrops* e *Bothropoides* (HAVT et al., 2001; BARBOSA et al., 2002; BRAGA et al., 2008; EVANGELISTA et al., 2010).

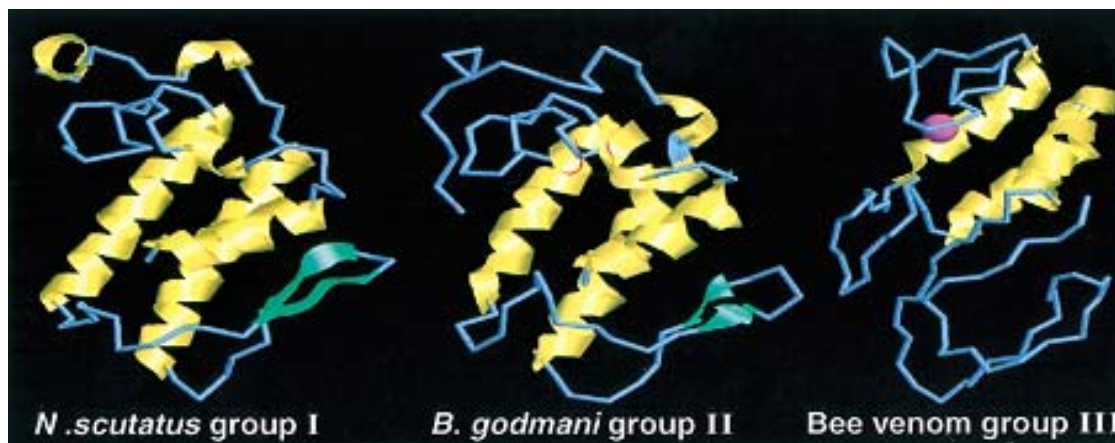


Figura 7. Estrutura tridimensional de vPLA₂s pertencentes aos grupos I (notexina: *Notechis scutatus*, cataliticamente ativa, grupo IA), II (K-49 miotoxina II: *Bothrops godmani*) e III.

Fonte: Valentin e Lambeau (2000).

1.5 Complicações dos acidentes botrópicos

A peçonha das serpentes botrópicas apresenta importantes efeitos fisiopatológicos, como lesões locais e destruição tecidual (ação proteolítica) no local da picada (GUTIERREZ & RUCAVO, 2000), ativação da cascata de coagulação, podendo induzir incoagulabilidade sanguínea por consumo de fibrinogênio (ação coagulante), liberação de substâncias hipotensoras e lesões na membrana basal dos capilares por ação de diversas proteínas (ação hemorrágica), que, associada à plaquetopenia e a alterações da coagulação promovem manifestações hemorrágicas, frequentes nesse tipo de acidente (PINHO; PEREIRA, 2001).

O quadro clínico caracteriza-se por manifestações locais importantes, como dor que se desenvolve rapidamente após o acidente ofídico no local da picada, e, posteriormente, edema de caráter progressivo. A patogênese dessa ação proteolítica é complexa, decorrente da ação de várias enzimas presentes no veneno, dentre elas, as metaloproteinases, as hialuronidases e as fosfolipases A₂ (CASTRO, 2006). Essas enzimas podem atuar sobre diferentes substratos, causando lesão tecidual por meio da ativação ou liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas, derivados do ácido araquidônico (leucotrienos, prostaglandinas, prostaciclina), ativação do sistema complemento e de cininas TNF- α , INF- γ , IL-1 e IL-6 (SGRIGNOLLI *et al.*, 2011).

Podem ocorrer equimoses, lesões bolhosas e sangramentos no local da inoculação da peçonha. 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 local do membro acometido (PINHO; PEREIRA, 2001; CASTRO, 2006).

Entre a ação dos venenos botrópicos, a que possui maior letalidade é a que envolve alterações hemostáticas. Os efeitos na coagulação podem ocorrer pela ação de diversas proteínas, principalmente em três locais distintos: diretamente no fator X (FX); sobre a protrombina, formando trombina e alterando o fibrinogênio, levando a formação de fibrina. As modificações plaquetárias podem ocorrer precocemente pelo elevado consumo de plaquetas, afetando a coagulação. De maneira indireta, ocorre a formação de fibrinólise dos trombos e o desencadeamento de fibrinólise primária (HUTTON, WARELL, 1993). Vale ressaltar a ação do veneno sobre a coagulação, associada à ação lesiva do veneno sobre a camada íntima vascular (proteólise), aumentando a permeabilidade vascular ou danificando o endotélio vascular, resultando em quadros hemorrágicos (HATI *et al.*, 1999).

As manifestações sistêmicas incluem além de sangramento em feridas cutâneas existentes, hemorragias à distância como gengivorragias, epistaxes, hematêmese e hematúria. Podem ocorrer também náuseas, vômitos, sudorese, hipotensão arterial e mais raramente choque (PINHO E PEREIRA, 2001; FRANÇA E MALÁQUE, 2003; WHITE, 2005).

As complicações sistêmicas mais comuns são o choque, a insuficiência renal aguda, a insuficiência respiratória, a septicemia e a coagulação intravascular disseminada, tendo patogênese multifatorial e sendo as causas mais frequentes de morbidade e mortalidade em acidentes ofídicos, com serpentes do gênero *Bothrops* e *bothropoide* (BJARNASON; FOX, 1994; KAMIGUTI *et al.*, 1996; GUTIÉRREZ, 2002; WHITE, 2005).

1.5.1 Insuficiência Renal Aguda (IRA)

Os venenos botrópicos podem causar alterações em todas as estruturas do rim, levando a glomerulonefrite, glomerulite, nefrite intersticial, arterite, necrose tubular, necrose cortical e insuficiência renal (CASTRO, 2006; SITPRIJA, 2006).

A insuficiência renal aguda (IRA) é a alteração mais grave dos acidentes ofídicos, seguida de necrose tubular aguda e, ocasionalmente, glomerulonefrite (COLARES-BUZATO *et al.*, 2002).

Muitos fatores têm sido implicados na patogênese da IRA induzida pelo envenenamento botrópico, como vasoconstrição renal e consequente isquemia renal. Degeneração, necrose e regeneração do epitélio tubular, gerando edema intersticial, infiltrações celulares (linfócitos, células plasmáticas e fagócitos mononucleares) e envolvimento glomerular

também são vistos com frequência, gerando deficiência da filtração glomerular, da diurese e do fluxo plasmático renal. Diminuição dos níveis de fibrinogênio, hematócrito e a presença de hemólise, gerando quadros de hematúria e proteinúria são também bastante marcantes (SIMIONI; D'ABREU, 2001; SITPRIJA, 2006).

A etiopatogenia da lesão renal tem sido atribuída à nefrotoxicidade direta da peçonha, miólise, hemólise, hipotensão, coagulação capilar glomerular, ação tóxica vascular e até mesmo, reações de hipersensibilidade à toxina ou ao soro antiofídico (PINHO *et al.*, 2000).

A patogênese da lesão renal em acidentes ofídicos é complexa envolvendo tanto a ação direta do veneno sobre o rim como também os efeitos inflamatórios, devido à liberação de vários citocinas e mediadores inflamatórios endógenos. Histamina, cininas, eicosanóides, fator de ativação plaquetária, catecolaminas e endotelina estão entre os mediadores envolvidos na patogênese da insuficiência renal aguda (IRA) induzida por venenos de serpentes (SGRIGNOLLI *et al.*, 2011).

A fosfolipase A₂, um importante componente tóxico do veneno, estimula eixos hipotálamo-hipófise, aumentando a secreção de hormônios, como a vasopressina, os corticosteróides e a arginina responsáveis pelas respostas de fase aguda da lesão renal (CHISARI *et al.*, 1998).

Em um estudo recente sobre envenenamento, a liberação de mediadores vasoativos noroepinefrina, epinefrina, dopamina, tomboxanos, endotelinas e prostaglandinas encontra-se elevadas. Além destes mediadores, também foram encontrados citocinas, que são importantes na interação celular em um variedade de processos imunológicos e inflamatórios (SITPRIJA, 2006).

Avila-aguiero *et al.*(2001) e Petricevich *et al.*(2000) demonstraram que o envenenamento de ratos pelo veneno de *Bothrops asper* e *Bothropoides jararaca* induziam a elevações de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 , IFN- γ e óxido nítrico no soro desses animais.

Os efeitos das citocinas e mediadores vasoativos são refletidos por alterações hemodinâmicas e por resposta imune, desempenhando um papel importante na patogênese da IRA em casos de envenenamento por serpentes (**Figura 8**) (SITPRIJA, 2006).

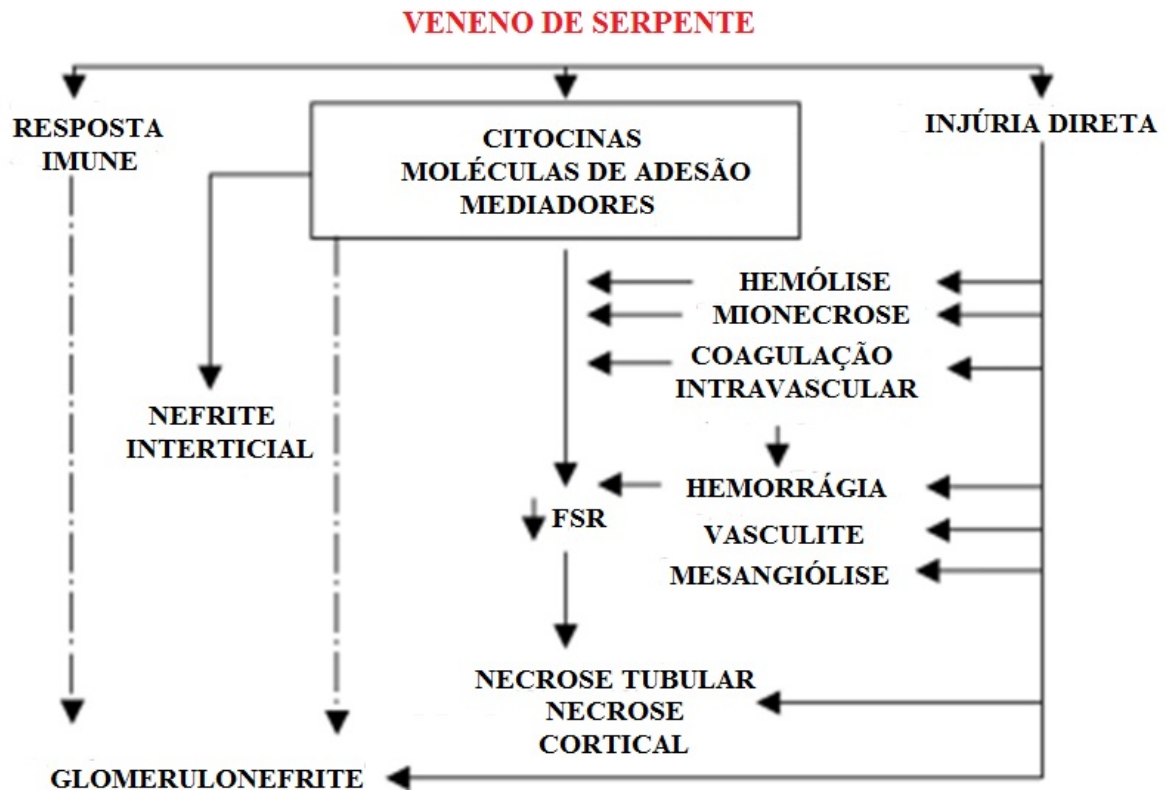


Figura 8. Patogênese da nefropatia induzida pelo veneno botrópico. * FRS=Fluxo sanguíneo renal.

Fonte: adaptado de SITPRIJA, 2006.

1.6 Alterações celulares envolvidas na Insuficiência Renal Aguda

Muitos fatores estão envolvidos no desenvolvimento da IRA, induzida por venenos de serpentes, em resposta a acidentes ofídicos. Esses vários fatores podem ser decorrentes de uma série de lesões específicas que ocorrem a nível celular. Após lesão renal inicial, o rim desenvolve uma resposta molecular que determinará o destino da célula. Quatro destinos celulares são identificados na IRA: as células podem sofrer necrose; apoptose; divisão celular; ou comportam-se indiferentes ao estresse (VIEIRA, 2001).

Lieberthal *et al.* (1996) demonstrou que células tubulares renais, quando expostas a altas concentrações do agente nefrotóxico cisplatina, morrem por necrose, e que concentrações menores induzem apoptose. Esse estudo permite por tanto, entender que a morte induzida por agentes tóxicos, dependem muitas vezes da concentração desse agente.

A necrose é um tipo de morte na qual as células sofrem estímulos, como lesões mecânicas, agentes citotóxicos e hipóxia, resultando no aumento do volume celular, agregação

de cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e, conseqüentemente, ruptura celular (**Figura 9**) (ZONG; THOMPSON, 2006).

Em células renais, a morte celular por necrose resulta de efeitos combinados de uma série de vias bioquímicas, como 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; BOUJRAD *et al.*, 2007;).

A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas (**Figura 9**). De um modo geral, é um fenômeno bastante rápido: ocorre retração das células, que causam perda de aderência com a matriz extracelular e as células vizinhas. As organelas celulares mantêm sua morfologia, exceto em alguns casos, como as mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação (aparência de núcleos picnóticos) e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos, e o núcleo desintegram-se em fragmentos envoltos pela membrana nuclear (corpos apoptóticos). Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem-se, originando estruturas com o conteúdo celular. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar processos inflamatórios (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Outra característica marcante da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA (Ácido Desoxirribonucléico). Uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA (SARASTE; PULKKI, 2000).

Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles, a ligação de moléculas aos receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, deficiência de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio (HENGARTNER, 2000).

A apoptose pode ser dividida em três fases: de iniciação, efetora e de degradação. A fase de iniciação é altamente dependente do tipo de estímulo recebido pela célula. Na fase efetora, há a ativação da cascata das caspases, proteases, nucleases e de outros intermediários. Por fim, a fase de degradação, em que a célula adquire as características bioquímicas e morfológicas típicas da apoptose (GREEN; KROEMER, 1998).

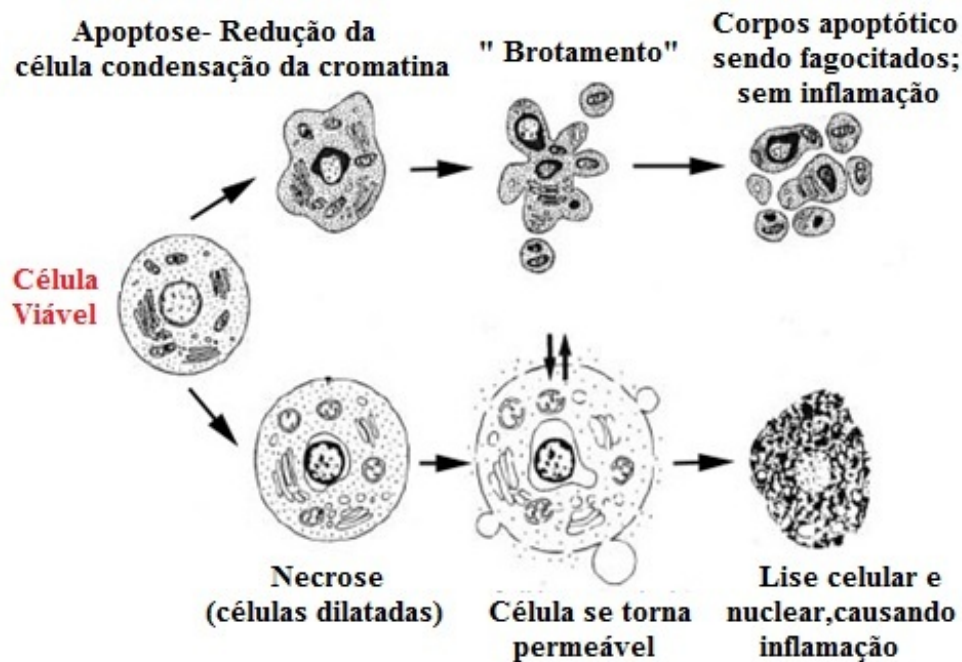


Figura 9. Alterações de morte celular por apoptose e necrose.

Fonte: Adaptado de CRUCHTEN, 2002.

A apoptose pode ser iniciada de duas maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca é desencadeada pela interação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana, pertencentes à superfamília de fatores de necrose tumoral (rTNF). A porção citoplasmática desses receptores contém domínios de morte intracelular chamados de receptores de morte (death receptors, DRs). Entre eles, incluem-se o TNF, o TNFR1, o TRAMP, o TRAIL e o FAS. 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 8 e 10. Depois de tornarem-se ativas, as caspases -8 e -10 difundem-se no citoplasma e ativam, entre outras, as caspases -3, -6 e -7. Estas, por sua vez, clivam múltiplos componentes vitais para as células, levando à morte por apoptose (**Figura 10**) (CRUCHTEN, 2002; BROECK, 2002; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

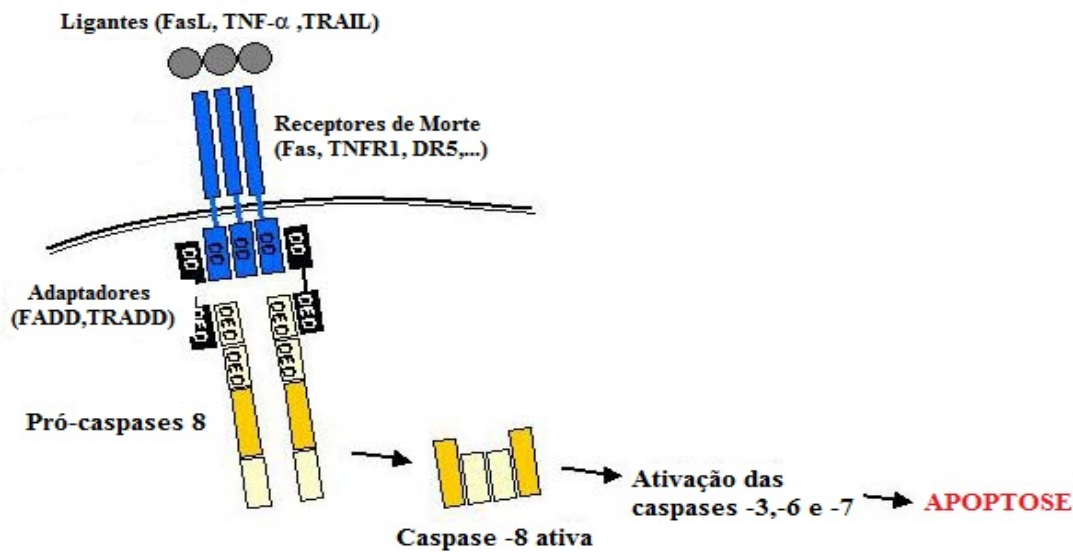


Figura 10. Via extrínseca da apoptose.

Fonte: Adaptado de GEWIS, 2003.

A via intrínseca (mitocondrial) é ativada por estresse intracelular ou extracelular, como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes membros da família Bcl-2. Esses podem ser divididos em dois grupos distintos, aquelas com atividade anti apoptótica (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) e aquelas que promovam a apoptose (Bax, Bid e Bak). Os sinais mitocondriais anti ou pró-apoptóticos estão em equilíbrio e a predominância de um desses sinais, conduz, respectivamente, a sobrevivência ou morte celular programada (CHAN; YU, 2004). Os sinais que são transduzidos em resposta a esses insultos afetam, principalmente, a mitocôndria (HENGARTNER, 2000). Inúmeros estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como o principal mediador desse tipo de morte. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas para o citoplasma (DESAGHER *et al.*, 2001). Além da liberação de moléculas pela mitocôndria, a indução da permeabilidade mitocondrial gera a perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS).

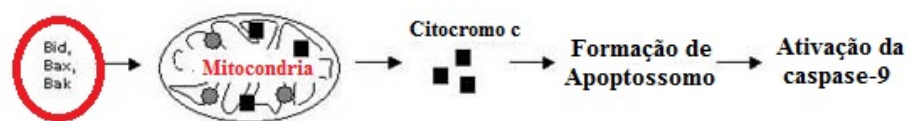
O aumento nos níveis de ROS leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, gerando um dano oxidativo. A resposta da mitocôndria a tal dano é uma via importante no início da apoptose. Além disso, é sabido que as ROS induzem a ativação das caspases -9 e -3 (GREEN; KROEMER, 2004).

Alguns estudos indicam que, durante a apoptose, ocorre a formação de um grande poro que contém diversas proteínas e abrange as membranas interna e externas da mitocôndria. Através desse poro ocorre a liberação do citocromo *c* para o citoplasma, onde participa da ativação da apoptose (GUPTA, 2003). Os diferentes sinais indutores de apoptose são detectados pela mitocôndria, fazendo com que ocorra um desacoplamento da cadeia respiratória e consequente liberação de citocromo *c* e proteínas ativadoras da apoptose para o citosol. Neste, o citocromo *c* forma um complexo com a proteína adaptadora (APAF-1) e a caspase 9, conhecido como apoptossomo, promovendo a clivagem da pró-caspase 9 e liberando a caspase 9 ativa (**Figura 11**). Uma vez ativada, a caspase 9 ativa a caspase 3, que vai ocasionar a apoptose (PETROS *et al.*, 2004; RUPNARAIN *et al.*, 2004).

Recentemente, também foi descrita a participação, na via mitocondrial, de uma flavoproteína conhecida por Fator Indutor de Apoptose (AIF). A AIF migra da mitocôndria para o núcleo após um estímulo de apoptose e induz a condensação da cromatina e fragmentação do DNA, independente da ativação das caspases (GRIVICICH *et al.*, 2007).

Tendo em vista todos os eventos envolvidos no processo de injúria renal e diante da importância clínica desta patologia, neste trabalho estudaremos a nefrotoxicidade do veneno da serpente *Bothropoides insularis* e sua fração fosfolipase A₂ sobre células tubulares renais, podendo contribuir para esclarecer os mecanismos fisiopatológicos. A elucidação destes mecanismos pode permitir a interferência em alguns pontos de suas vias de sinalização de respostas com vistas à interrupção da sequência de eventos celulares/moleculares que podem culminar em lesão.

1. VIA MITOCONDRIAL DE ATIVAÇÃO DAS CASPASES



2. ATIVAÇÃO E FORMAÇÃO DO APOPTOSSOMO

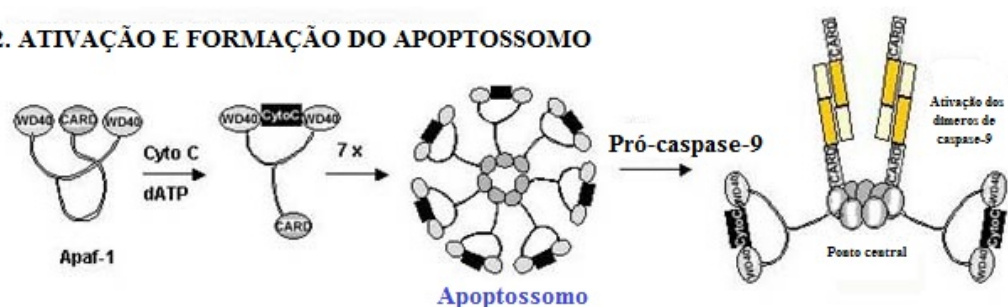


Figura 11. 1- Via intrínseca da apoptose; 2-Formação do apoptossomo.

Fonte: Adaptado de ACEHAN, 2003.



JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, muitos estudos visam descobrir a ação de toxinas, bem como, o mecanismo pelo quais estas causam seus efeitos locais e sistêmicos. Para tanto, a ampliação do conhecimento sobre a ação das toxinas de venenos em diversas linhagens celulares busca, na biodiversidade, ferramentas para a construção de fármacos biologicamente ativos e/ou elucidação de mecanismos fisiopatológicos (PEIXOTO, 2003).

Os acidentes ofídicos são um sério problema de saúde pública nos países tropicais, pela frequência com que ocorrem e pela morbi-mortalidade gerada por complicações induzidas pelo veneno (PINHO *et al.*, 2000).

A Insuficiência Renal Aguda (IRA) é uma das principais complicações produzidas nesses acidentes (gêneros *Bothrops* e *Crotalus*), e sua patogênese ainda não está completamente elucidada. As lesões renais podem ser causadas pela ação isolada ou combinada de diferentes mecanismos isquêmicos e/ou nefrotóxicos, desencadeados pelos venenos no organismo (PINHO *et al.*, 2000; GRISOTTO *et al.*, 2006; DE SOUZA *et al.*, 2008).

Estudos prévios demonstraram que o veneno da *B. jararacussu* (HAVT *et al.*, 2001), *B. moojeni* (BARBOSA *et al.*, 2002) e *B. erythromelas* (MARTINS *et al.*, 2005) e *B. insularis* (BRAGA, 2006) alteram diversos parâmetros fisiológicos em modelo de rim isolado.

Comparado com outras espécies do gênero *Bothrops*, o veneno da *Bothropoides insularis* apresenta uma maior toxicidade, no entanto a toxilogia do veneno ainda é pouco compreendida (MARQUES; MARTINS; SAZINA, 2002). Braga (2006) demonstrou, em seus estudos que o veneno total da *B. insularis* gerou lesão tubular aguda e alterações dos parâmetros vasculares e funcionais renais. Estudos posteriores de Braga *et al.* (2008) com a fração Fosfolipase A₂ (PLA₂) do veneno demonstrou atividade semelhante à observada no veneno total da *B. insularis*.

Tendo em vista todos os eventos envolvidos no processo de injúria renal e diante da importância clínica dessa patologia, este trabalho estudou a ação do veneno total da serpente *Bothropoides insularis* e sua fração fosfolipase A₂, sobre células tubulares renais, podendo contribuir para esclarecer os possíveis mecanismos de nefrotoxicidade.



3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do veneno da serpente *Bothropoides insularis* e sua fração fosfolipase A₂ sobre células tubulares renais, com o propósito de contribuir para a descoberta de ferramentas farmacológicas e/ou elucidar os mecanismos de nefrotoxicidade.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do veneno e fração fosfolipase A₂ da serpente *Bothropoides insularis* em células tubulares renais;
- Estudar o efeito do veneno e fração fosfolipase A₂ sobre a viabilidade da linhagem celular em estudo;
- Avaliar o potencial apoptótico e/ou necróticos do veneno e sua fração;
- Investigar a expressão de caspases efetoras (3 e 8) envolvidos no mecanismo de morte celular.



MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Veneno e sua Fração fosfolipase A₂

O veneno total da *Bothropoides insularis* (BiVT) e a sua fração fosfolipase A₂ (BiPLA₂) foram obtidos e purificados na UNESP (Depto. de Bioquímica - Inst. Biologia, São Paulo, SP, Brasil) coordenado pelo Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama. No momento do uso, foram preparadas soluções a 2,0 mg/mL em tampão fosfato salina (PBS).

4.2 Linhagem Celular

As células utilizadas foram células tubulares epiteliais renais MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) obtidas no Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo- USP.

4.3 Cultivo e manutenção das células MDCK

As células tubulares renais MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*), foram cultivadas em garrafas plásticas estéreis com o meio de cultura RPMI 1640 (contendo insulina, hormônio de crescimento, hormônio tireoidiano, transferrina, prostaglandinas e L-glutamina) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e mantidas a uma temperatura de 37 °C em estufa contendo 5% de CO₂. O crescimento celular foi observado em microscópio de inversão a cada 24 horas (FRESHENY, 2000; BUTLER; DAWSON, 1992). As células MDCK constituem uma linhagem aderente, que formam uma monocamada sobre a superfície da garrafa de cultivo. Após confluência, onde toda a superfície de cultivo foi preenchida, as células foram deslocadas utilizando tripsina EDTA (0,05%/0,02%), e a suspensão celular foi redistribuída para outras garrafas de cultivo, expandindo a cultura celular.

As alíquotas de células para estoque foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 acrescido de SBF a 50% e DMSO a 10%, congeladas primeiramente à -70°C e mantidas em nitrogênio líquido (FRESHENEY, 2000).

Antes de cada experimento, as células MDCK foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 sem SBF por 24 horas antes do início do experimento, para sincronizar as células na fase G₀ do ciclo celular. Em seguida, foram deslocadas das garrafas de cultura por meio da

exposição à tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) por aproximadamente 5 minutos em estufa de CO₂ a 37°C, suspensas em meio de cultura e centrifugadas por 5 minutos a 4000 rpm (MARTINS *et al*, 2005; CHAIM, 2005). Após ressuspensão e quantificação em câmara de Neubauer, as células MDCK foram plaqueadas a 1×10^5 céls/mL em placas de 96 poços. Decorridas 24 horas do plaqueamento, os poços foram tratados com diferentes concentrações de BiVT e BiPLA₂ por 24h para realização dos diferentes protocolos experimentais.

Como grupo controle foi considerado os poços contendo células MDCK tratadas unicamente com PBS, o veículo de diluição das substâncias testadas.

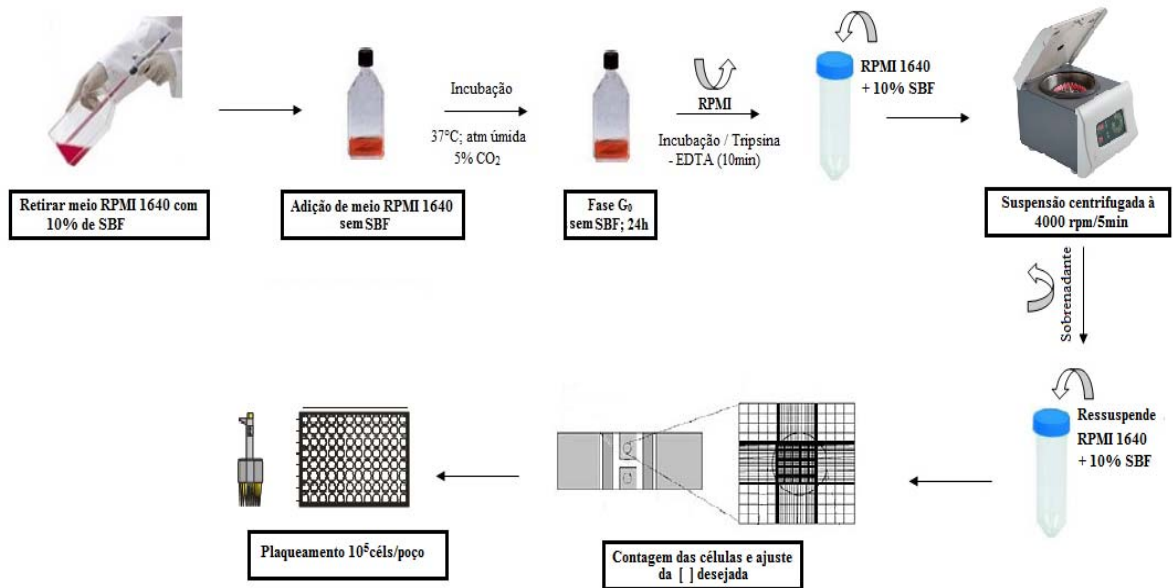


FIGURA 12. Esquema simplificado do cultivo de células tubulares renais MDCK.

4.4 Estudo do efeito do veneno e fração fosfolipase A₂ de *Bothropoides insularis* sobre células renais

4.4.1 Ensaio de Viabilidade Celular

4.4.1.1 Ensaio de redução do MTT

O ensaio consiste em uma análise colorimétrica que mede a citotoxicidade de forma indireta (MOSMANN, 1983). O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H) é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais citoplasmáticas, bem como outras enzimas lisossomais. O MTT é reduzido em formazan, um sal insolúvel de cor violácea pelos subprodutos das desidrogenases celulares, NADH e NADPH. Os cristais de formazan são solubilizados, formando um produto colorido cuja medição da densidade óptica é feita em espectrofotômetro a 570 nm de absorbância. A intensidade do produto colorido formado é diretamente proporcionais ao número de células viáveis presentes na amostra, confirmando a capacidade redutora do sistema sobre o MTT (HEINRICH *et al.*, 2005).

4.4.1.1.1 Protocolo experimental

Após 24 horas do tratamento com BiVT e BiPLA₂ (200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL) em placas de 96 poços, 100 µL do sobrenadante do meio de cultura foram removidos e adicionou-se 10 µL de MTT 2,5 mg/mL dissolvido em PBS. Após incubação por 4 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, adicionou-se 90µL da solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% dissolvido em HCL 0,01N, para solubilizar os cristais de formazan formados. As placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 17 horas, e posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm.

A porcentagem de viabilidade dos grupos tratados foi calculada pela comparação da absorbância dos grupos testes em relação ao grupo controle, sendo considerada como 100% a viabilidade média do grupo controle (GOMES, 2006; MOSMANN, 1983).

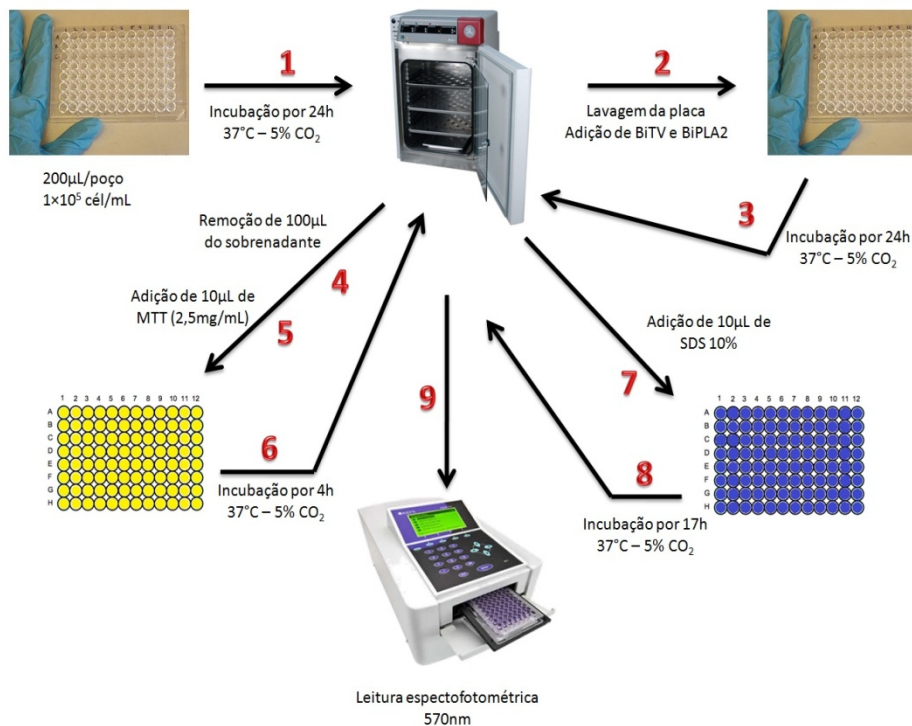


Figura 13. Ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT.

4.4.1.1.2 Análise estatística

Os dados foram expressos como percentagem de viabilidade celular *versus* concentração do veneno. Foi determinada a IC₅₀ (concentração inibitória média capaz de diminuir a viabilidade celular a 50%) a partir de uma curva de regressão não-linear utilizando o programa GnaPhPad Prism®, versão 5.01. Os dados (n = 5) foram comparados por ANOVA (seguida de pós-teste de Bonferroni) e teste t de Student, e a significância do teste estatístico foi considerada para p<0,05.

4.4.1.1.3 Estudo das alterações morfológicas em células MDCK

As células MDCK mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ expostas 24 horas a diferentes concentrações (1/2 IC₅₀; IC₅₀; 2x IC₅₀; 4x IC₅₀; 8x IC₅₀) do veneno total da *B.insularis* foram observadas em microscópio de inversão.

4.4.1.2 Ensaio da liberação de Lactato Desidrogenase (LDH)

O teste do LDH (lactato desidrogenase) permite avaliar a integridade da membrana plasmática no processo de morte celular. O ensaio baseia-se na redução de NAD a NADH pela LDH (enzima citosólica libertada para o meio extracelular quando a integridade membranar é afetada). Posteriormente, o NADH é usado na conversão de um substrato num produto corado, analisado por espectrofotometria UV/visível. Assim, quanto maior a liberação da enzima, e conseqüentemente a perda de integridade de membrana, maior o sinal espectrofotométrico. Na ausência de dano à membrana, não ocorre significativa liberação de LDH, não ocorrendo reação (LEGRAND *et al.*,1992).

4.4.1.2.1 Protocolo experimental

O tratamento das células MDCK com BiVT e BiPLA₂ (200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL) foi realizado em placas de 96 poços por 24 horas, e, em seguida, 50 µL de sobrenadante foi removido e adicionado a 100 µL da mistura reativa para determinação da liberação de LDH utilizando o kit TOX 7 (Sigma Aldrich,St.Louis,USA). Resumidamente, as amostras foram tratadas com 100 µL da mistura reacional por 30 minutos em temperatura ambiente sob proteção da luz. Por fim, 15µL de HCL 1N foi adicionado para cessar a reação, e a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 490nm foi utilizada para o cálculo da atividade enzimática (ANDRADE, 2007). A porcentagem de liberação de LDH dos grupos testados foi determinada em comparação à do grupo controle, assumindo-se que as células tratadas apenas com PBS não levaram à liberação significativa de enzima.

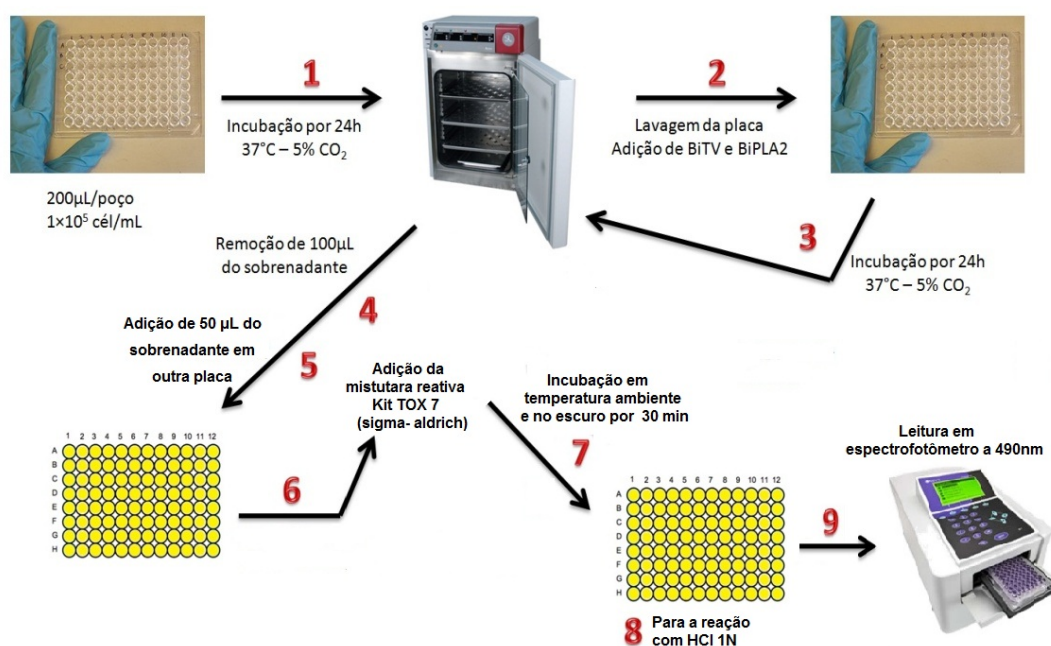


Figura 14. Ensaio de integridade de membrana pelo método da detecção da enzima Lactato desidrogenase.

4.4.1.2.2 Análise estatística

Os dados foram expressos em porcentagem de liberação de LDH \pm EPM (n=5). Os dados foram comparados por ANOVA seguida do teste de Bonferroni, utilizando o programa GraphPad Prism®. Os dados (n = 5) foram comparados por ANOVA (seguida de pós-teste de Bonferroni) e teste t de Student, e a significância do teste estatístico foi considerada para $p < 0,05$.

4.5 Avaliação do tipo de morte celular

A avaliação do tipo de morte celular induzido pelas substâncias em estudo foi realizada pela determinação de características celulares indicativas de morte por necrose ou apoptose.

A citometria de fluxo é uma metodologia usada para o estudo dos eventos celulares, pois uma das características deste instrumento é a manutenção das condições vitais da célula após sua manipulação, permitindo investigações mais aprofundadas do comportamento biológico da população em estudo, inclusive de avaliação funcional. No citômetro as células são individualmente conduzidas em canal de corrente fluida que, ao interceptarem o feixe de luz geralmente proveniente de um *laser*, causam sua dispersão em várias direções, dependendo do tamanho, da estrutura interna, das características topográficas e de densidade

óptica de cada célula (Macey, 1994), as quais estão diretamente correlacionadas com a morfologia celular, que pode ser apreciada em preparados corados com diferentes fluorocromos. Nesse contexto, o feixe de luz que passa pela partícula com um mínimo de desvio está relacionada com o tamanho celular (forward light scatter - FSC), enquanto aqueles que captam o desvio ortogonal aos eixos do fluído celular e do *laser* (*side light scatter* - SSC), que relacionados com a complexidade celular interna, em particular sua granularidade. Após análise simultânea desses parâmetros, gráficos de coordenadas x e y são, então, gerados (MACHADO-JÚNIOR *et al.*, 2006).

4.5.1 Detecção da externalização de fosfatidilserina e da perda de permeabilidade de membrana

Nesse estudo, a determinação da externalização de fosfatidilserina pelas células tratadas com BiVT (18, 36 e 72 $\mu\text{g/mL}$) foi realizada utilizando-se o ensaio de detecção da anexina V com o kit BD Pharmingen™ Annexin V-FITC. A anexina V tem a capacidade de se ligar fortemente aos fosfolipídios de membrana plasmática, através de suas cargas negativas, na presença de íons cálcio. Esse marcador pode ser conjugado com fluorocromos como o FITC, servindo como uma sonda sensível para análises por citometria de fluxo das células que expressam a fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática. A externalização de fosfatidilserina é um evento precoce de células que entram em apoptose, exercendo sinalização para a fagocitose por macrófagos e outras células inflamatórias (DE LIMA, 2005).

Paralelamente, foi realizada a análise da perda de permeabilidade de membrana pela incubação dos grupos experimentais com iodeto de propídio (IP), um marcador de DNA impermeável à membrana plasmática íntegra, marcando, portanto apenas as células que apresentam perda de permeabilidade de membrana. Essa alteração é uma importante característica de células necróticas. O corante iodeto de propídeo liga-se ao DNA e emite alta fluorescência quando excitado pelo laser. As células viáveis apresentarão baixa fluorescência podendo distinguir as células em apoptose precoce (Anexina V-FITC positivas) das células em necrose (IP positivas). As células viáveis também são diferenciadas por serem FITC e IP negativas. No entanto, células em apoptose tardia coram-se com ambos FITC e IP devido ao estágio final de desintegração celular (BOERSMA *et al.*, 2005).

4.5.1.1 Protocolo experimental

As células MDCK foram tratadas com a BiTV nas de 72, 36 e 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após 24 horas do tratamento, o meio de cultura foi transferido para um tubo (5 mL) e centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos para coletar células em suspensão. As células aderidas à placa foram lavadas com PBS três vezes e tripsinizadas. As células obtidas foram adicionadas ao sobrenadante coletado e a mistura foi novamente centrifugada por 10 minutos a 4000 RPM. O pellet foi ressuspensão em 500 μL de tampão para detecção de apoptose e necrose. Foram retirados 100 μL dessa suspensão e colocados em frasco para citômetro. Em seguida, foi adicionado 5 μL de anexina V-FITC, iodeto de propídeo, ou ambos, em cada tubo, os quais ficaram em incubação por 15 minutos protegidos da luz. Por fim, foram adicionados 400 μL do tampão e os frascos foram levados para leitura em citômetro de fluxo (FACS, BD, New Jersey, USA) (DE LIMA, 2005). As culturas não tratadas foram utilizadas como controle negativo, e culturas tratadas com ciclofosfamida (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), um agente nitrogênico do grupo das oxazoforinas, utilizado como quimioterápico, extremamente citotóxico (PESTRONK, 2002), foram utilizadas como controle positivo na indução de apoptose.

Os dados foram obtidos por meio do software Cell Quest e os resultados foram analisados utilizando o software WinMDI.

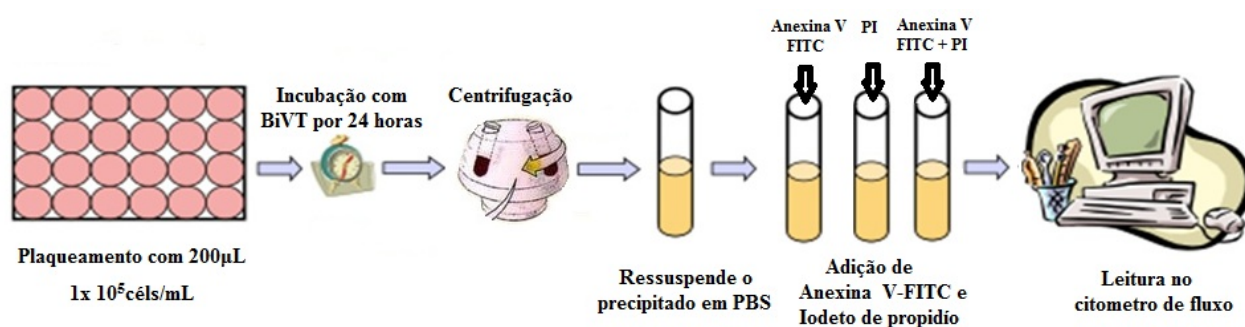


Figura 15. Ensaio de detecção da externalização de fosfatidilserina por citometria de fluxo, utilizando anexina V marcada com FITC e iodeto de propídeo (PI).

4.5.1.2 Análise estatística

Os dados ($n = 5$) foram comparados por ANOVA (seguida de pós-teste de Bonferroni) e teste t de Student, e a significância do teste estatístico foi considerada para $p < 0,05$.

4.5.2 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

A rodamina-123 (Rh-123) é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico (carregado positivamente) permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior dessas organelas, emitindo uma fluorescência verde. Alterações ao nível da integridade mitocondrial (potencial transmembrânico) podem ser detectadas em ensaios de citometria por meio do aumento da fluorescência verde citosólica, indiciando uma difusão da Rh-123 da mitocôndria para o citosol (JOHNSON *et al.*, 1980).

4.5.2.1 Protocolo experimental

As células MDCK, após 24 horas de tratamento com BiVT (36 µg/mL), teve seu meio de cultura transferido para um tubo (5 ml), sendo, posteriormente, centrifugado a 4000rpm por 10 minutos para coleta das células em suspensão. As células aderidas à placa foram lavadas com PBS três vezes, tripsinizadas e a suspensão obtida foi adicionada ao meio de cultura coletado inicialmente. As amostras foram centrifugadas novamente e o *pellet* foi ressuspenso em 500 µL de solução salina (PBS). Posteriormente, foi adicionado 5 µL da solução de Rodamina 123 (5 mg/mL) em etanol, sendo incubadas por 15 min a 37 °C. Por fim os tubos foram levados ao citômetro de fluxo para leitura (515-530 nm) (DE LIMA, 2005). As culturas não tratadas foram utilizadas como controle negativo, e o controle positivo para apoptose utilizou culturas tratadas com doxorrubicina (3,12µg/mL), um agente antineoplásico altamente ativo (antibiótico da família das antraciclinas) envolvido na formação de radicais livres, indução de dano ao DNA, inibição da proliferação celular, deterioração da mitocôndria, efeitos citotóxicos e morte celular (KIM *et al.*, 2009),

Os dados foram obtidos através do software Cell Quest e os resultados foram analisados por meio do software WinMDI.



Figura 16. Ensaio de detecção do potencial transmembrânico por citometria de fluxo, utilizando anexina V marcada com FITC e iodeto de propídio (PI).

4.5.2.2 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata, e os dados foram analisados pelo método estatístico de Kolmogorov-Sminov, e a significância do teste estatístico foi considerada para $p \leq 0,001$.

4.6 Ensaio para avaliação de expressão gênica

4.6.1 Reação de transcriptase reversa.

Com a finalidade de analisar a expressão gênica de alguns dos marcadores apoptóticos e anti-apoptóticos envolvidos nos efeitos causados pelo veneno da serpente *Bothropoides insularis* nas células renais MDCK, o RNA total foi extraído através do RNeasy mini kit (Qiagen, USA) e depois transformado em DNA complementar (cDNA) através da reação de Transcriptase Reversa. Para tanto, utilizou-se o kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase System (Qiagen, USA).

4.6.2 Reação de polimerase de cadeia em tempo real (qPCR).

Analisou-se a expressão de genes pró-apoptóticos (Caspase -3 e -8) utilizando o equipamento iQ5 Real Time PCR Detection System (Bio Rad). Esta tecnologia é baseada na detecção em tempo real da amplificação de uma amostra de DNA ou cDNA pela técnica de Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (RT-PCR). Por meio dessa tecnologia, é possível quantificar as amostras de cDNA na fase exponencial da cinética de amplificação. Isso será possível com a utilização da detecção da quantidade de fluorescência de SYBR Green, corante específico que se liga a um produto de dupla fita de DNA. Os iniciadores de

DNA (*primers*) utilizados foram desenhados com base nas sequências de RNA mensageiro dos genes investigados acima. A descrição da sequência nucleotídica dos genes de interesse foi obtida no sítio eletrônico do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Todas as reações de RT-PCR foram realizadas num volume total de 25 µL contendo 12,5 µL de iQ Supermix (solução padrão de amplificação contendo tampão salino, uma mistura de desoxinucleotídeos, magnésio, enzima amplificadora Taq-Polimerase e marcador fluorescente SYBR Green), 200 µL dos iniciadores e 2 µL de cDNA das amostras. Amostras negativas foram também testadas, onde o cDNA era substituído por água mili-Q estéril. As condições do ensaio de PCR foram estabelecidas da seguinte forma: um período de desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos seguidos de 40 ciclos para as reações de amplificação dos genes testes descritos acima. Cada ciclo foi realizado com uma fase de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, uma fase de anelamento a 60 °C por 30 segundos, e uma fase de extensão da cadeia de DNA a 72 °C por 1 minuto. Ao final dos ciclos, submetemos as amostras a uma extensão final na temperatura de 72°C por 3 minutos. Com o intuito de analisar a especificidade das amplificações, foi realizada, após cada reação, uma curva de fusão (*Melting Curve*), onde a temperatura da reação era acrescida em 1°C a cada 20 segundos, iniciando a partir das temperaturas de anelamento de cada iniciador e terminando a 95°C. Os dados obtidos pelo iQ5 Optical System Software (versão 2.0) foram baseados no valor do ciclo limiar (TC – Threshold Cycle), ou ciclo de amplificação, em que a quantidade de fluorescência observada é 10 vezes maior que a fluorescência inicial ou basal de cada reação de PCR. Quanto maior a expressão do gene testado menor o número de ciclos para que a fluorescência atinja o patamar de 10 x maior que a fluorescência basal. A avaliação da expressão gênica foi obtida utilizando o método matemático descrito por PFAFFL (2001).

4.6.3 Procedimento experimental

Para os ensaios de avaliação da expressão gênica, BiVT foi adicionado nas concentrações de 9 e 4,5 µg/mL à cultura de células MDCK em placas de 24 poços. Após 24 horas, as células foram deslocadas dos poços por meio da exposição à tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v), centrifugadas por 10 minutos a 4000 RPM, e o sobrenadante foi descartado. Para cada concentração da substância-teste foram obtidos seis precipitados, os quais foram misturados para obter-se apenas uma amostra de cada concentração. O experimento teve sequência com os procedimentos de isolamento de RNA total utilizando o kit RNeasy Mini

(Qiagen) e automação pelo equipamento Qiacube. Culturas tratadas com doxorubicina (3,12 μ g/mL) foram utilizadas como controle positivo na expressão dos genes em estudo. Foram realizados três experimentos independentes (n = 3), porém nas mesmas condições.

Para o Isolamento de RNA total adicionou-se ao precipitado de células o volume de 350 μ L do tampão de lise contendo B-mercaptoetanol. As células foram lisadas quando submetidas ao êmbolo de agulha hipodérmica (13x4,5cm). A solução com as células lisadas foi centrifugada a 14.000 x g por 3 minutos e o sobrenadante foi aplicado a um tubo eppendorf de 2,0 ml que foi aplicado ao equipamento QiaCube (Qiagen). A partir de então todo o isolamento foi realizado automaticamente, seguindo o protocolo descrito pelo kit e programado ao equipamento.

4.6.4 Análise estatística

Os dados (n = 5) foram comparados por teste t de Student, e a significância do teste estatístico foi considerada para $p < 0,05$.



RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Ensaios de viabilidade e proliferação celular

5.1.1 Ensaio de redução do MTT

Neste trabalho, a viabilidade das culturas MDCK ($1,0 \times 10^5$ céls./mL) tratadas com veneno total de *Bothropoides insularis* em diferentes concentrações (200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$) foram analisadas pelo método MTT após 24 horas de incubação. O veneno apresentou efeito citotóxico caracterizado pela redução significativa da viabilidade celular (**Figura 17 e Tabela 2**) em todas as concentrações estudadas quando comparadas ao grupo controle ($\text{IC}_{50} = 9 \mu\text{g/mL}$). O veneno total também apresentou visíveis alterações morfológicas, tais como agrupamento celular e citoplasma granuloso (**Figura 18**). Em contraste, nos experimentos realizados com a fração fosfolipase A_2 isolada do veneno da *B. insularis*, não foi observada redução da viabilidade celular em nenhuma das concentrações estudadas (200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$) quando comparadas com o grupo controle.

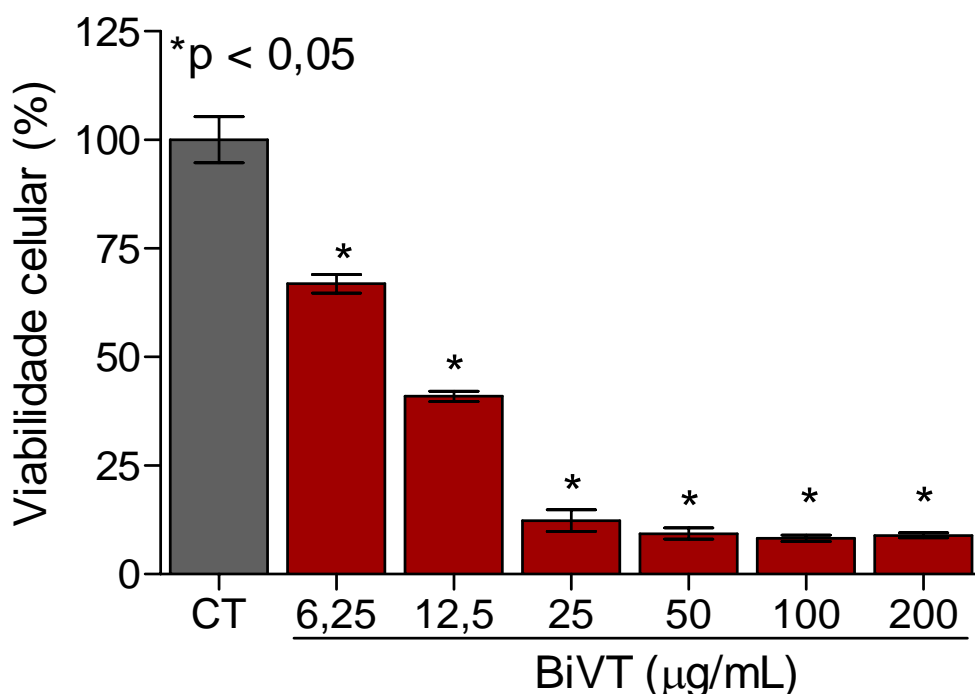


Figura 17. Efeito citotóxico do veneno total da serpente *Bothropoides insularis* (200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$) sobre células MDCK, pelo método do MTT. Dados expressos como média \pm EPM ($n=5$) e analisado por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student, $*p < 0,05$.

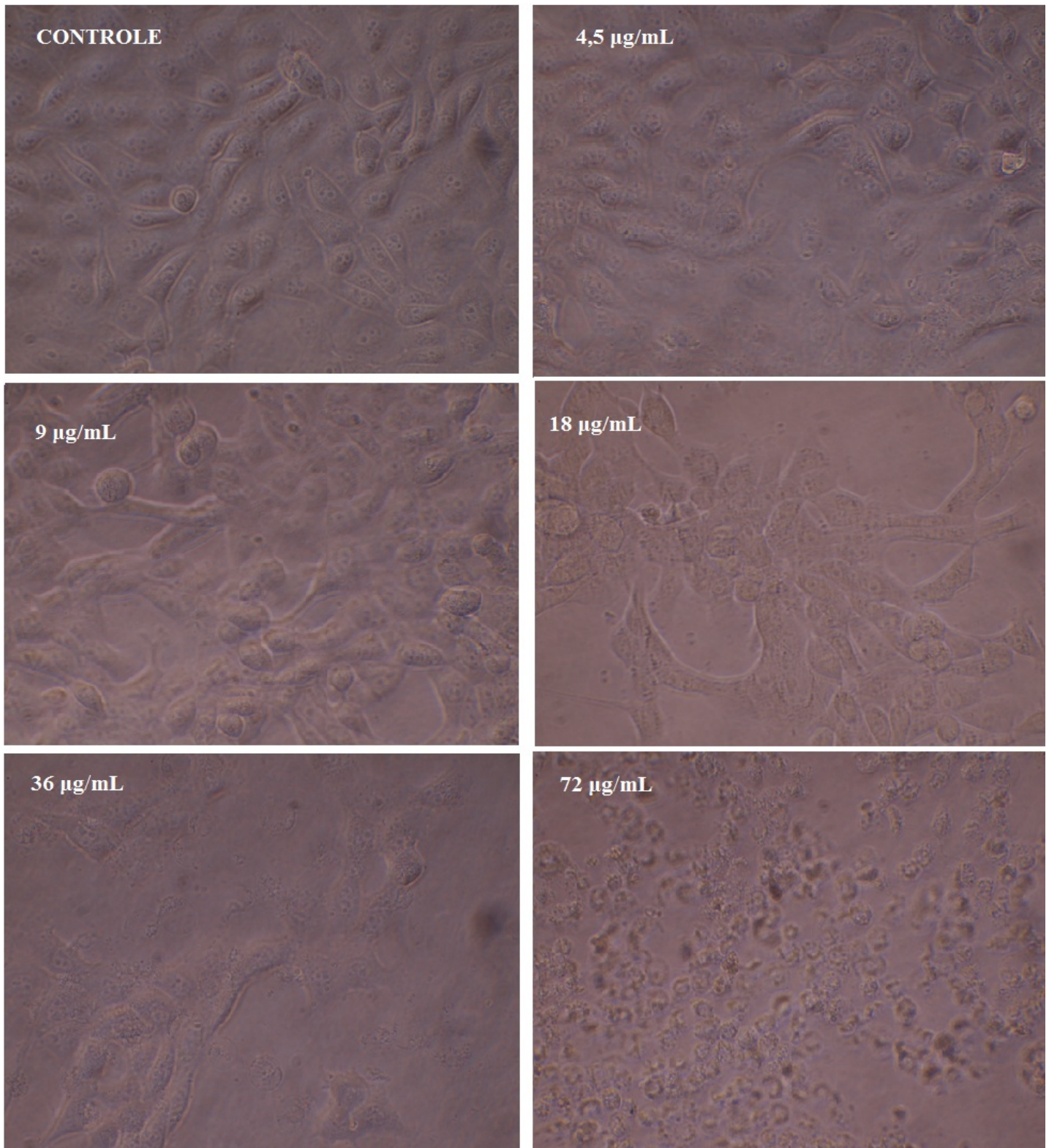


Figura 18. Fotomicrografia das células tubulares renais MDCK em microscópio invertido, após exposição com diferentes concentrações ($1/2$ IC_{50} ; IC_{50} ; $2x$ IC_{50} ; $4x$ IC_{50} ; $8x$ IC_{50}) do veneno total da *B. insularis*, com visíveis alterações morfológicas, tais como agregados celulares e citoplasma granuloso.

Tabela 2. Efeito do veneno total (BiVT) e fração fosfolipase A₂ (BiPLA₂) da serpente *Bothropoides insularis* sobre a viabilidade de células tubulares renais MDCK em diferentes concentrações.

Concentração (µg/mL)	VT <i>B. insularis</i>	BiPLA ₂ <i>B. insularis</i>
Controle	100,0 ± 5,32	98,84 ± 1,19
200	08,94 ± 0,57*	101,0 ± 1,36
100	08,25 ± 0,71*	102,4 ± 0,34
50	09,35 ± 1,32*	102,5 ± 1,60
25	12,32 ± 2,51*	102,5 ± 1,17
12,5	40,97 ± 1,18*	102,4 ± 0,52
6,25	66,90 ± 2,14*	102,1 ± 0,28

Valores expressos em média ± E.P.M. p<0,05

5.1.2 Ensaio de liberação de LDH

A integridade de membrana celular no processo de morte foi avaliada pelo método de determinação da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH), em culturas de células tubulares renais (MDCK), tratadas com BiVT e BiPLA₂ em diferentes concentrações (200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL) por 24 horas. BiVT apresentou liberação da enzima LDH em todas as concentrações estudadas quando comparadas ao grupo controle (**Figura 19**).

Nos experimentos realizados com BiPLA₂, não foi observada nenhuma liberação significativa da enzima LDH nas concentrações estudadas quando comparadas com o grupo controle.

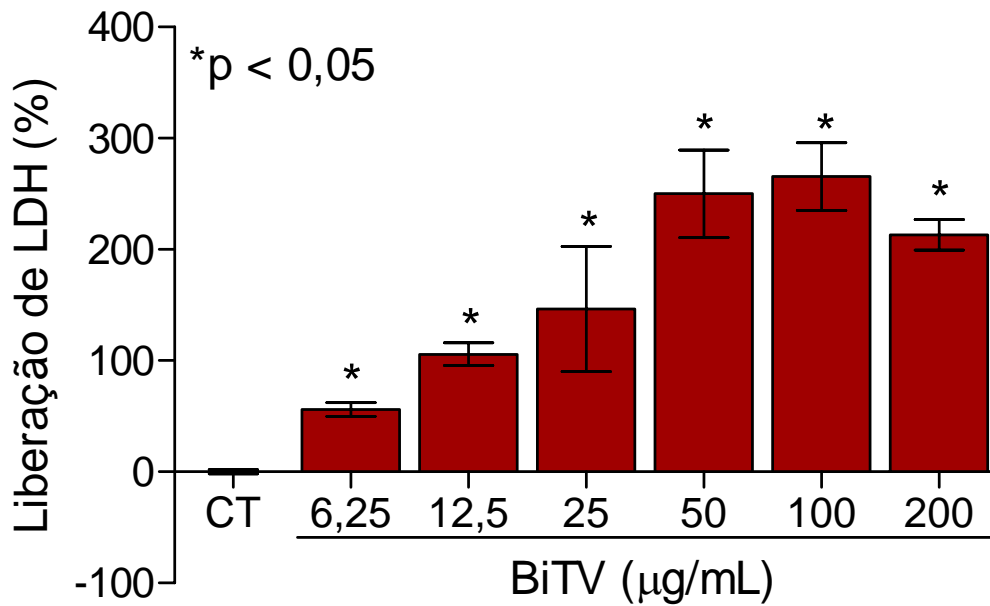


Figura 19. Porcentagem de liberação da enzima Lactato Desidrogenase de células MDCK induzida pelo veneno total da serpente *Bothropoides insularis* (200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL). Dados expressos como média ± E.P.M (n=5) e analisado por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student, *p < 0,05.

5.2 Avaliação do tipo de morte celular

Como o veneno total de *Bothropoides insularis* apresentou diminuição da viabilidade celular pelos métodos de redução do MTT e liberação de LDH, essa substância foi estudada quanto ao tipo de morte celular, nas concentrações acima da IC₅₀, que apresentaram um maior potencial de citotoxicidade.

5.2.1 Detecção da externalização de fosfatidilserina e da perda de permeabilidade de membrana

Para determinar as alterações induzidas por BiVT nas células MDCK, foi realizada a detecção da externalização de fosfatidilserina e da perda de permeabilidade de membrana por citometria de fluxo (FACS) utilizando Anexina V-FITC e iodeto de propídeo (PI) como marcadores.

Foi observado que a maior parte das células tratadas com BiVT foi marcada unicamente por Anexina V-FITC em baixas concentrações (18 e 36 $\mu\text{g/mL}$) (**Figura 20, Figura 21A**). Observou-se que a percentagem de células marcadas com anexina V diminuiu com o aumento da concentração do veneno estudada (72 $\mu\text{g/mL}$) (**Figura 20, Figura 21B**). Observa-se uma alta percentagem de células marcadas com iodeto de propídeo, caracterizando células com perda de permeabilidade de membrana (**Figura 20, Figura 21B**). Em altas concentrações, também foi observada uma marcação dupla de Anexina V-FITC e PI, representando evidências de um processo de morte celular por apoptose incompleto que culminou em necrose (**Figura 20, Figura 21C**). Na figura 20C, observa-se que a percentagem de células marcadas duplamente foi significativamente maior na maior concentração testada (72 $\mu\text{g/mL}$).

As culturas não tratadas foram utilizadas como controle negativo, e culturas tratadas com ciclofosfamida (200 $\mu\text{g/mL}$) utilizadas como controle positivo na indução de apoptose.

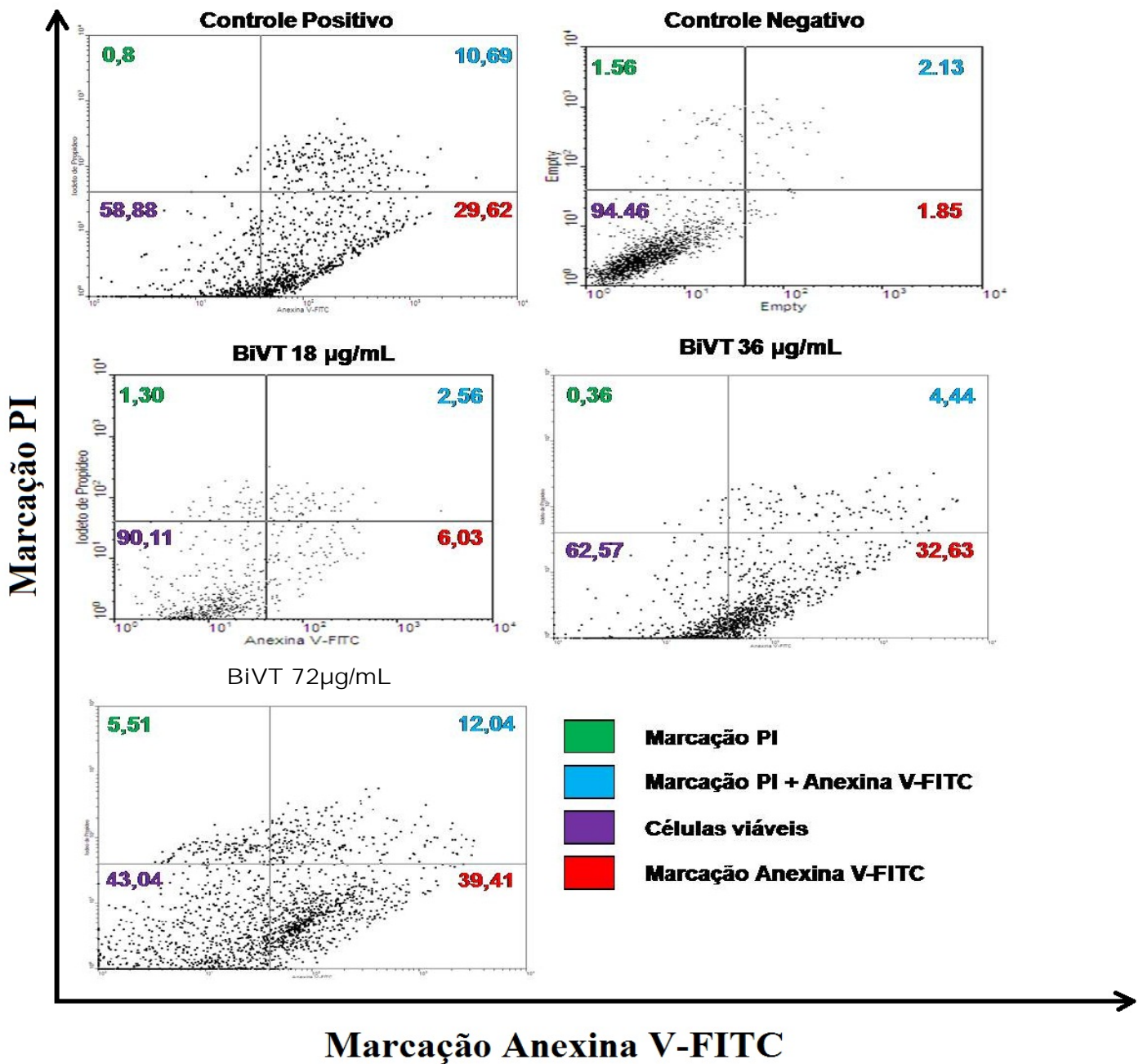


Figura 20. Avaliação do potencial apoptótico do veneno da serpente *Bothropoides insularis* sobre células MDCK. Representação da marcação simultânea de Anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI). Quadrante inferior esquerdo: células viáveis (não-marcadas); quadrante inferior direito: células marcadas com Anexina V; quadrante superior esquerdo: células marcadas apenas com PI; quadrante superior direito: células marcadas duplamente com PI e Anexina V-FITC. Controle positivo foi tratado com ciclofosfamida 200µg/mL.

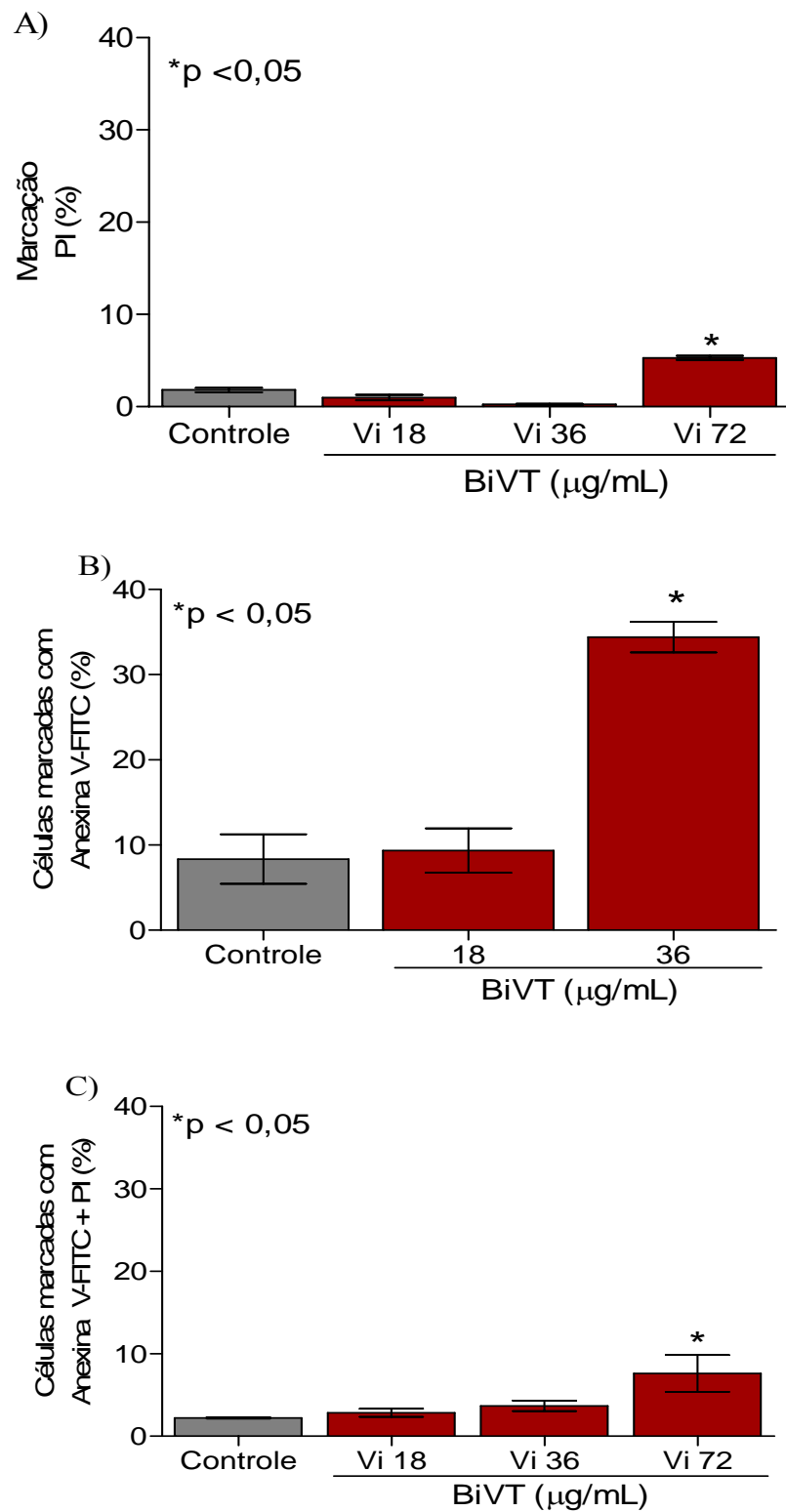


Figura 21. A) Porcentagem de marcação das células MDCK com Iodeto de propídio. B) Porcentagem de marcação de células marcadas com Anexina V-FITC. C) Porcentagem de células marcadas com Anexina V-FITC + PI. Os dados foram expressos como média + E.P.M. (n=5) e analisado por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e Teste t de Student, * $p < 0,05$.

5.2.2 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

Nesse ensaio, as células foram incubadas com rodamina 123 (Rho 123), corante fluorescente específico que se acumula especificamente no espaço intermembrana mitocondrial de células viáveis. Em células apresentando redução do potencial de membrana mitocondrial, que é uma característica indicativa da ocorrência de apoptose pela via intrínseca, ocorre uma redução do acúmulo de Rho 123, havendo uma emissão menor de fluorescência na organela.

A análise do potencial de membrana mitocondrial foi avaliada em citometria de fluxo, com as células MDCK tratadas com BiVT na concentração de 36 µg/mL. A **figura 22 A** mostra as células do grupo controle negativo, tratadas com PBS. BiVT causou uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial das células MDCK, observado pelo deslocamento da curva de histograma para a esquerda (**Figura 22 B**). Além disso, as células MDCK apresentaram-se com tamanho reduzido aumento da granulosidade, quando em comparação com o grupo controle. A **figura 22 C** demonstra as células do grupo controle positivo tratadas com 3,12µg/mL de doxorubicina.

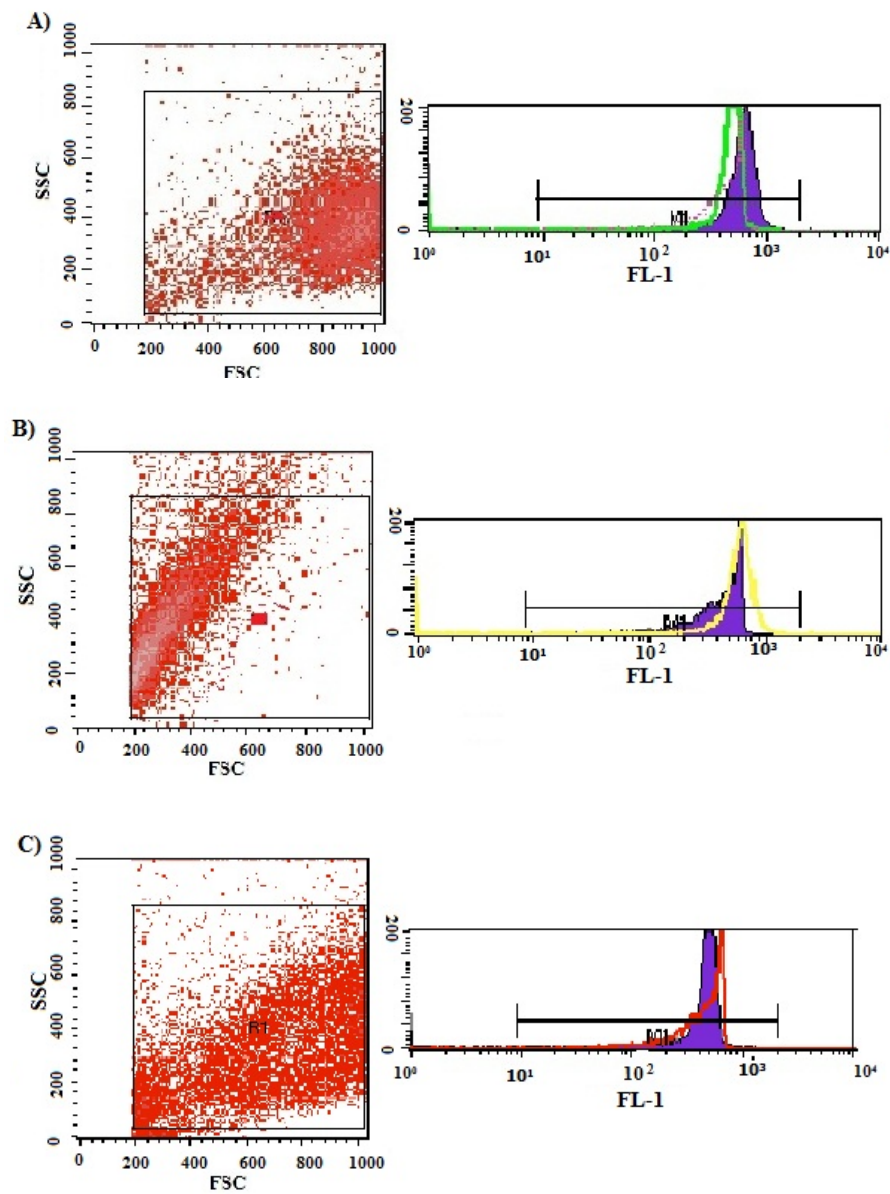


Figura 22. Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial em células MDCK tratadas com veneno da serpente *Bothropoides insularis*. À esquerda: Características de tamanho (FSC) e de complexidade interna ou granulosidade (SSC) dos diferentes grupos experimentais; à direita: Representação da emissão de fluorescência dos diferentes grupos experimentais. A) Grupo controle negativo (células tratadas com PBS). B) Grupo tratado com 36 µg/mL de veneno de *Bothropoides insularis*. C) Grupo controle positivo, tratado com doxorrubicina (3,12 µg/mL). A análise estatística dos dados qualitativos é feita segundo modelo estatístico de Kolmogorov-Smirnov.

5.3 Avaliação da expressão gênica

Tendo em vista os resultados acima apontando para a ocorrência de apoptose nas menores concentrações, avaliamos a expressão de genes envolvidos na morte celular por apoptose. Foi observada a expressão das caspases (caspase 3 e 8). Para tal finalidade as células MDCK foram tratadas com o veneno de *B. insularis* (4,5 e 9 $\mu\text{g/mL}$). Verificamos que em ambas as concentrações avaliadas não houve expressão significativa para nenhuma das caspases em estudo quando comparada ao grupo controle (**Figura 23 e 24**).

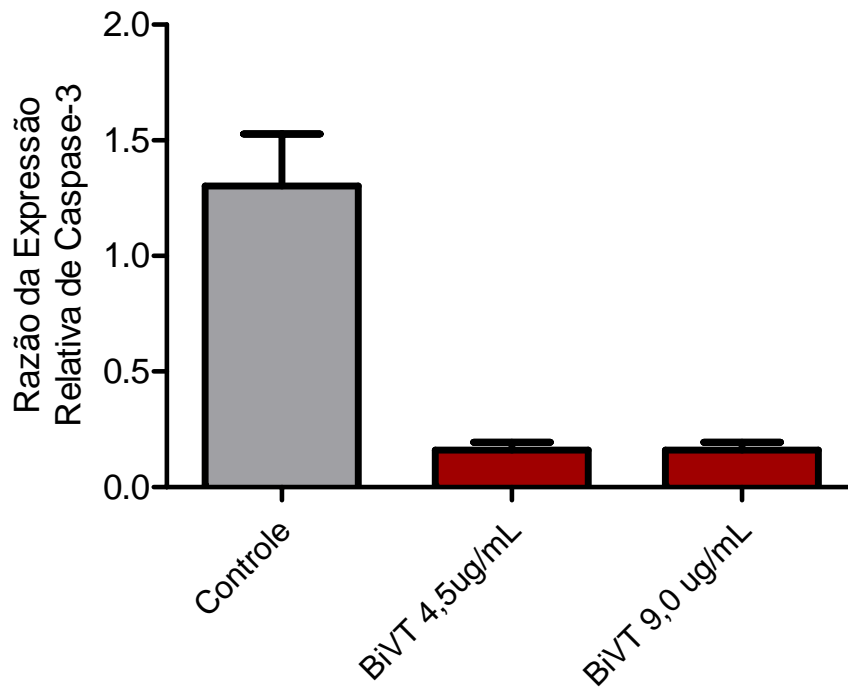


Figura 23. Efeito do veneno total da serpente *Bothropoides insularis* sobre a expressão relativa da caspase - 3 em células MDCK em 24 horas. O grupo controle positivo foi tratado com doxorubicina (3,12 $\mu\text{g/mL}$).

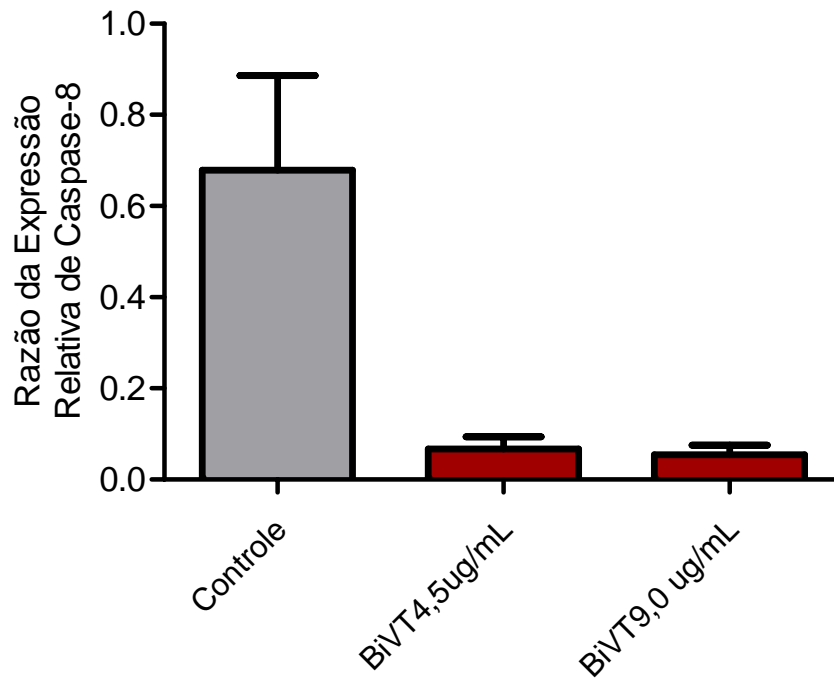


Figura 24. Efeito do veneno total da serpente *Bothropoides insularis* sobre a expressão relativa da caspase - 8 em células MDCK em 24 horas. O grupo controle positivo foi tratado com doxorrubicina (3,12 $\mu\text{g/mL}$).



DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os rins são órgãos importantes para manutenção do equilíbrio corporal, possuem diferentes regiões anatômicas compostas por células de características distintas. Os ensaios com culturas celulares podem promover um maior entendimento da toxicidade de diferentes compostos (OLIVEIRA, *et al.*, 2002). Em relação à pesquisa com venenos de serpentes, particularmente os estudos de nefrotoxicidade, os ensaios com cultura celular permitem que seja avaliado um possível efeito tóxico direto em um curto período de tempo (GIRÓN *et al.*, 2005). A linhagem de células MDCK, células epiteliais renais do túbulo distal, representam um tipo celular muito bem caracterizado em termos de propriedades funcionais e composição molecular (COLLARES-BUZATO *et al.*, 1994; 1998; PEIXOTO, 2003).

A Insuficiência Renal Aguda descrita por vários autores (RIBEIRO *et al.*, 1998; AIRD, 2002) é a causa principal de mortes nos acidentes ofídicos (CASTRO, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2008), mesmo após o tratamento com soro antiofídico. Embora numerosos estudos tenham avaliado os efeitos renais dos venenos de *Bothrops*, o mecanismo molecular preciso permanece obscuro.

O veneno da *Bothropoides insularis* apresenta uma maior toxicidade clínica quando comparado com outras espécies dos gêneros *Bothrops* e *Bothropoides*. No entanto, a toxilogia desse veneno ainda é pouco compreendida (LIRA *et al.*, 2009; OLIVEIRA-CARVALHO *et al.*, 2009). O quadro clínico do envenenamento por *B. insularis* apresenta manifestações semelhantes às aquelas apresentadas por outras serpentes do gênero *Bothrops* (Barbosa *et al.*, 2003), incluindo importantes efeitos locais como edema, necrose tecidual, atividade coagulante, hemorrágica, bem como comprometimentos sistêmicos, dentre os quais se destaca a insuficiência renal aguda (VALENTE *et al.*, 2009).

Braga (2006) demonstrou em seus estudos que o veneno total da *B. insularis* causou lesão tubular e alterações dos parâmetros fisiológicas renais, como redução do transporte tubular de eletrólitos e clearance osmótico. Tendo em vista todos os eventos envolvidos no processo de injúria renal estudados por Braga (2006), estudou-se nesse trabalho a ação citotóxica *in vitro* do veneno total da serpente *Bothropoides insularis* e sua fração PLA₂ na tentativa de elucidar o mecanismo envolvido no processo de nefrotoxicidade.

Avaliamos o potencial citotóxico do veneno utilizando cultura de células tubulares renais (MDCK), que constituem uma linhagem de células bem estabelecida, com características morfológicas e funcionais semelhantes às células do túbulo coletor e/ou distal

de mamíferos, constituindo um excelente modelo para avaliação de citotoxicidade *in vitro* (COLLARES-BUZATO; CRUZ-HÖFLING; SUEUR, 2002).

Para avaliação da atividade citotóxica do veneno sobre as células em estudo, foi utilizado o método de redução do MTT. Essa técnica tem sido usada para verificar a viabilidade celular através da avaliação de sua capacidade metabólica (MOSMAN *et al.*, 1983). Os resultados demonstraram que o veneno apresenta elevado efeito citotóxico, caracterizado pela redução significativa da viabilidade celular em todas as concentrações estudadas quando comparado ao grupo controle.

Os resultados indicaram que o veneno de *B. insularis* é citotóxico para a cultura de células tubulares MDCK, estando de acordo com os resultados de Braga *et al.* (2006), onde foi demonstrado, através de ensaios de perfusão em rim isolado de rato, o aparecimento de alterações fisiológicas e histológicas indicativas de dano tubular.

Vários autores concordam que a ação proteolítica dos venenos botrópicos tem um importante papel citotóxico em vários tipos celulares (DAMICO, 2007; GUTIERREZ; LOMONTE, 1995). Estudos prévios demonstraram que o veneno de *Bothropoides insularis* apresenta uma intensa atividade proteolítica (BARBOSA *et al.*, 2003; VALENTE *et al.*, 2009), podendo desta forma, provocar efeitos deletérios no epitélio tubular renal. Isso poderia também ocasionar a perda da função de transporte das células epiteliais renais, diminuindo dessa forma o transporte de eletrólitos.

Como citado anteriormente, o veneno de *B. insularis* apresenta em sua composição grande concentração de metaloproteinases, que, em muitos casos, estão envolvidas no efeito citotóxico de venenos botrópicos, através de proteólise da matriz extracelular, interrupção da adesão célula-matriz e indução de apoptose em linhagens de células endoteliais (FOX; SERRANO, 2005). A metaloproteinase do veneno de *B. asper*, em estudo realizado por Brenes *et al.* (2010), apresentou potencial apoptótico sobre células endoteliais e tumorais, além do aparecimento de alterações celulares indicativas de tipos alternativos de morte celular, como autofagia e *anoikis*. O efeito citotóxico sobre células MDCK é também verificado na peçonha de *B. moojeni* (COLLARES-BUZATO *et al.*, 2002), da qual já foram isoladas diferentes frações com atividade metaloproteinase, que podem estar envolvidas nesse efeito citotóxico (GOMES *et al.*, 2009; AKAO *et al.*, 2010, 2011).

Nascimento *et al.* (2007) avaliaram a citotoxicidade da peçonha de *Bothrops alternatus* em células MDCK e também verificaram redução da viabilidade celular. Ao estudarem o mecanismo de morte celular, verificaram que a peçonha induziu morte

predominantemente por necrose e possivelmente através da ação das espécies reativas de oxigênio.

A citotoxicidade de venenos botrópicos foi também demonstrada em outras linhagens celulares, observado em estudos feito por Jorge *et al.*, (2011), onde o veneno da *B. pauloensis*, *B. diporus* e *B. pirajai* apresentam atividade citotóxica em células tumorais, sendo o mecanismo citotóxico relacionado tanto a necrose como apoptose.

No presente trabalho a PLA₂ isolada do veneno de *B. insularis* não causou nenhuma redução na viabilidade das células MDCK nas concentrações estudadas quando avaliadas pelo método do MTT, indicando a ausência de efeito citotóxico direto dessa substância sobre essa linhagem celular. Estudos realizados por Braga (2006, 2008), demonstraram que rins de rato perfundidos com essa fração causaram elevação dos parâmetros vasculares e funcionais renais, com alterações do transporte tubular de eletrólitos e focos de lesão tubular aguda. Isso pode ser devido à ocorrência de efeito nefrotóxico indireto, a partir da ação sobre células endoteliais e mesangiais, induzindo a liberação de mediadores inflamatórios, como metabólitos do ácido araquidônico e citocinas como interleucinas e fator de necrose tumoral (Pinto, 1998). Diversos estudos relatam a ação inflamatória de PLA₂ derivadas de venenos de serpente, com estímulo da liberação de IL-1 e TNF por macrófagos (Teixeira *et al.*, 2009). Essa ação seria dependente ou não da atividade catalítica dessas enzimas.

A resposta à injúria de células tubulointersticiais em muitas formas de doença renal incluem alteração no número celular (alteração na relação morte/proliferação celular) e hipertrofia (SHANKLAND; WOLF, 2000). Diferentes padrões de morte celular podem estar envolvidos no processo de citotoxicidade induzida por venenos. O conhecimento do mecanismo citotóxico dessas substâncias é de grande importância no entendimento da fisiopatologia dos acidentes ofídicos e de suas complicações sistêmicas. A elucidação desses mecanismos permite a interferência em alguns pontos de suas vias de sinalização e auxilia o desenvolvimento de fármacos e estratégias terapêuticas mais eficazes (GARCIA; LEWIS, 2003).

O papel da apoptose está bem definido no desenvolvimento renal normal; entretanto, sua participação na insuficiência renal aguda (IRA) não está totalmente esclarecida. Existe forte evidência, baseada em achados moleculares, que apontam a importância da apoptose na patogênese da IRA (Basile *et al.*, 1997).

A apoptose, conhecida como morte celular programada, é caracterizada como uma resposta celular que não envolve uma resposta inflamatória associada. As células envolvidas

nesse processo apresentam características morfológicas e funcionais específicas, como fragmentação de DNA, perda de potencial transmembrânico mitocondrial, externalização de fosfatidilserina, perda de permeabilidade de membrana, entre outros (LEYTIN, 2011). Essas características são amplamente utilizadas na avaliação do tipo de morte celular envolvida em diversas condições fisiológicas e patológicas.

Para determinação do mecanismo de citotoxicidade do veneno de *B. insularis* sobre células MDCK, algumas dessas características foram avaliadas por citometria de fluxo. A citometria de fluxo é um método de análise de partículas, as quais passam individualmente por um feixe de luz, permitindo a verificação de diversos parâmetros, tanto morfológicos quanto funcionais, a partir da ocorrência de dispersão da luz e emissão de fluorescência de comprimento de onda específico.

Para avaliação da externalização de fosfatidilserina pela membrana celular, as células tratadas com a substância em estudo foram incubadas com Anexina V marcada com FITC. Quando o sinal de morte celular ocorre, a fosfatidilserina é translocada para a face externa da membrana. A exposição da fosfatidilserina parece começar durante as fases precoces da apoptose – enquanto a membrana celular continua intacta – até os estágios finais, nos quais a célula se fragmenta, formando os corpos apoptóticos (ENGELAND *et al.*, 1998). Dessa forma, a externalização da fosfatidilserina e a ligação de anexina V são evidências de apoptose (MOCHIZUKI *et al.*, 2004). A fosfatidilserina no folheto externo na membrana plasmática exerce a sinalização para a fagocitose, impedindo a lise celular e a liberação de antígenos intracelulares, evitando uma resposta inflamatória.

Adicionalmente, as células foram submetidas à marcação com iodeto de propídio (PI) isoladamente ou em conjunto com a Anexina V-FITC. O PI é um corante vital que se liga ao DNA das células, mas não é capaz de penetrar em membranas celulares íntegras. O aparecimento de células marcadas unicamente com PI é indicativo de necrose, haja vista que nesse processo ocorre perda da integridade de membrana. No entanto, células em apoptose tardia são marcadas por anexina V e PI, estando no estágio final de desintegração celular.

O presente estudo demonstra que o veneno de *B. insularis* levou a uma marcação dependente de concentração. Em concentrações mais baixas, observou-se que a maioria das células foi marcada quase unicamente com anexina V-FITC, demonstrando indícios de processo apoptótico. No entanto, na maior concentração estudada, foi encontrada uma maior marcação dupla de anexina V-FITC e PI, indicando que grande parte das células desse grupo encontra-se em apoptose tardia. Adicionalmente, essa concentração também apresenta grande número de células marcadas unicamente com PI, sugerindo que o veneno em altas

concentrações pode levar à perda de integridade de membrana, processo sugestivo de morte por necrose.

Diversos trabalhos demonstram que o tipo de morte celular está diretamente relacionado à intensidade e ao tempo do estímulo. O início do processo necrótico pode depender da concentração do composto usado e da duração do tratamento, considerando que a indução de necrose é uma resposta tardia relativa ao acontecimento da apoptose. Assim eventos intracelulares que levam a apoptose e necrose podem ocorrer seqüencialmente, onde numa concentração relativamente baixa do composto pode ocorrer colapso do potencial de membrana mitocondrial e posteriormente, usando uma maior concentração, ocorre rompimento de membrana plasmática, levando ao processo necrótico (ROY, 2006). Um exemplo é o efeito citotóxico da gentamicina sobre células tubulares proximais, onde foram observadas alterações indicativas de apoptose em baixas concentrações, enquanto altas concentrações promoveram necrose com ruptura de membrana (SERVAIS *et al.*, 2005).

Para avaliar a integridade de membrana no processo de morte celular, foi realizado o teste de citotoxicidade *in vitro* pela medida da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH). A liberação dessa enzima, normalmente localizada no citoplasma, é indicativa de ruptura da membrana celular.

A perda da integridade da membrana celular é característica de necrose, que envolve vários eventos que culminam numa resposta inflamatória à lesão, como clivagem de componentes celulares, quimioatração de células apresentadoras de antígenos e liberação de material citoplasmático. A detecção da liberação desses componentes, como a enzima LDH, pode prover informações importantes sobre o mecanismo de lesão celular (MCHUGH; TURINA, 2006).

No presente trabalho, foi verificada a liberação da enzima LDH nos grupos tratados com o veneno de *B. insularis*, sendo observado que as maiores porcentagens de liberação dessa enzima ocorrem a partir do grupo tratado na concentração de 50 µg/mL. Esse resultado pode caracterizar o aparecimento de células em apoptose tardia.

Collares-Buzato *et al.* (2002), ao estudarem a citotoxicidade do veneno de *Bothrops moojeni*, observaram que a peçonha induziu citotoxicidade nas células MDCK, com aumento da liberação de LDH, indicativo de morte celular por necrose, e comprometimento da interação célula-matriz. Por outro lado, estudos de Souza (2010), observaram que o veneno da *Bothropoides erythromelas*, induziu citotoxicidade em células MDCK, sem a liberação da enzima LDH, indicando que não houve ruptura da membrana celular. Como a perda da

integridade da membrana é acompanhada pelo aumento da liberação de LDH, sugerindo que a morte celular foi consequência de apoptose e não de necrose.

Krysko *et al.* (2008) afirmam que células apoptóticas que não são fagocitadas em tempo hábil podem apresentar diversas características de células necróticas, processo conhecido como apoptose tardia. Como o experimento em questão foi realizado utilizando células isoladas em cultivo, que, portanto, não estão na presença de fagócitos, pode-se inferir que a liberação de LDH pode ser devido à ocorrência desse processo. Esses dados corroboram com o resultado encontrado nos métodos de citometria de fluxo, onde foi encontrada uma marcação concomitante de anexina V e iodeto de propídio, em grupos tratados em faixa de concentração próxima àquela na qual foi visto a maior taxa de liberação de LDH.

A liberação da enzima LDH, também foi determinada nos grupos tratados com a PLA₂ extraída do veneno da *B. insularis* (Fração Asp 49). No entanto, não foi observada liberação significativa de LDH em relação ao grupo controle (não tratado), indicando que não houve ruptura da membrana celular. Esses resultados corroboram com os resultados do ensaio de MTT com a mesma fração, não sendo observada redução significativa na viabilidade celular de células tratadas com a PLA₂ da serpente *B. insularis* nas concentrações estudadas.

Souza (2010) observou em estudos feitos com a Fração PLA₂ (Fração Lys 49 e Asp 49) de *B. erythromelas*, que a fração Lys 49 apresentou liberação estatisticamente significativa de LDH sugerindo que a morte celular é consequência de necrose e não de apoptose. Enquanto, na fração Asp 49, não foi observada liberação estatisticamente significativa de LDH em relação ao grupo controle.

A literatura descreve duas vias distintas de indução de apoptose: via intrínseca (ou mitocondrial) e via extrínseca (ou citoplasmática). A primeira é induzida principalmente após a ocorrência de dano irreversível ao DNA celular, como um mecanismo de proteção ao aparecimento de mutações. A via citoplasmática tem como indução principal a redução drástica da síntese de ATP e ao aumento da concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

O estudo do efeito citotóxico de venenos de serpente também deve se voltar à elucidação da via de indução apoptótica envolvida, haja vista que esse conhecimento pode gerar informações importantes para desenvolvimento de estratégias terapêuticas que reduzam o dano renal causado pelo envenenamento botrópico.

A via mitocondrial (intrínseca) é frequentemente ativada em resposta a danos ao DNA, envolvendo a ativação de um membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (*Bax*, *Bid*), com envolvimento de alterações de permeabilidade de membrana mitocondrial e liberação do

citocromo c para o citosol, que se liga a Apaf-1 e pró-caspase-9, formando o complexo apoptossomo. A caspase-9 ativa (iniciadora) pode então clivar as caspases efetoras -3, -6 e -7 (SALVESSEN, 2002), resultando na mediação e amplificação dos sinais de morte celular e, eventualmente, na execução da morte celular com todas as características morfológicas e bioquímicas normalmente observadas na apoptose (DENAULT, 2002).

Um importante marcador de morte celular por apoptose (via intrínseca) é a diminuição do potencial de transmembrânico mitocondrial. O aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, que poder ser consequência de vários fatores, é considerado um indicador de dano mitocondrial e é geralmente definido como um estágio inicial de apoptose (SMAILI *et al.*, 2003). A citometria de fluxo pode ser usada para estimar o potencial transmembrânico em mitocôndrias isoladas e *in situ*, quando na presença de corantes catiônicos lipofílicos como a Rodamina 123 (Rho 123) (SHAPIRO 1988; 2000; BERNARDI *et al.*, 2001; FULLER & ARRIAGA, 2003).

A Rodamina 123 é um corante lipofílico catiônico fluorescente que se distribui no compartimento mitocondrial, emitindo fluorescência verde, medida na região de 530 nm, que é proporcional a quantidade absoluta de Rho123. Assim, a redução na fluorescência está relacionada com a despolarização, ou seja, a perda do potencial da membrana mitocondrial interna (LOPEZ-MEDIAVILLA *et al.*, 1989; HEIDEN, *et al.*, 1997; VERMES *et al.*, 2000; MEDINA *et al.*, 2002; SARIS, *et al.*, 2004; LECOUEUR, *et al.*, 2004).

Considerando o grupo tratado com 36 µg/mL de veneno de *B. insularis* foi o que apresentou maior porcentagem de marcação com Anexina V-FITC, esse foi o escolhido para avaliação do potencial de membrana mitocondrial pelo teste da Rho123. Como resultado, foi demonstrada uma significativa despolarização mitocondrial, observada no histograma pelo deslocamento da intensidade da fluorescência verde para a esquerda. Esse deslocamento é outro importante indício de morte celular por apoptose. Além disso, a análise das células em citômetro também evidenciou diminuição de tamanho (FSC) e aumento da granulosidade celular (SSC), eventos bem característicos de apoptose.

A literatura relata que as peçonhas ofídicas causam apoptose em uma variedade de células (SUHR; KIM, 1996), e esse efeito é mediado por componentes como LAAO (ANDE *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2008; NAUMANN *et al.*, 2011), metaloproteínases (GUTIERREZ *et al.*, 2005; MOURA-DA-SILVA, *et al.*, 2007) desintegrinas (SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2005) e fosfolipases A₂ (HIGUCHI *et al.*, 2008; GUTIERREZ ; OWNBY, 2003).

A apoptose é um programa de morte celular extremamente regulado e de grande eficiência, que requer a interação de inúmeros fatores. As alterações morfológicas observadas

são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (SARASTE; PULKKI, 2000).

Diversos estudos comprovam o envolvimento de componentes dos venenos de *Bothrops* e *Bothropoides* em processos apoptóticos, como os venenos das serpentes *Bothropoides jararaca*, *Bothrops asper* e *Bothrops atrox* (DÍAZ *et al.*, 2005; LAING *et al.*, 2005; MORA *et al.*, 2005; TANJONI *et al.*, 2005; MORA *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2008; JIMÉNEZ *et al.*, 2008).

Diversos genes estão envolvidos no controle da apoptose por meio da síntese de proteínas que podem funcionar como indutoras ou inibidoras (Hale *et al.*, 1996). A superfamília de proteínas conhecida como Bcl-2 compreende membros pró-apoptóticos (Bax, Bid e Bak) e anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL e Mcl-1), sendo responsáveis pela inativação/ativação das caspases iniciadoras (Caspase -8 e -9) e ativadoras (Caspases -3 e -7). A interação dos produtos da expressão desses genes com estímulos externos determina a ocorrência ou não de apoptose (ALVES *et al.*, 2004).

A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas (PETROS; OLEJNICZAK, 2004). Os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, como Bcl-2, Bcl-XL e Mcl-1, inibem a apoptose por prevenção da liberação de citocromo c (HENGARTNER, 2000). A expressão desses genes é capaz de inibir a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria (PECINA-SLAUS, 2010). Os membros apoptóticos, como Bax, Bid e Bak, promovem a apoptose através da interação celular, ativando a expressão de caspases iniciadoras e ativadoras.

As caspases pertencem à família das cisteínas proteases e sinalizam a indução de apoptose levando a condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar a morte celular aos macrófagos, induzindo a fagocitose dessas células (BOATRIGT; SALVESEN, 2003). As caspases iniciadoras, caspases 8, 9 e 10 conduzem a ativação proteolítica das caspases efetoras, como caspases 3, 6 e 7. Estas por sua vez, clivam proteínas vitais, iniciando e executando a fase de degradação celular (LING *et al.*, 2005).

Para avaliar a expressão dos genes envolvidos no processo de morte celular programada após incubação com o veneno de *Bothropoides insularis*, o RNA total das células MDCK foi extraído e, após a síntese do cDNA, foi realizada a reação de RT-PCR utilizando primers específicos. Foram estudados a expressão dos genes pró-apoptóticas: Caspase -3 e a Caspase -8.

No presente trabalho, não foi observada a indução de nenhum dos genes estudados em relação ao grupo controle, tratado com doxorubicina. Os resultados obtidos contrastam com os resultados observados pela citometria de fluxo. Isso pode ser devido à indução precoce de apoptose pelo veneno de *B. insularis*, não havendo, após 24 horas, quantidade suficiente de RNA intacto necessário para verificação da indução gênica.

Vários estudos avaliam que a observação da expressão de genes apoptóticos e anti-apoptóticos, está diretamente relacionada com o tempo de incubação da substância. Muitas dessas substâncias apresentam um aumento significativo na expressão desses genes nas primeiras horas de incubação (3, 6 e 9 horas) (YANG *et al.*, 2005; IP *et al.*, 2008).

A expressão de genes apoptóticos e anti-apoptóticos também está diretamente relacionada com a composição do veneno. Díaz *et al* (2005) demonstrou que metaloproteinasas de venenos de serpentes induzem apoptose em células endoteliais nas primeiras horas de incubação, apresentando uma maior expressão de genes envolvidos nesse processo após 6 horas de incubação. Segundo Valente *et al.*, (2009), o veneno da serpente *B. insularis* apresenta a fração metaloproteinase em maior concentração do que outras frações presentes na composição tóxica do veneno, isso pode justificar por tanto a não expressão dos genes estudados no tempo de 24 horas. Além disso, alguns venenos de serpente possuem em sua composição ribonucleases (RNases) (MAHALAKSMI; JAGANNADHAM; PANDIT, 2000; DHANANJAVA; SOUZA, 2010), o que pode dificultar o processo de extração de RNA e, conseqüentemente, o estudo de expressão gênica.

Estudos adicionais podem ser realizados, no sentido de incubar as células com BiVT por menores períodos de tempo, para verificar a indução gênica tempo-dependente. Outra possível abordagem experimental é o fracionamento do veneno, para elucidação da substância responsável pelos efeitos observados, sem a interferência dos demais componentes.

Através dos resultados obtidos, verificamos que o veneno de *B. insularis* exerceu efeitos citotóxicos nas células tubulares renais MDCK, como indução de morte celular, alteração da integridade da membrana plásmica, externalização de fosfatidilserina e alterações no potencial de membrana mitocondrial. Estes achados podem constituir aspectos importantes do mecanismo de nefrotoxicidade mediado pelo veneno de *B. insularis*. Além disso, podemos supor que esse efeito não foi devido à sua fração PLA₂.

Dessa forma, nossos resultados sugerem uma ação nefrotóxica direta do veneno, que pode estar relacionada a mecanismos apoptóticos. Estudos futuros são necessários, na tentativa de investigar outros parâmetros que possam estar envolvidos nos mecanismos de nefrotoxicidade desse veneno. Estudos mais detalhados com as frações do veneno, também

são de extrema relevância para definir qual dessas frações estaria mais envolvida na fisiopatologia das lesões renais.



7. CONCLUSÃO

O veneno de *Bothropoides insularis* exerceu um efeito citotóxico em cultura de células tubulares renais MDCK. Os resultados encontrados nesse estudo demonstram que a citotoxicidade induzida pelo veneno, está relacionada possivelmente ao mecanismo de morte por apoptose, de forma concentração dependente. Essa ação pode também está relacionada com a via intrínseca de apoptose, onde observamos despolarização do potencial de membrana mitocondrial.

Nas menores concentrações estudadas o veneno de *Bothropoides insularis* induziu morte por apoptose, no entanto não houve expressão significativa dos genes pró-apoptóticos estudados. Esses resultados provavelmente estão diretamente com o tempo de incubação da substância em estudo.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ACEHAN, D.; JIANG, X.; MORGAN, D. G.; HEUSER, J. E.; WANG, X.; AKEY, C. W. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. **Mol. Cell**, v. 9, n. 2, p. 423-432, 2002.

ACEHAN, C. D.; PARTON, M.; SMITH, I. E.; ELLIS, P. A.; SLATER, J.; ASHLEY, S. et al. Early changes in apoptosis and proliferation following primary chemotherapy for breast cancer. **Br. J. Cancer**, v.89, p.1035-1041, 2003.

AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**, v. 40, n. 4, p. 335–393, 2002.

AKAO, Y.; NOGUCHI, S.; IIO, A.; KOJIMA, K.; TAKAGI, T.; NAOE, T. Dysregulation of microRNA-34a expression causes drug-resistance to 5-FU in human colon cancer DLD-1 cells. **Cancer Lett.**,v. 300, p. 197–204, 2011.

AKAO, Y.; NAKAGAWA, Y.; HIRATA, I.; IIO, A.; ITOH, T.; KOJIMA, K.; NAKASHIMA, R.; KITADE, Y.; NAOE, T. Role of anti-oncomirs miR-143 and -145 in human colorectal tumors. **Cancer Gene Ther.**, v. 17, p. 398–408, 2010.

ALBUQUERQUE, H. N.; COSTA, T. B. G.; CAVALCANTE, M. L. F. Estudo dos acidentes ofídicos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* no Estado da Paraíba. **Rev. Biol. Ciênc. Terra**, v. 5, n.1, 2004.

ALVES, R. M.; ANTONUCCI, G. A.; PAIVA, H. H.; CINTRA, A. C. O.; FRANCO, J. J.; MENDONÇA-FRANQUEIRO, E. P.; DORTA, D. J.; GIGLIO, J. R.; ROSA, J. C., FULY, A, L.; DIAS-BARUFFI, M.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 151, p. 542-550, 2008.

ALVES, R.; CUNHA, M. F. X.; PRATAS, J.; PESSA, P.; MOTA, A.; CAMPOS, M. Estudo da apoptose na transplantação renal. **Rev. Port. Nefrol. Hipert.**, v. 18, n. 3, p. 167-177, 2004.

ANDE, R. S. ; KOMMOJU, P. R.; DRAXL, S.; MURKOVIC, M.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; FERRANDO-MAY, E. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, v. 11, p. 1439-1451, 2006.

ANDRADE, M.S.B. **Avaliação de efeitos citotóxicos,morfológicos e ultraestruturais de microcistinas em células Vero**. 2007.93f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 2007.

BAILEY, P.; WILCE, J. Venom as a source of useful biologically active molecules. **Emerg. Med. (Fremantle)**, v. 13, p. 28-36, 2001.

BALSINDE, J.; DENNIS, E. A. Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 26, p. 16069-16072, 1997.

BALSINDE, J.; PÉREZ, R.; BALBOA, M.A. Calcium-independent phospholipase A₂ and apoptosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1761, p. 1344-1350, 2006.

BARBOSA, A. M.; AMARAL, R. O.; TEIXEIRA, C. F.; HYSLOP, S.; COGO, J. C. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v. 42, n. 5, p. 515-523, 2003.

BARBOSA, P. S.; HAVT, A.; FACÓ, P. E.; SOUSA, T. M.; BEZERRA, I. S.; FONTELES, M. C.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C.; MONTEIRO, H. S. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. **Toxicon**, v. 40, n. 10, p. 1427-1435, 2002.

BARONE, J. M.; ALPONTI, R. F.; FREZZATTI, R.; ZAMBOTTI-VILLELA, L.; SILVEIRA, P. F. Differential efficiency of simvastatin and lipoic acid treatments on bothrops jararaca envenomation-induced acute kidney injury in mice. **Toxicon**, v. 57, n. 1, p. 148-156, 2011.

BARRAVIEIRA, B. **Disfunção Hepática em pacientes picados por cobras botrópicas e crotálicas em Botucatu**. 1994. 110f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, 1994.

BASILE, D. P. Expression of bcl-2 and bax in regeneration rat renal tubules following ischemic injury. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. 640-647, 1997.

BATISTA, I. F. C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FARIA, F.; SIMONS, S. M.; BARROS-BATESTTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; LEÃO, L. I.; HO, P. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Toxicon**, v. 51, p. 823-834, 2008.

BAZZA, A.; MARRAKCHI, N.; AYEB, M. E.; SANZ, L.; CALVETTE, J. J. Snake venomomics: comparative analysis of the venom proteomes of the Tunisian snakes *Cerastes cerastes*, *Cerastes vipera* and *Macrovipera lebetina*. **Proteomics**, v. 5, n. 16, p. 4223-4235, 2005.

BEETON, C.; GUTMAN, G. A.; CHANDY, K. G. Targets and Therapeutic Properties of Venom Peptides. **Handbook of Biologically Active Peptides**, p. 403-414, 2006.

BERNARDI, P.; PETRONILLI, V.; DI LISA, F.; FORTE, M. A mitochondrial perspective on cell death. **Trends Biochem. Sci.**, Oxon, v. 26, n. 2, p. 112-117, 2001.

BÉRNILS, R. S. (Org.). **Brazilian reptiles**: List of species. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Acesso em: 23 dez. 2011.

BJARNSON, J. B.; FOX, W.J. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.**, v. 62, p. 325-372, 1994.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snakes venoms. **Pharmacol. Ther.**, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.

BOATRIGT K.M., SALVESEN G.S., Mechanisms of caspase activation. **Curr Opin Cell Biol.**, v.6, p. 725-731, 2003.

BOERSMA, H. H.; KIETSELAER, B. L.; STOLK, L. M.; BENNAGHMOUCH, A.; HOFSTRA, L.; NARULA, J.; HEIDENDAL, G. A.; REUTELINGSPERGER, C. P. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. **J. Nucl. Med.**, v. 46, n. 12, p. 2035-2050, 2005.

BON, C. Snake venom & pharmacopoeia. In: BAUCHOT, R. (Ed.). **Snakes a natural history**. New York: Sterling Publishing Co., 1997. p. 194-209.

BONFIM, V. L.; TOYAMA, M. H.; NOVELLO, J. C.; HYSLOP, S.; OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S. Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom. **J. Protein Chem.**, v. 20, n. 3, p. 239-245, 2001.

BONFIN V.L.; PONCE-SOTO L.A.; NOVELLO, J.C.; MARAGONDI, S. Cytotoxic action in myoblasts and myotubes (C2C12) and enzymatic characterization of a new phospholipase A2 isoform (Bj-V) from *Bothrops jararacussu* venom. **Protein Peptide Lett.**, v. 13, p. 707-713, 2006.

BOUJRAD, H.; GUBKINA O.; ROBERT N.; KRANTIC S.; SUSIN S. A. AIF-Mediated Programmed Necrosis: A Highly Regulated Way to Die. **Cell Cycle**, v. 6, n. 21, p. 2612-2619, 2007.

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, Fortaleza, 2006.

BRAGA, M. D. M.; MARTINS, A. M. C.; AMORA, D. N.; DE MENEZES, D. B.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S.; BARBOSA, P. S. F.; ALVES, R. D.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Purification and biological effect of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 859–867, 2006.

BRAGA, M. D.; COSTA MARTINS A. M.; ALVES, C. D.; DE MENEZES, D. B.; MARTINS, R. D.; FERREIRA BARBOSA, P. S.; DE SOUSA OLIVEIRA, I.M.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; DOS SANTOS DIZ FILHO, E. B.; RAMOS FAGUNDES, F. H.; FONTELES ,M. C.; AZUL MONTEIRO, H. S. Purification and biological effects of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 51, p. 199-207, 2007.

BRAGA, M. D.; COSTA MARTINS A. M.; ALVES, C. D.; DE MENEZES, D. B.; MARTINS, R. D.; FERREIRA BARBOSA, P. S.; DE SOUSA OLIVEIRA, I.M.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; DOS SANTOS DIZ FILHO, E. B.; RAMOS FAGUNDES, F. H.; FONTELES ,M. C.; AZUL MONTEIRO, H. S. Purification and renal effects of phospholipase A(2) isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v 51, p.181-190, 2008.

BRAGA, M. D. M.; MARTINS, A. M. C.; AMORA, D. N.; MENEZES, D. B.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S.; ALVES, C. D.; BARBOSA, P. S. F.; ALVES, R. S; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Purification and biological effects of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 51, p. 199-207, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.** Brasília, 1998.

BRENES, O.; MUÑOZ, E.; ROLDÁN-RODRÍGUEZ, R.; DÍAZ, C. Cell death induced by *Bothrops asper* snake venom metalloproteinase on endothelial and other cell lines. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 88, p. 424–432, 2010.

BUTLER, M.; DAWSON, M. (Ed.). **Cell culture.** Oxford: Blackwell, 1992.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Lett.**, v. 583, p. 1736–1743, 2009.

CARDOSO, J. L. C. **Animais Peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003

CASTRO, H.C.; ZINGALI, R.B.; ALBUQUERQUE, M.G.; PUJOL-LUZ, M.; RODRIGUES, C.R. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Toxicon**, v. 43, p. 833-839, 2004.

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, 2006.

CHAIM, O. M. **Estudo da atividade citotóxica da proteína dermonecrótica do veneno da aranha marrom (*Loxosceles intermédia*) com ênfase no efeito nefrotóxico**. 109f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

CHAKRABORTI, S. Phospholipase A2 isoforms: a perspective. **Cell Signalling**, v. 15, p. 637-665, 2003.

CHEN, M.; HE, H.; ZHAN, S.; KRAJEWSKI, S.; REED, J.C.; GOTTLIEB, R.A. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 24–28, 2001.

CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bull. World Health Organ.**, v. 76, n. 5, p. 515-524, 1998.

CHISARI, A.; SPINEDI, E.; VOIROL, M. J.; GIOVAMBATTISTA, A; GAILLARD, R. C. A phospholipase A2-related snake venom (from *Crotalus durissus terrificus*) stimulates neuroendocrine and immune functions determination of different sites of action. **Endocrinology**, v. 139, p. 617–625, 1998.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; SCHATNER, M.; FRITZEN, M.; POZNER, R. G.; REIS, C. V.; LOURENÇO, D.; LAZZARI, M. A. Effects of Lopap on human endothelial cells and platelets. **Haemostasis**, v. 31, p. 257-265, 2001.

CINTRA, A. C.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R. Primary structure and biological activity of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops insularis* snake venom. **J. Protein. Chem.**, v. 9, n. 2, p. 221-227, 1990.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829-837, 2004.

COGO, J. C.; PRADO-FRANCISCETTI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; RODRIGUES-SIMONE, L. Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. **Toxicon**, v. 31, n. 10, p. 1237-1247, 1993.

COGO, J. C.; PRADO-FRANCISCETTI, J.; GIGLIO, J. R.; CORRADO, A. P.; COLLARES-BUZATO CB, JEPSON MA, SIMMONS NL, HIRST BH. Increased tyrosine phosphorylation causes redistribution of adherens junction and tight junction proteins and perturbs paracellular barrier function in MDCK epithelia. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 76, n. 2, p. 85-92, 1998.

COLLARES-BUZATO, C. B.; JEPSON, M. A.; MCEWAN, G. T.; SIMMONS, N. L.; HIRST, B. H. Junctional uvomorulin/E-cadherin and phosphotyrosine-modified protein content are correlated with paracellular permeability in Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelia. **Histochemistry**, v. 101, n. 3, p. 185-94, 1994.

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. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 181, p. 124-132, 2002.

CONCEIÇÃO, K.; KONNO, K.; DE MELO, R. L.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; SCIANI, J. M.; CONCEIÇÃO, I. M.; PREZOTO, B. C.; CAMARGO, A. C. M.; PIMENTA, D. C. Isolation and characterization of a novel bradlinin potentiating peptide (BPP) from the skin secretion of *Phyllomedusa hypocondrialis*. **Peptides**, v. 28, p. 515-523, 2007.

CONCEIÇÃO, K.; KONNO, K.; RICHARDSON, M.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; DAFFRES, S.; CAMARGO, A. C. M.; PIMENTA, D. C. Isolation and biochemical characterization of peptides presenting antimicrobial activity from skin of *Phyllomedusa hypocondrialis*. **Peptides**, v. 27, p. 3092-3099, 2006.

COSTA E.P., CLISSA P.B., TEIXEIRA C.F., MOURA-DA-SILVA AM. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake envenomation- induced local inflammation. **Inflammation**, v. 26, n. 1, p.13-77, 2002.

CRUCHTEN, S. V.; BROECK, W. V. D. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 31, n. 4, p. 214-223, 2002.

CRUZ-HÖFLING, M. A.; DONATO, J. L.; LEITE, G. B.; RODRIGUES-SIMIONE, L. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A2 fraction. **Toxicon**, v. 36, n.10, p. 1323-1332, 1998.

CUSHMAN, D. W.; ONDETTI, M. A. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. **Nat. Med.**, v. 5, p. 1110-1113, 1999.

DA CRUZ-HÖFLING, M. A.; PARONETO, C. C. L.; COCO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; D'ABREU, A. C. Histopathological changes in avian kidney caused by *Bothrops insularis* (jararaca da ilha) venom and phospholipase A2 containing fraction. **Histol. Histopathol**, v. 16, p. 185-195, 2001.

DAMICO, D. C. S.; NASCIMENTO, J. M.; LOMONTE, B.; PONCE-SOTO, L. A., JOAZEIRO, P. P.; NOVELLO, J. C.; MARANGONIA, S.; COLLARES-BUZATO, C B. Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A2 (LmTX-I) in cultured cells. **Toxicon**, v. 49, p. 678- 692, 2007.

DE CASTRO, I. Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas, no acidente ofídico, com ênfase na toxicidade renal. **O mundo da saúde**, v. 30, n. 4, p. 644-653, 2006.

DE CASTRO R.C.; LANDUCCI E.C.; TOYAMA M.H.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI S.; DE NUCCI G.; ANTUNES E. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A(2) into the rat pleural cavity. **Toxicon**, v. 38, p. 1773-1785, 2000.

DE LIMA, D. C.; ABREU, P. A.; DE FREITAS, C. C.; SANTOS, D. O.; BORGES, R. O.; DOS SANTOS, T. C.; CABRAL, L. M.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Snake venom: Any clue for antibiotics and CAM. **eCAM**, v. 2, n. 1, p. 39-47, 2005.

DE SOUZA, A. L.; MALAQUE, C. M.; SZTAJNBOK, J.; ROMANO, C. C.; DUARTE, A. J.; SEGURO, A. C. *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 151-156, 2008.

DENAULT, J. B.; SALVESEN, G. S. Caspases: keys in the ignition of cell death." **Chem. Rev.**, v. 102, n. 12, p. 4489-4500, 2002.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, v269, p13057-13060, 1994.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂.
DESAGHER, S.; MARTINO, J. C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol.**, v. 10, p. 369-376, 2000.

DESAGHER, S., OSEN-SAND, A., MONTESSUIT, S., MAGNENAT, E., VILBOIS, F., HOCHMANN, A., JOURNOT, L., ANTONSSON, B. AND MARTINOU, J. C. Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. **Mol. Cell**, v.8, p. 601-611, 2001

DHANANJAYA B.L.; SOUZA C.J. An overview on nucleases (DNase, RNase, and phosphodiesterase) in snake venoms. **Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 1-6, 2010.

ENGELAND, M.V.; NIELAND, L.J.W.; RAMAEKERS, F.C.S.; SCHUTTE, B.; 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.

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

EVANGELISTA, I.L.; MARTINS, A.M.; NASCIMENTO, N.R.; HAVT, A.; EVANGELISTA, J.S.; DE NORÕES, T.B.; TOYAMA, M.H.; DIZ-FILHO, E.B.; TOYAMA, D.O.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A2. **Toxicon**, v. 6, p. 1061-1070, 2010.

FERREIRA, S. H. A. Bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **Br. J. Pharmacol.**, v. 24, p. 163-169, 1965.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 969-985, 2005.

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

FRESHENEY, R. I. **Culture of Animal Cells: a manual of basic techniques**. 4th ed. New York, 2000.

FRIEDERICH, C.; TU, A. T. Role of metals in snake venoms for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. **Biochem. Pharmac.**, v. 20, p. 1549-1556, 1971.

FRITZEN, M.; FLORES, M. P. A.; REIS, C. V.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A prothrombin activator (Lopap) modulating inflammation, coagulation and cell survival mechanisms. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 333, p. 517-523, 2005.

FURTADO, M. F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; ROCHA, M. M. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon**, v. 48, n. 4, p. 401-410, 2006.

GEWIS A. Introduction of apoptosis. **ApoReview**, p. 1-26, 2003. Disponível em: <<http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm>>. Acesso em: 27 out. 2011.

GIRARDI, G. Os boticários da fauna brasileira. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 2007.

GIRÓN, M.E.; AGUILAR, I.; ROMERO, L.; SÁNCHEZ, E.E.; PÉREZ J.C.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A. A low-cost method to test cytotoxic effects of *Croतालus vegrandis* (serpente:Viperidade) venom on Kidney cell cultures. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.47, n.3, p.100-105, 2005.

GODOY, P. Sistema Urinário. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo**: patologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap.16, p. 421-480.

GÓMEZ, E. G. **Distribución tisular de transportadores de fármacos en tejidos normales y transformados**: Papel en el sistema nervioso central. 2006. 192 f. Tese (Doutorado) - Facultat de Biologia, Departament de Bioquímica i Biología Molecular, Universitat de Barcelona, Barcelona, 2006.

GOMES, M.S.; MENDES, M.M.; DE OLIVEIRA, F.; DE ANDRADE, R.M.; BERNADES, C.P.; HAMAGUCHI, A.; DE ALCANTARA, T.M.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; HOMSI-BRADEBURGO, M.I. BthMP: A new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v.53, n.1, p.24-32, 2009.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, p. 626-629, 2004.

GREEN, D.; KROEMER, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? **Trends Cell Biol.**, v. 8, p. 267-271, 1998.

GRISOTTO, L. S.; MENDES, G. E.; CASTRO, I.; BAPTISTA, M. A.; ALVES, V. A.; YU, L.; BURDMANN, E. A. Mechanisms of bee venom-induced acute renal failure. **Toxicon**, v. 48, n. 1, p. 44-54, 2006.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUERCIO, R. A.; SHEVCHENKO, A.; SHEVCHENKO, A.; LOPEZ-LOZANO, J. L.; PABA, J.; SOUZA, M. V.; RICART, C. A. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome Sci.**, v. 4, n. 11, 2006.

GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **Int. J. Oncol.**, v. 22, p. 15-20, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. **Rev. Biol. Trop.**, v. 50, p. 377–394, 2002.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DIAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, p. 997–1011, 2005.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, p. 915–931, 2003.

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841–850, 2000.

HALE, A. J.; SMITH, C. A.; SUTHERLAND, L. C.; STONEMAN, V. E.; LONGTHORNE, V. L.; CULHANE, A. C.; WILLIAMS, G. T. Apoptosis: molecular regulation of cell death. **Eur J Biochem.**, v. 236, n. 1, p1-26, 1996.

HARVEY, A. L; BRADLEY, K. N.; COCHRAN, S. A.; ROWAN, E. G.; PRATT, J. A.; QUILLFELDT, J. A.; JERUSALINSKY, D. A. What can toxins tell us for drug discovery? **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1635-1640, 1998.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discov. Today**, v. 5, n. 7, p. 294-300, 2000.

HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S. KUMAR BHATTACHARYYA, K. Snake Venom Hemorrhagins. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 1, p. 1-19, 1999.

HAVT, A.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA(2) and PAF blockers. **Toxicon**, v. 39, n. 12, 2001.

HEIDEN, M.G.V.; CHANDEL, N.S.; WILLIANSO, E.K.; SCHUMACKER, P.T.; THOMPSON, C. B. Bcl-XL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. **Cell**, Cambridge, v. 91, p. 627-637, 1997.

HEINRICH, E.L.; WELTY, L.A.Y.; BANNER, R.R.; OPPENHEIMER, S.B.; Direct targeting of cancer cells: A multiparameter approach. **Acta Histochemica**, v. 107, n. 5, p. 335-344, 2005.

HENGARTNER, M. O. The Biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407. p. 770– 776, 2000

HICKMAN, C. P. J.; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 28, p. 540-541.

HIGUCHI, D.A.; BARBOSA, C.M.V.; BINCOLETTO, C.; CHAGAS, J.R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F.; PESQUERO, J.B.; Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 89, p. 319 - 328, 2008.

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

HYNES, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, n. 1, p. 11–25, 2002.

IP, S.W.; WEI, H.S.; LIN, J.P.; KUO, H.M.; LIU, K.C.; HSU, S.C.; YANG, J.S.; CHIU, T.H.; HAN, S.M.; CHUNG, J.G. Bee Venom Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Cervical Epidermoid Carcinoma Ca Ski Cells. **Anticancer Res.**, v. 28, p. 833-842, 2008.

JOHNSON, L.V.; WALSH, M.C.; CHEN, L.B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, n. 2, p. 990-994, 1980.

JORGE, R.J.; MARTINS, A.M.; MORAIS, I.C.; XIMENES, R.M.; RODRIGUES, F.A.; SOARES, B.M.; EVANGELISTA, J.S.; TOYAMA, M.H.; MARTINS, A.M.; MORAES, FILHO, M.O.; MONTEIRO, H.S. In vitro studies on *Bothrops* venoms cytotoxic effect on tumor cells. **J. Exp. Ther. Oncol.**, v. 9 n.3, p.249-253, 2011.

JÚNIOR, V.F.V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M.A.M.. Medicinal plants: safe cure? **Quím. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). **Gene**, v. 299, n. 1/2, p. 279–291, 2002.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. Insights into mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, p. 627–642, 1996.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; THEAKSTON, R. D.; ZUZEL, M. Insights into the KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochem. J.**, v. 397, n. 3, p. 377-387, 2006.

KAPOOR, V.K. Natural toxins and their therapeutic potential. **Indian J. Exp. Biol.**, v.48, n.3, p.228-237, 2010.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochem. J.**, v. 397, n. 3, p. 377-387, 2006.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-840, 2003.

KINI, R. M. Molecular moulds with multiple missions: functional sites in three-finger toxins. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 29, n. 9, p. 815-822, 2002.

KINI, R. M. **Venom phospholipase A₂ enzymes**: structure, function and mechanism. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1997.

KIRKPATRICK, P. Antibacterial drugs: stitching together naturally. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.1, p.748, 2002.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 63, p. 3030-3041, 2006.

KRYSKO, D. V.; BERGHE, T. V.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, p. 205–221, 2008.

LANDUCCI, E. C.; TOYAMA, M.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Effect of crotoptin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 38, n. 2, p. 199-208, 2000.

LECOUER, H.; LANGONNÉ, A.; BAUX, L.'REBOUILLAT, D.'RUSTIN, P.; PRÉVOST, M.C.; BRENNER, C.'EDELMAN, L.'JACOTOT, E.. Real-time flow cytometry analysis of permeability transition in isolated mitochondria. **Exp. Cell Res.**, Orlando, v. 294, p.106-117, 2004.

LEGRAND, C.; BOUR, J. M.; CAPIAUMONT, J.; MARTIAL, A.; HACHE, J. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of culture eukaryotic cells as marker. **J. Biotechnol.**, v. 25, n. 3, p. 231-243, 1992.

LEMOS J.C.; ALMEIDA T.D.; FOOK, S.M.L.; PAIVA A.A.; SIMOES, M.O.S. Epidemiologia dos acidentes ofídicos noticiados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 12, p. 50-59, 2009.

LEWIS R.J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, n.10, p.790-802, 2003.

LIEBERTHAL, W.; TRIACA, V.; LEVINE, J. S. Potential consequences of ATP depletion in proximal tubular cells in culture: sublethal injury, necrosis and apoptosis. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 7, p. 1828, 1996.

LING, W.; PETER, R; LUO, L. TNF- α promotes cell survival through stimulation of K⁺ channel and NF κ B activity in corneal epithelial cells. **Exp. Cell. Res.**, v. 15, n. 1, p. 30-48, 2005.

LIRA, M. S.; FURTADO, M. F.; MARTINS, L. M.; LOPES-FERREIRA, M.; SANTORO, M. L.; BARBARO, K. C. Enzymatic and immunochemical characterization of *Bothrops insularis* venom and its neutralization by polyspecific *Bothrops* antivenom. **Toxicon**, v. 49, n. 7, p. 982-994, 2007.

LIRA, M. S.; FURTADO, M. F.; MARTINS, L. M.; LOPES-FERREIRA, M.; SANTORO, M. L.; BARBARO, K. M. Enzimatic and immunochemical characterization of *Bothrops insularis* venom and its neutralization by polyspecific *Bothrops* antivenom. **Toxicon**, v.49, n.7, p.982-994, 2007.

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.

LOPEZ-MEDIAVILLA, C.; ORFAO, A.; GONZALEZ, M.; MEDINA, J.M. Identification by low cytometry of two distinct rhodamine-123-stained mitochondrial populations in rat liver. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 254, n. 1/2, p. 115-120, 1989.

MACEY, M. G. **Flow cytometry - clinical applications**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.

MACHADO JUNIOR, J. C.; FLORÃO, A.; FERNANDA, V.R.; MATTANA, F.H.R.; CID, A.M.; SANTOS, A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. Citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.16, p.645- 652, 2006

MAHALAKSHMI, Y.V.; JAGANNADHAM, M.V.; PANDIT, M.W. Ribonuclease from Cobra Snake Venom: Purification by Affinity Chromatography and Further Characterization. **IUBMB Life**, v. 49, p. 309–316, 2000.

MARQUES, O. A. V.; MARTINS, M.; SAZIMA, I. A jararaca da Ilha da Queimada Grande. **Ciênc. Hoje**, v. 31, n. 186, p. 56-59, 2002.

MARQUES, O. A. V.; SAZIMA I. Old habits die hard: mouse handling by a pitviper species on a rodent-free island. **Amphibia-Reptilia**, v. 30, p.435–438, 2009.

MARTINS, A. M. C.; SOUSA, F. C. M; BARBOSA, P. S. F. et al. Action of anti-biothropic 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 proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1477, p. 146-156, 2000.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom protease affecting hemostasis and thrombosis. **Biochem Biophys Acta**, v. 1477, p146-156, 2000.

MCLANE, M. A.; MARCINKIEWICZ, C.; VIJAY-KUMAR, S.; WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I.; NIEWIAROWSKI, S. Viper venom desintegrins and related molecules. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 219, p. 109-191, 1998.

MEDINA, J.M.; LÓPEZ-MEDIAVILLA, C.; ORFAO, A. Flow cytometry of isolated mitochondria during development and under some pathological conditions. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 510, p. 127-132, 2002.

MELGAVAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, L. C. *et al.* **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Sarvier, 2003. cap. 4, p. 33.

MCHUGH P., TURINA M. Apoptosis and necrosis: a review for surgeons. **Sur. Infect. (Larchmt)**, v.7, n.1, p. 53-68, 2006.

MITTERMEIER, R.A.; FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; BRANDON, K. Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 14-21, 2005.

MOCHIZUKI, T.; KUGE, Y.; ZHAO, S.; TSUKAMOTO, E.; HOSOKAWA, M.; MODESTO, J. C. A.; SPENCER, P. J.; FRITZEN, M.; VALENÇA., R. C.; OLIVA, M. L. V.; SILVA, M. B.; TAVASSI, A. M. C.; GUARNIERI, M. C. BE-I-PLA2, a novel acidic phospholipase A2 from *Bothrops erythromelas* venom: Isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I2 release by endothelial cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 72, p. 377– 384, 2006.

MORTARI, M. R.; CUNHA, A. O.; FERREIRA, L. B.; DOS SANTOS, W. F. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. **Pharmacol. Ther.**, v. 114, n. 1, p. 171-183, 2007.

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.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Curr. Pharm. Des.**, v. 13, p. 2893-2905, 2007.

NASCIMENTO, J. M.; FRANCHI, G. C. J. R.; NOWILL, A. E.; COLLARES-BUZATO, C. B.; HYSLOP, S. Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by *Bothrops alternatus* snake venom in cultured Madin-Darby canine kidney cells. **Biochem. Cell Biol.**, v. 5, p. 591-605, 2007.

NAUMANN, G.B.; SILVA, L.F.; SILVA, L.; FARIA, G.; RICHARDSON, M.; EVANGELISTA, K.; KOHLHOFF, M.; GONTIJO, C.M.F.; NAVDAEV, A.; REZENDE, F.F.; EBLE, J.A.; SANCHEZ, E.F. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochim. Biophys. Acta**, 2011.

NICOLAS J. P.; LIN, Y.; LAMBEAU, G.; GHOMASHCHI, F.; LAZDUNSKI, M.; GELB, M. H. Localization of structural elements of bee venom phospholipase A₂ involved in N-type receptor binding and neurotoxicity. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 7173-7181, 1997.

OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; GUIMARÃES, P.R.; ABREUP.A.; DUTRA, D.L., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; RODRIGUES, C.R.; HO, P.L.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B. Identification and characterization of new member of snake venom thrombin inhibitors from *Bothrops insularis* using a proteomic approach. **Toxicon**, v.51, n.15, p.659-671, 2008.

OLIVEIRA, F. N.; BRITO, M. T.; MORAIS, I. C.; FOOK, S. M.; ALBUQUERQUE, H. N. Accidents caused by Bothrops and Bothropoides in the State of Paraíba: epidemiological and clinical aspects. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 43, n. 6, p. 662-667, 2010.

OLIVEIRA J.C.R., MONTES DE OCA H., DUARTE M.M, DINIZ C.R, FORTES-DIAS C.L. Toxicity of south american snake venom measured by na in vitro cell culture assay. **Toxicon**, v.40, p.878- 884, 2002.

OWNBY, C. L. Structure, function and biophysical aspects of the mitotoxins from snake venoms. **J. Toxicol. Toxin. Rev.**, v. 17, p. 213-238, 1998.

OWNBY, C. L.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLECHER, J. F. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v. 37, p. 411-445, 1999.

PAL, S. K.; GOMES, A.; DASGUPTA, S. C.; GOMES, A. Snake venom as therapeutic agents: from toxin to drug development. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 40, n. 2, p. 1353-1358, 2002.

PALMA, M. S.; YAMANE, T.; CAMARGO, A. C. M. **Biodiversidade**: preservação e bioprospecção. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/biodiversidade/bio13.htm>>. Acesso em: 31 ago. 2011.

PECINA-SLAUS, N. Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a review. **Cancer Cell Int.**, v. 30, p.10-22, 2010.

PEIXOTO, E. B. M. I. **Modulação in vitro da função de barreira epitelial e integridade da junção de oclusão, em linhagem celular MDCK**. 2003. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular Estrutural) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1644, p. 83-94, 2004.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 45, n. 9, p. 1-29, 2001.

PIMENTA, A. M. C.; LIMA, M. E. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. **J. Peptide Sci.**, v. 11, p. 670–676, 2005.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**, v. 47, n. 1, p. 24–29, 2001.

PINHO, F. O.; VIDAL, E. C.; BURDIMANN, E. A. Atualização em Insuficiência Renal Aguda: insuficiência renal após acidente crotálico. **J. Bras. Nefrol.**, v. 22, n. 3, p. 162-168, 2000.

PINTO, L. M. O. Revisão/Atualização em nefrologia clínica: células mesangiais e matriz mesangial: sua interação mediando o processo de cronificação da lesão glomerular. **J. Bras. Nefrol.**, v. 20, n. 2, p. 178-185, 1998.

PIRKLE, H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. **Thromb. Haemostatis**, v. 79, p. 675–683, 1998.

PORTO, B. N.; TELLI, C. A.; DUTRA, T. P.; ALVES, L. S.; BOZZA, M. T.; FIN, C. A.; THIESEN, F. V.; RENNEN, M. F. Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: *Viperidae*). **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 270-277, 2007.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C.V.; FURTADO, M. F. D.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, p. 842–851, 2008.

RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. **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.

REIS, C. V.; FARSKY, S. H. P.; FERNANDES, B. L.; SANTORO, M. L.; OLIVA, M. L. V.; MARIANO, M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. In vivo characterization of Lopap,

prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom. **Thrombosis Res.**, v. 102, p. 437-443, 2001.

RIBEIRO, S.B.; PAGNOCCA, F.C.; VICTOR, S.R.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JUNIOR, M.; SILVA, O. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Activity of sesame leaf extracts against the symbiotic fungus of *Atta sexdens*. **L. An. Soc. Entomol. Brasil**, v. 27, p. 421-426, 1998.

ROCHA, I.C.A. **Estudo epidemiológico dos acidentes ofídicos no estado do Ceará**. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; ZAMUNÉR, S. R.; COGO, J. C.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P. ROY, M. K.; TAKENAKA, M.; KOBORI, M.; NAKAHARA, K.; ISOBE, S.; TSUSHIDA, T. Apoptosis, Necrosis and proliferation-inhibition by Cyclosporine A in U 937 (a human monocytic cell line). **Pharmacol. Res.**, v. 53, p. 293 – 302, 2006.

ROY, M.K.; TAKENAKA, M.; KOBORI, M.; NAKAHARA, K.; ISOBE, S.; TSUSHIDA, T. Apoptosis, Necrosis and proliferation-inhibition by Cyclosporine A in U 937 (a human monocytic cell line). **Pharmacol. Res.**, v. 53, p. 293 – 302, 2006.

RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. Colon cancer: genetics and apoptotic events. **Biol. Chem.**, v. 385, p. 449-464, 2004.

SALVESEN, G. S.; DUCKETT, C. S. IAP proteins: blocking the road to death's door. **Nat Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 3, n. 6, p. 401-410, 2002.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc. Res.**, v. 45, n. 3, p. 528-537, 2000.

SARIS; N.E.L.; TEPLOVA, V.V.; ODINOKOVA, I.V.; AZARASHVILY, T.S. Interference of calmidazolium with measurement of mitochondrial membrane potential using the tetraphenylphosphonium electrode or the fluorescent probe rhodamine 123. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 328, p. 109-112, 2004.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; COMINETTI, M.R.; TERRUGGI, C.H.B.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; DE FREITAS, M.S.; CREPIN, M.; FIGUEIREDO, C.C.; MORANDI, V. Alternagin-C, a disintegrinlike protein from the venom of *Bothrops alternatus*, modulates $\alpha_2\beta_1$ integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, p. 1505-1511, 2005.

SERVAIS, H.; VAN DER SMISSEN, P.; THIRION, G.; VAN DER ESSEN, G.; VAN BAMBEKE, F.; TULKENS, P. M.; MINGEOT-LECLERCQ, M. P. Gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells: involvement of lysosomes and mitochondria. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 206, n. 3, p. 321-333, 2005.

SGRIGNOLLI, L. R.; MENDES, G. E. F.; CARLOS, C. P.; BURDMANN, E. A. Acute Kidney Injury Caused by *Bothrops* Snake Venom. **Nephron. Clin. Pract.**, v. 119, p. 131-137, 2011.

SHANKLAND, S. J.; WOLF, G. Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 278, n. 4, p. 515-529, 2000.

SHAPIRO, H.M. Membrane Potential Estimation by Flow Cytometry. **Methods**, Orlando, v.21, p. 271-279, 2000.

SHAPIRO H.M. **Practical Flow Cytometry**. New York: AR Liss, 1988.

SIMIONI, L.; D'ABREU, A.C. Histopathological changes in avian kidney caused by *Bothrops insularis* (jararaca da ilha) venom and phospholipase A2 containing fraction. **Histol. Histopathol.**, v. 16, p. 185 - 195, 2001.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria coma academia. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 12, n.1, p.35-40, 2002.

SINAN. Sistema de informações de agravos de notificação. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21383>. Acesso em: 28 out. 2011.

SINITOX. **Estatística Anual de Casos de Intoxicação e Envenenamento**. Rio de Janeiro:, Centro de Informação Científica e Tecnológica, Fundação Oswaldo Cruz, 2009. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox>>. Acesso em: 05 Nov. 2011.

Relatórios gerenciais: Acidentes por animais peçonhentos: notificação por tipo de serpente segundo ano, 2009. Disponível em:<<http://www.fiocruz.br/sinitox/>>. Acesso em: 23 dez. 2011.

SITPRIJA, V. Snakebite nephropathy. **Nephrology**, v. 11, p. 442-448, 2006.

SMAILI, S.S.; HSU, Y.T.; 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. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 183-190, 2003.

SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications of phospholipases A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 855-868, 2003.

SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; TOYAMA, M. H.; LOMBARDI, F. R.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, v. 36, n. 3, p. 503-514, 1998.

SOUSA, F. C.M. **Avaliação dos efeitos renais induzidos pelo veneno e PLA₂ Lys 49 e Asp 49 da serpente *Bothropoides erythromelas* (AMARAL, 1923): análise dos mediadores envolvidos.** 105f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

SUHR, S.M.; KIM, D.S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 224, p. 134-139, 1996.

TEIXEIRA, S. S. **Caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase A2 ácida isolada do veneno de *Bothrops pirajai*.** Dissertação (Mestrado em toxicologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TORRES, A. M.; WONG, H. Y.; DESAI, M.; MOOCHHLA, S.; KUCHEL, P. W.; KINI, R.M. Identification of a novel family of proteins in snake venoms: purification and structural characterization of nawaprin from *Naja nigricollis* snake venom. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 41, p. 40097-40104, 2003.

TU, A. T. **Overview of snake venom chemistry.** Natural toxins II. [S.l.]: Plenum Press, 1996.

VALENTE, R. H.; GUIMARÃES, P. R.; JUNQUEIRA, M.; NEVES-FERREIRA, A. G.; SOARES, M. R.; CHAPEAUROUGE, A.; TRUGILHO, M. R.; LEÓN, I. R.; ROCHA, S. L.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; WERMELINGER, L. S.; DUTRA, D. L.; LEÃO, L. I.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; HO, P. L.; ZINGALI, R. B.; PERALES, J.; DOMONT, G. B. *Bothrops insularis* venomics: a proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. **J. Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 241-255, 2009.

VARANDA, E. A.; GIANNINI, M. J. S. Bioquímica de venenos de serpentes. In: BARRAVIERA, B. (Coord.). **Venenos animais: uma visão integrada.** Rio de Janeiro: EPUC, 1994. Cap. 14, p. 2005.

VERANO-BRAGA, T.; ROCHA-RESENDE, C.; SILVA, D. M.; IANZER, D.; MARTIN-
EAUCLAIRE, M. F.; BOUGIS, P. E.; DE LIMA, M. E.; SANTOS, R. A. S.; PIMENTA, A.
M. C. *Tityus serrulatus* hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom.
Biochem. Biophys. Res. Com., v. 371, p. 515-520, 2008.

VERHEIJ, H. M.; BOFFA, M. C.; ROTHEN, C.; BRYEKERT, M. C.; VERGER, R.; HASS,
G. H. Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A₂. **Eur
J. Biochem.**, v. 112, p. 25-32, 1980.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell
death. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v. 243, p. 167-190, 2000.

VIEIRA Jr, J. M. Atualização em insuficiência renal: expressão gênica na insuficiência renal
aguda (IRA). **J. Bras. Nefrol.**, v. 23, n. 4, p. 230-233, 2001.

WHITE, J. Snakes venoms and coagulopahty. **Toxicon**, v. 45, p. 951-967, 2005.

WÜSTER, W.; DUARTE, M. R.; SALOMÃO, M. G. Morphological correlates of incipient
arboreality and ornithophagy in island pitvipers, and the phylogenetic position of *Bothrops
insularis*. **J. Zool.**, v. 266, p. 1-10, 2005.

XU, C.; MA, D.; YU, H.; LI, Z.; LIANG, J.; LIN, G.; ZHANG, Y.; LAI, R. A bactericidal
homodimeric phospholipases A₂ from *Bungarus fasciatus* venom. **Peptides**, v. 28, p. 969-
973, 2007.

YAMAZAKI, Y.; HYODO, F.; MORITA, T. Wide distribution of cysteine-rich secretory
proteins in snake venoms: isolation and cloning of novel snake venom cysteine-rich secretory
proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 412, n. 1, p. 133-141, 2003a.

YAMAZAKI, Y.; TAKANI, K.; ATODA, H.; MORITA, T. Snake venom vascular
endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition
of KDR (VEGF receptor 2). **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 52, p. 51985-51988, 2003b.

YANG, C. W.; RATHINAVELU, A.; BOROWITZ, J. L.; ISOM, G. E. Activation of a
calcium- and pH-dependent phospholipase A₂ by cyanide in PC12 cells. **Toxicol. Appl.
Pharmacol.**, v. 124, n. 2, p. 262-267, 1994.

YANG, C. S. Mechanism IF inhibition of carcinogenesis by tea. **Biofactors**, v. 13, p. 73-79,
2005.