



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**RAMON RÓSEO PAULA PESSOA BEZERRA DE MENEZES**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E DOS EFEITOS DO VENENO DA  
SERPENTE *Bothropoides insularis* SOBRE MACRÓFAGOS RAW 264.7 *in vitro*.**

**FORTALEZA**

**2013**

**RAMON RÓSEO PAULA PESSOA BEZERRA DE MENEZES**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E DOS EFEITOS DO VENENO DA  
SERPENTE *Bothropoidesinsularis* SOBRE MACRÓFAGOS RAW 264.7 *in vitro*.**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Alice Maria Costa Martins

**FORTALEZA**

**2013**

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

---

M513e Menezes, Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de  
Estudo dos efeitos do veneno da serpente *Bothropoides insularis* sobre células RAW 264.7 in vitro / Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes. – 2013.  
95 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.  
Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dra. Alice Maria Costa Martins.

1. Bothrops 2. Macrófagos 3. Citotoxinas I. Título.

---

CDD 615.942

**RAMON RÓSEO PAULA PESSOA BEZERRA DE MENEZES**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E DOS EFEITOS DO VENENO DA  
SERPENTE *Bothropoides insularis* SOBRE MACRÓFAGOS RAW 264.7 *in vitro*.**

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

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alice Maria Costa Martins (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista  
Universidade Estadual do Ceará – UECE

---

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

**Dedico essa dissertação a minha família, pelo apoio incondicional às minhas decisões pessoais e profissionais e por tanto se alegrarem com as minhas conquistas.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, Pai e Amigo, pelo amor incondicional e por me dar forças para seguir em frente, apesar de todas as pedras encontradas no caminho.

A minha mãe Sâmia, pelo imenso amor, por tanto me apoiar e acreditar em mim quando eu mesmo não acreditei.

A meu pai Eugênio, pelo orgulho que sente de mim e por me permitir seguir em frente nos meus anseios profissionais.

A minha irmã Thâmisa, pelo companheirismo e por estar ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus demais familiares: avós Maria Sílvia, Enilson, Salete e Franklin; tio Carlos Henrique, tia Margarete, tio Júnior, Luana, tia Roberta, tia Kátia, tia Beth, Lucas e todos os demais que acompanham, de perto ou de longe, minha jornada. Seu apoio e suas orações são essenciais para mim.

A minha orientadora, Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins, por sempre acreditar no meu trabalho e pelos 6 anos de parceria que completamos.

A Tiago, pelo companheirismo, compreensão, e pelos tantos momentos que fazem tudo valer a pena.

A meus queridos amigos, dos quais sou muito dependente, apesar da correria da vida tentar nos distanciar: Rafael Silva, Nardiel Gomes, Samara Gomes, Samara Lopes, Victor Costa, Lucas Apolônio, Lívia Alves, Lyara Freitas, Rachel Sindeaux, Laíse Pereira, Patrícia Luz, Samara Dantas, Nathália Rocha, Felipe Magalhães, Fernando Joca, RaonyMilet, Cíntia Pires, ThialaJosino, Mariana Teixeira, Renan Espíndola, Wanderson Cássio e tantos outros que tem me dado muitas alegrias em todos esses anos. A presença de vocês na minha vida é um presente de Deus.

Um agradecimento especial às amigas e também companheiras de laboratório Dânya Bandeira, Clarissa Perdigão, Natacha Queiroz, Isabel Morais e Lívia Fernandes, que, além da amizade valiosa, me presentearam com importantes auxílios na realização desse trabalho. Essa dissertação não seria possível sem vocês.

Aos demais membros da equipe do Laboratório de Cultivo Celular: Kamila Lopes, Jáder Canuto, Louise Donadello, Gdayllon Meneses, Marcus Felipe, Myleide Portela, Rodrigo Dantas, Patrícia Magalhães, Alba Fabíola e Ticianapraciano, por todo o crescimento que a convivência com vocês me proporcionou, e pelo auxílio direto ou indireto na realização desse trabalho.

Aos demais integrantes do grupo de pesquisa em toxicologia da UFC, em especial aos membros do Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas, e sua coordenadora Profa. Helena Serra Azul.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica, onde dei os primeiros passos na pesquisa científica: Profa. Goretti Queiroz, Mariana Dantas, Thamires Fontenele, Daniel Freire, Jamile Magalhães, Renata Alves e todos os outros que fazem parte desse grupo.

Em especial à Denise Pinto, Clébia Ângela, Saulo Magalhães, Saulo Bezzato e Thamires Fontenele, pelo apoio, compreensão e companheirismo em tantos momentos.

Ao professor Marcos Toyama por ceder a substância objeto de estudo desse trabalho.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, em especial às professoras doutoras Helena Serra Azul e Letícia Lotufo por todo o suporte dado nesses dois anos.

À secretária do Programa Aura Rhanes, pela paciência e prestatividade.

E a todos os demais que, de alguma forma estiveram presentes na minha vida, meu muito obrigado!

**“[...] Bom mesmo é ir à luta com determinação,  
abraçar a vida com paixão,  
perder com classe e vencer com ousadia,  
porque o mundo pertence a quem se atreve,  
e a vida é muito para ser insignificante.”**

**(Augusto Branco)**

## RESUMO

Em todo o mundo, são registrados mais de 3 milhões de acidentes envolvendo picadas de animais peçonhentos por ano, das quais 125 a 150 mil culminam em óbito. No Brasil, a maioria dos casos ocorre com serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Bothropoides*, provocando uma grande variedade de complicações locais e sistêmicas, dentre os quais se destacam efeito mionecrótico, coagulação intravascular disseminada, citotoxicidade, insuficiência renal aguda e sepse. A serpente *Bothropoides insularis* é uma espécie nativa da Ilha de Queimada Grande, cujo veneno apresenta efeito tóxico acentuado em diversos modelos experimentais. Entretanto, pouco é conhecido a respeito do efeito dessa peçonha sobre células com função de defesa, nem o quanto esse efeito pode influenciar na toxicidade observada *in vivo*. O presente trabalho teve como objetivo investigar as alterações celulares induzidas pelo veneno total da serpente *Bothropoides insularis* (BinsVT) sobre macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7. Nesse contexto, foi realizada a determinação da atividade proteolítica e da produção de peróxido de hidrogênio *in vitro* de BinsVT através de reações colorimétricas. Os resultados demonstraram alta atividade catalítica em ambos os testes, sugerindo que os efeitos biológicos desse veneno podem estar relacionados à presença de enzimas como metaloproteinasas (svMPs) e L-aminoácido oxidases (LAAOs) em concentrações relevantes nas condições experimentais adotadas. A determinação do potencial citotóxico foi realizada pelo método de redução do MTT, um teste de avaliação da capacidade oxirredutora das células, após 2, 6, 12 e 24 horas de incubação. Foi observado efeito citotóxico em altas concentrações de forma tempo-dependente, com morte celular mais pronunciada nas concentrações de 200 e 100 µg/mL após 12 e 24 horas de tratamento. Nas menores concentrações estudadas, ocorreu um aumento gradativo da viabilidade celular, com valores percentuais em torno de 200% em relação ao grupo controle nos grupos tratados por 24 horas. Esse resultado sugere a presença de efeito proliferativo de BinsVT sobre essa linhagem celular. Em seguida, a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante de cultivo dos grupos experimentais foi determinado para investigação de lise celular induzida por BinsVT. Foi verificado aumento significativo da atividade dessa enzima em todos os grupos testados, sugerindo a coexistência de frações com efeito proliferativo e citotóxico, e a concentração e o tempo de exposição do veneno determinam qual irá prevalecer. Para avaliação morfológica das células RAW 264.7 após exposição à substância em estudo, os experimentos foram realizados na superfície de lamínulas, para coloração com May-Grunwald Giemsa. Os grupos experimentais foram analisados por microscopia óptica e as características morfológicas mais representativas foram fotomicrografadas. Foram observadas diversas alterações morfológicas, tais como aparecimento de fragmentos celulares e núcleos desnudos, células vacuolizadas, redução do volume celular e aumento de projeções citoplasmáticas. Por fim, o mecanismo de morte celular induzida por BinsVT foi avaliado por citometria de fluxo, pela marcação com o iodeto de propídio (PI) e a anexina V-FITC. A análise revelou a presença de envolvimento necrótico e apoptótico no efeito citotóxico da substância, além do aparecimento de células marcadas duplamente com PI e anexina-FITC, indicando a ocorrência de apoptose tardia. Em conclusão, BinsVT apresenta efeito citotóxico sobre macrófagos RAW 264.7, com aparente envolvimento de necrose e apoptose, além de provável efeito estimulatório sobre essas células, de forma concentração- e tempo-dependente. Esses efeitos podem estar relacionados às atividades enzimáticas encontradas *in vitro*.

Palavras-Chave: *Bothropoides insularis*; macrófagos murinos; citotoxicidade.

## ABSTRACT

Around the world, there are recorded over 3 million accident involving bites of venomous animals per year, of which 125 to 150 thousand culminate in death. In Brazil, most cases occur with snakes from *Bothrops* and *Bothropoides* genus, causing several local and systemic complications, such myotoxicity, disseminated intravascular coagulation, cytotoxicity, acute renal failure and sepsis. *Bothropoides insularis* is a snake from Queimada Grande Island, whose venom shows pronounced toxicity. However, its effect over cells with defense function remains unclear, as well as how these effects can influence the toxicity observed *in vivo*. The present study aimed to investigate the cellular changes induced by *Bothropoides insularis* whole venom (BinsVT) over murine macrophage from RAW 264.7 lineage. In this context, colorimetric tests were performed to determine proteolytic activity and the production of hydrogen peroxide *in vitro*. The results showed high catalytic activity in both tests, suggesting that the biological effects of this venom may be related to the presence of enzymes such metalloproteinases (svMPs) and L-amino acid oxidases (LAAOs) at concentrations relevant in these experimental conditions. The determination of the cytotoxic potential was conducted by MTT reduction assay, a method of assessing redox metabolism, after 2, 6, 12 and 24 hours of incubation. It was observed cytotoxic effect at high concentrations in a time-dependent way, with cell death more evident at 200 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  after 12 and 24 hours of treatment. In lower concentrations, there was a gradual increase in cell viability, reaching around 200% of cell viability in groups treated for 24 hours. This result suggests that BinsVT possess proliferative effect over these cells. Then, lactate dehydrogenase (LDH) activity was determined in culture supernatants from experimental groups for investigation of cell lysis induced by BinsVT. It was observed a significant increase in enzymatic activity in all groups, suggesting the coexistence of fractions with cytotoxic and proliferative effect and that concentration and exposure time determine its outcomes. For morphological evaluation of RAW 264.7 cells after exposure to BinsVT, the experiments were performed on the surface of coverslips for staining with May-Grunwald Giemsa method. The experimental groups were analyzed by optical microscopy and the most representative morphological characteristics were photographed. Various morphological changes were observed, such as appearance of cellular debris and bare nuclei, vacuolated cells, reduced cell volume and increased cytoplasmic projections. Finally, the mechanism of cell death induced by BinsVT was assessed by flow cytometry, by staining with propidium iodide (PI) and annexin V-FITC. The analysis revealed the presence of apoptosis and necrosis, and the appearance of doubly labeled cells with Annexin-FITC and PI, indicating the occurrence of late apoptosis. In conclusion, BinsVT has a cytotoxic effect on RAW 264.7 cell, which necrotic and apoptotic mechanisms, besides stimulatory effect on these cells in dose- and time-dependent ways. These effects may be related to the enzymatic activities found *in vitro*.

Keywords: *Bothropoides insularis*; murine macrophages; cytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Famílias e gêneros da Fauna Brasileira com importância médica.	20
<b>Figura 2.</b>	Características morfológicas de reconhecimento de espécies de serpente da <i>Viperidae</i> .	21
<b>Figura 3.</b>	Fosseta loreal ausente e presa inoculadora de veneno pequena, morfologias características do gênero <i>Micrurus sp.</i>	21
<b>Figura 4.</b>	Fluxograma de reconhecimento de serpentes peçonhentas.	22
<b>Figura 5.</b>	<i>Bothropoides insularis</i> .	23
<b>Figura 6.</b>	Alterações locais promovidas por acidentes botrópicos.	25
<b>Figura 7.</b>	Composição geral dos venenos de serpentes.	27
<b>Figura 8.</b>	Desidrogenação de L-aminoácidos catalizada pela LAAO.	29
<b>Figura 9.</b>	Esquema de classificação das metaloproteinases de venenos de serpente.	31
<b>Figura 10.</b>	Características morfológicas da apoptose e da necrose.	32
<b>Figura 11.</b>	Etapas do processo de morte celular por apoptose.	33
<b>Figura 12.</b>	Vias de sinalização da apoptose.	34
<b>Figura 13.</b>	Cultivo e tratamento das células RAW 264.7 com veneno total da serpente <i>Bothropoides insularis</i> em placas de 96 poços.	46
<b>Figura 14.</b>	Ensaio de redução do 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).	47
<b>Figura 15.</b>	Reações de metabolismo anaeróbico catalisadas pela enzima Lactato Desidrogenase (LDH).	48
<b>Figura 16.</b>	Princípio do teste de determinação da liberação de lactato desidrogenase (LDH) <i>in vitro</i> .	49
<b>Figura 17.</b>	Princípio de leitura por citometria de fluxo.	51

<b>Figura 18.</b>	Processamento de amostras de células RAW 264.7 tratadas com o veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i> para avaliação de alterações celulares em citômetro de fluxo.	52
<b>Figura 19.</b>	Efeito proteolítico do veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i> (BinsVT) sobre solução de azocaseína.	55
<b>Figura 20.</b>	Efeito do veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i> (BinsVT) sobre a produção de peróxido <i>in vitro</i> .	57
<b>Figura 21.</b>	Efeito do veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i> sobre a viabilidade de células RAW 264.7, avaliado pelo método de redução do MTT após 2 horas de incubação com BinsVT.	58
<b>Figura 22.</b>	Efeito do veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i> sobre a viabilidade de células RAW 264.7, avaliado pelo método de redução do MTT após 6 horas de incubação com BinsVT.	59
<b>Figura 23.</b>	Efeito do veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i> sobre a viabilidade de células RAW 264.7, avaliado pelo método de redução do MTT após 12 horas de incubação com BinsVT.	59
<b>Figura 24.</b>	Efeito do veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i> sobre a viabilidade de células RAW 264.7, avaliado pelo método de redução do MTT após 24 horas de incubação com BinsVT.	60
<b>Figura 25.</b>	Liberação percentual da enzima lactato desidrogenase (LDH) de células RAW 264.7 induzida pelo veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i> após 2 horas de tratamento.	61
<b>Figura 26.</b>	Liberação percentual da enzima lactato desidrogenase (LDH) de células RAW 264.7 induzida pelo veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i> após 6 horas de tratamento.	62
<b>Figura 27.</b>	Liberação percentual da enzima lactato desidrogenase (LDH) de células RAW 264.7 induzida pelo veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i> após 12 horas de tratamento.	62
<b>Figura 28.</b>	Liberação percentual da enzima lactato desidrogenase (LDH) de células RAW 264.7 induzida pelo veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i> após	63

24 horas de tratamento.

- Figura 29.** Alterações morfológicas induzidas por BinsVT em células RAW 264.7 após 2 horas de incubação, observadas após coloração May-Grunwald Giemsa. 65
- Figura 30.** Alterações morfológicas induzidas por BinsVT em células RAW 264.7 após 6 horas de incubação, observadas após coloração May-Grunwald Giemsa. 66
- Figura 31.** Alterações morfológicas induzidas por BinsVT em células RAW 264.7 após 12 horas de incubação, observadas após coloração May-Grunwald Giemsa. 67
- Figura 32.** Alterações morfológicas induzidas por BinsVT em células RAW 264.7 após 24 horas de incubação, observadas após coloração May-Grunwald Giemsa. 68
- Figura 33.** Avaliação do tipo de morte celular envolvido no efeito veneno da serpente *Bothropoides insularis* sobre células RAW 264.7 após 24 horas de incubação. 69
- Figura 34.** Avaliação do tipo de morte celular envolvido no efeito veneno da serpente *Bothropoides insularis* sobre células RAW 264.7 após 24 horas de incubação. 70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Efeito proteolítico do veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i> em diferentes concentrações sobre solução de azocaseína.	56
<b>Tabela 2.</b>	Concentração de peróxido de hidrogênio produzido por diferentes concentrações do veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i> .	57
<b>Tabela 3.</b>	Viabilidade celular de células RAW 264.7 tratadas com BinsV em diferentes concentrações e tempos.	60
<b>Tabela 4.</b>	Liberação de LDH de células RAW 264.7 induzida pelo veneno da serpente em diferentes concentrações e tempos.	63
<b>Tabela 5.</b>	Avaliação do tipo de morte celular envolvido no efeito veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i> sobre células RAW 264.7 após 24 horas de incubação.	70

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1	Aspectos gerais e epidemiológicos sobre acidentes ofídicos no Brasil	17
1.2	Serpentes da Fauna Brasileira	18
1.2.1	<i>Gêneros Bothrops e Bothropoides</i>	22
1.2.2	<i>Bothropoides insularis</i>	23
1.3	Composição e efeitos biológicos de venenos botrópicos	24
1.3.1	<i>Composição geral dos venenos botrópicos</i>	26
1.3.2	<i>Frações de venenos botrópicos com importância biológica.</i>	27
1.4	Mecanismos de Morte Celular	31
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>38</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
3.1	Objetivo geral	42
3.2	Objetivos específicos	42
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>43</b>
4.1	Obtenção da substância em estudo e preparo das soluções de trabalho.	44
4.2	Ensaio de atividade enzimática <i>in vitro</i> do veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i> .	44
4.2.1	<i>Atividade proteolítica.</i>	44

4.2.2	<i>Produção de peróxido de hidrogênio.</i>	44
4.3	<b>Cultivo, manutenção e tratamento das células RAW 264.7.</b>	45
4.4	<b>Determinação do efeito citotóxico do veneno total da serpente <i>Bothropoides insularis</i> sobre macrófagos murinos.</b>	46
4.4.1	<i>Teste de redução do MTT</i>	46
4.4.2	<i>Determinação da liberação de lactato desidrogenase</i>	47
4.5	<b>Determinação das alterações morfológicas induzidas pelo veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i> em macrófagos murinos.</b>	49
4.6	<b>Análise do tipo de morte celular induzida pelo veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i> por citometria de fluxo.</b>	50
4.7	<b>Análise estatística</b>	53
5.	<b>RESULTADOS</b>	54
5.1	<b>Atividade proteolítica <i>in vitro</i> do veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i>.</b>	55
5.2	<b>Produção <i>in vitro</i> de peróxido de hidrogênio induzida pelo veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i>.</b>	56
5.3	<b>Efeito do veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i> sobre a viabilidade de macrófagos murinos.</b>	58
5.4	<b>Efeito do veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i> sobre a liberação da enzima lactato desidrogenase.</b>	61
5.5	<b>Alterações morfológicas induzidas pelo veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i>.</b>	64
5.6	<b>Mecanismo de morte celular envolvido no efeito citotóxico do veneno da serpente <i>Bothropoides insularis</i>.</b>	69
6.	<b>DISCUSSÃO</b>	71

**7. CONCLUSÕES** **77**

**REFERÊNCIAS** **79**

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos sobre acidentes ofídicos no Brasil

Venenos de serpentes são compostos de uma complexidade de substâncias ativas, a maioria delas com estrutura protéica, que exercem um papel importante no processo de sobrevivência desses animais. Devido às necessidades de defesa e captura de presas, as serpentes desenvolveram evolutivamente uma grande variedade de toxinas peptídicas. Essas moléculas possuem diversos alvos biológicos, apresentando, portanto, vários efeitos importantes. A caracterização dos efeitos específicos das frações de venenos ofídicos é de profunda importância para o entendimento das alterações patológicas decorrentes do envenenamento (GARCIA e LEWIS, 2003).

A incidência mundial de acidentes ofídicos e sua gravidade são desconhecidos. Estudos recentes estimam a ocorrência de 3 a 5,4 milhões de eventos por ano, resultando em cerca de 125 a 150 mil mortes por ano (BARONE *et al.*, 2011). Sabe-se que os acidentes mais graves acontecem nos países pobres de regiões tropicais e subtropicais. Entretanto, nesses países a notificação desses casos também é subestimada, sendo por muitas vezes tratados com métodos ultrapassados e procedimentos não-efetivos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2002).

Envenenamentos causados por animais peçonhentos constituem um grave problema de saúde pública, principalmente na América Latina, África e Ásia (ANTUNES *et al.*, 2010). Na Europa, Estados Unidos e Canadá, os casos de envenenamento são raros. Na África, paralelamente, a ocorrência desses acidentes é subnotificada, sendo desconhecida a incidência real. No continente asiático, Paquistão, Índia e Birmânia são os países com maior frequência de casos, responsáveis por cerca de 30 mil óbitos por ano (CHIPPAUX, 1998).

Dentre os países latinos, o Brasil ocupa a primeira colocação em número de casos, com cerca de 20 mil por ano, seguido pelo Peru (4500), Venezuela (2500 a 3 mil) e Colômbia (2675) (WARRELL, 2004). No Brasil, os dados sobre os casos de envenenamento são coletados através de alguns sistemas de notificação, como o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN/MS), Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas da Fundação Oswaldo Cruz (SINITOX/FIOCRUZ/MS) e o Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIM/SUS). Apesar da existência desses programas, sabe-se que a quantidade de casos é muito superior à quantidade registrada, devido, entre outros fatores, às dificuldades de acesso aos serviços de saúde, principalmente

no campo (LEMOS *et al.*, 2009). O Sinan registrou, no ano de 2012, 19946 casos de acidentes ofídicos em humanos no Brasil, sendo a família *Viperidae* envolvida em 82,7% dos casos, e a família *Elapidae*, em 0,9% (BRASIL, 2012).

Em 2003, Bochner e Struchiner realizaram um levantamento de acidentes ofídicos notificados entre 1901 e 2000. Percebeu-se que o perfil de acidentes não se alterou durante todo o século, acontecendo principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino entre 15 e 49 anos, no início e final de cada ano. Os principais locais de picada são os membros inferiores, sendo o gênero *Bothrops* o mais envolvido. A sazonalidade dos acidentes ofídicos é muito variada nas diferentes regiões do Brasil. Entretanto, há uma hipótese aceita de que o aumento dos casos esteja relacionado ao período chuvoso e de altas temperaturas, em que as espécies residentes próximas às margens de rios se deslocam a procura de terra firme, facilitando seu contato com o homem (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

No estado do Ceará foram notificados 445 casos envolvendo picadas de serpentes peçonhentas em 2012, tendo sido 68,1% atribuídos aos gêneros *Bothrops sp.* e *Bothropoides sp.*, 8,3% ao gênero *Crotalus sp.*, 1,6% ao gênero *Micrurus sp.* e 0,9% ao gênero *Lachesis sp.* (BRASIL, 2012). Esses dados corroboram com os dados encontrados por Rocha (2008), que encontraram uma prevalência de 74,2% de casos envolvendo o gênero *Bothrops*. Como o gênero *Bothropoides* sofreu alterações taxonômicas nos últimos anos, os dados incluem também esse gênero (FENWICK, 2009).

## 1.2 Serpentes da Fauna Brasileira

As serpentes estão classificadas no reino *Animalia*, filo *Chordata*, classe *Reptilia*, subclasse *Lepdosaura*, ordem *Squamata*, subordem *Serpentes*. Esses animais estão presentes praticamente em todo o mundo, constituem o maior número de répteis vivos e totalizam aproximadamente 3 mil espécies, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias (HICKMAM *et al.*, 2004). 75 gêneros estão presentes no Brasil, agrupadas em 10 famílias, somando 371 espécies. Dessas, apenas 2 famílias, *Viperidae* e *Elapidae*, são consideradas peçonhentas, ou seja, espécies que possuem glândula produtora de veneno e aparelho inoculador, causando intoxicações em humanos e animais (CARDOSO, 2003; BÉRNILS, 2010).

A família *Elapidae* compreende 55 gêneros, entre eles o gênero *Micrurus*, que apresenta mais de 50 espécies em todo o mundo. No Brasil, foram catalogadas 18 espécies

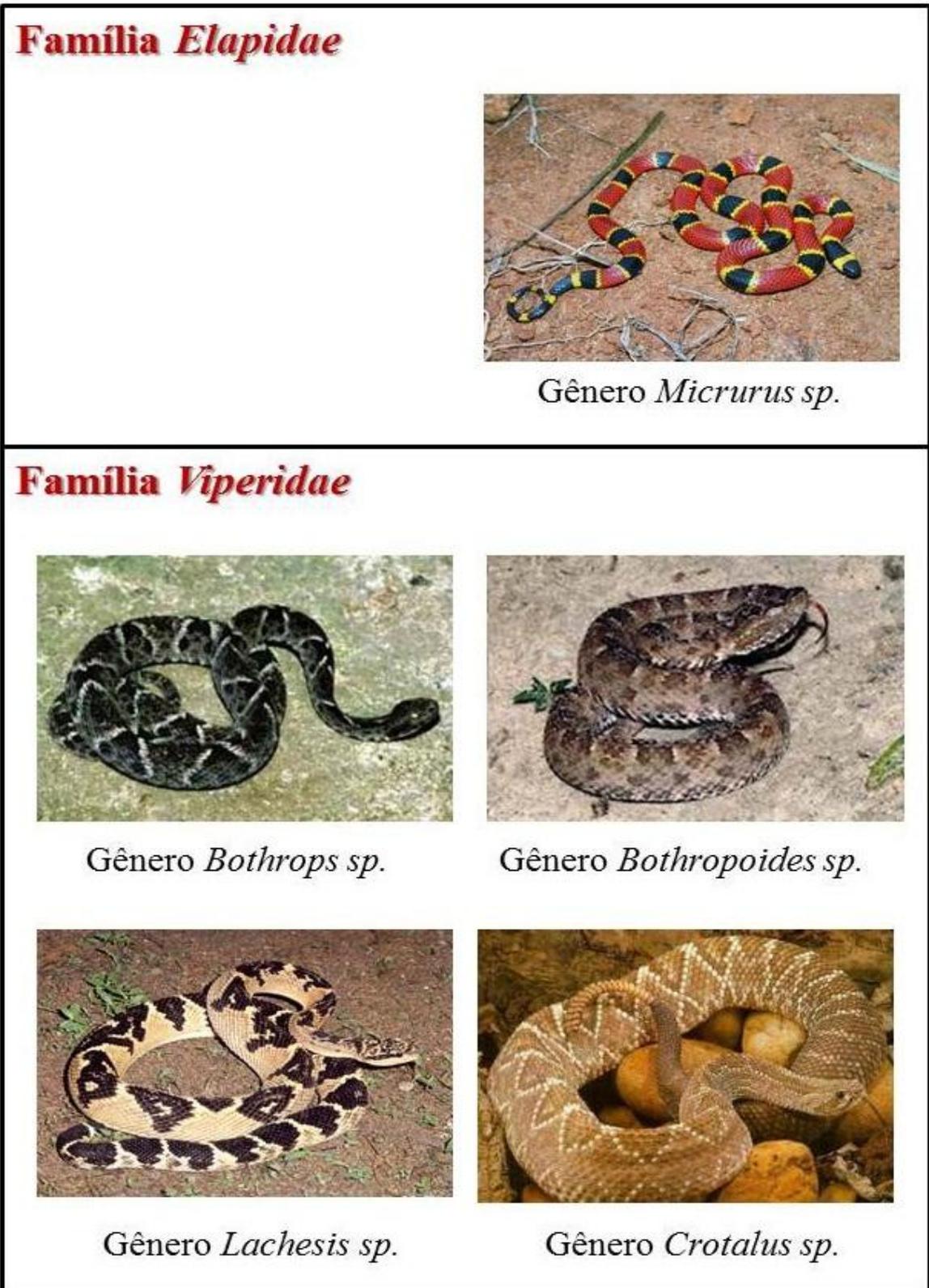
desse gênero distribuídas em todo o território nacional. São conhecidas como coral-verdadeira, coral-venenosa, ibiboboca, ibiboca e ibioca. São serpentes de pequeno porte, reconhecidas por sua coloração viva. Seu veneno, cuja toxicidade principal é relacionada a seu efeito neurotóxico, é constituído principalmente de proteínas de baixo peso molecular, que se espalham rapidamente na presa, levando-a à morte em poucos minutos (WHITE *et al.*, 2003).

A família *Viperidae* é composta pelos gêneros *Bothrops*, *Bothropoides*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Rhinocerophis*, *Crotalus* e *Lachesis*. Esses gêneros estão distribuídos por todo o mundo e são responsáveis pelos principais acidentes ofídicos no Brasil, tanto pela quantidade quanto pela severidade dos casos (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 2003). O Brasil possui 4 gêneros de importância médica: *Bothrops* e *Bothropoides*, ambos conhecidos genericamente como jararacas; *Crotalus*, que constituem as cascavéis; e *Lachesis*, chamadas popularmente de surucucus (BRASIL, 2001). A figura 1 ilustra exemplos de serpentes de importância clínica no Brasil.

Algumas características morfológicas são utilizadas para diferenciar serpente peçonhentas e não-peçonhentas. O conhecimento dessas diferenças é de grande importância, pois auxiliam a notificação correta dos casos, além de permitir à população identificar possíveis riscos nas regiões onde habitam. De maneira geral, 3 características são analisadas para facilitar o reconhecimento das serpentes da família *Viperidae*: cabeça triangular; presença de fosseta loreal, um orifício localizado entre o olho e a narina do animal, com função termossensorial, permitindo o movimento e a caça noturna (Figura 2a); presença de presas inoculadoras de veneno bem desenvolvidas e móveis na região anterior do maxilar (Figura 2b); e estrutura da cauda: Gêneros *Bothrops* e *Bothropoides* apresentam cauda lisa; gênero *Lachesis*, cauda com escamas eriçadas; e o gênero *Crotalus*, cauda com chocalho (Figura 2c) (BRASIL, 2001).

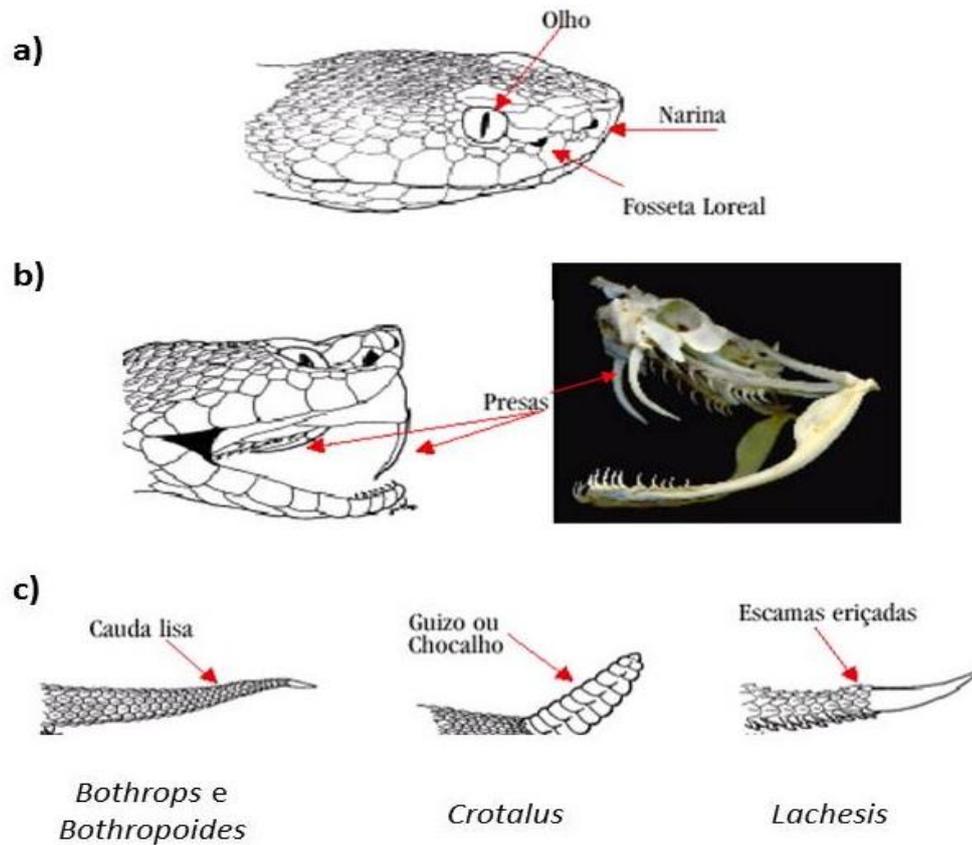
As espécies peçonhentas da família *Elapidae* são reconhecidas pela ausência de fosseta loreal e por presas inoculadoras pouco desenvolvidas e fixas na porção anterior da boca (Figura 3). A figura 4 ilustra o fluxograma de diferenciação de serpentes peçonhentas e não-peçonhentas.

Figura 1. Famílias e gêneros da Fauna Brasileira com importância médica.



Fonte: Adaptado de <http://www.fiocruz.br>.

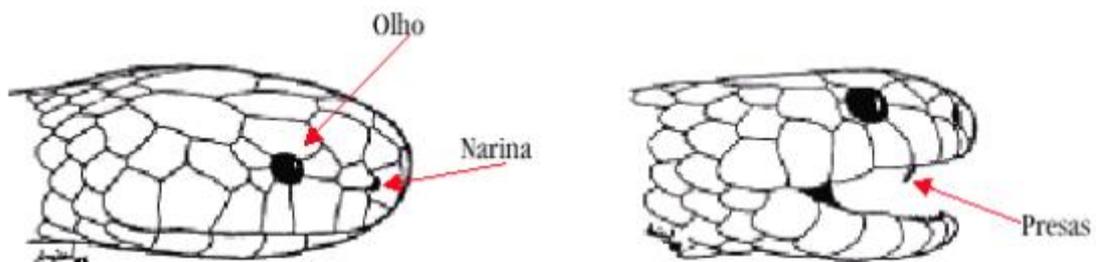
**Figura 2.** Características morfológicas de reconhecimento de espécies de serpente da *Viperidae*.



Legenda: a) Fosseta loreal; b) Presas inoculadoras de veneno; c) Caudas características dos gêneros *Bothrops*, *Bothropoides*, *Crotalus* e *Lachesis*.

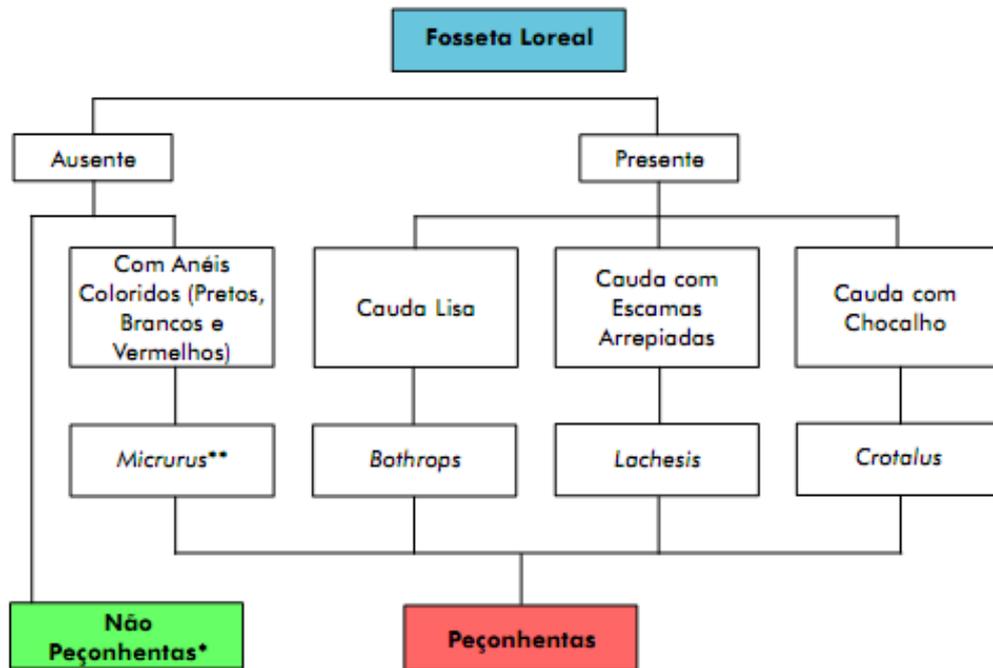
**Fonte:** Adaptado de BRASIL, 2001.

**Figura 3.** Fosseta loreal ausente e presa inoculadora de veneno pequena, morfologias características do gênero *Micrurus sp.*



**Fonte:** BRASIL, 2001.

**Figura 4.** Fluxograma de reconhecimento de serpentes peçonhentas.



Fonte: BRASIL, 2001.

\* As falsas corais podem apresentar o mesmo padrão de coloração das corais verdadeiras, sendo distinguíveis pela ausência de dente inoculador.

\*\* Na Amazônia, ocorrem corais verdadeiras desprovidas de anéis vermelhos.

### 1.2.1 Gêneros *Bothrops* e *Bothropoides*

Na América do Sul, os gêneros *Bothrops* e *Bothropoides* são bem estudados, devido a sua importância epidemiológica em países como Brasil, Equador, Colômbia, Bolívia e Peru (HIGUCHI *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2010). Esse gênero é composto de 23 espécies, sendo caracterizadas por possuírem cauda sem modificações, geralmente com escamas subcaudais em pares, aparelho inoculador do tipo solenóglifo, cabeça triangular e fosseta loreal. Seu habitat preferido são ambientes úmidos como maras e áreas cultivadas. Possuem hábitos noturnos ou crepusculares, são consideradas agressivas e atacam sem causar ruído (ALBUQUERQUE *et al.*, 2004; MELGAVAREJO, 2003).

Em 2009, foi proposta por Fenwick a retirada e agrupamento de algumas espécies do gênero *Bothrops*, tendo sido levadas em considerações características morfológicas e moleculares, além da criação de uma nova espécie. Essas serpentes foram agrupadas no gênero *Bothropoides*, constituído de 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 classificação é atualmente aceita e fornecida pela Sociedade Brasileira de Herpetologia.

### 1.2.2 *Bothropoides insularis*

A serpente *Bothropoides insularis* (jararaca-ilhoa) (figura 5) é nativa da ilha de Queimada Grande, situada a 35 Km da costa sul do Estado de São Paulo (MARQUES *et al.*, 2002; VALENTE *et al.*, 2009). Foi descrita em 1921 pelo herpetólogo Afrânio do Amaral. Acredita-se que a diferenciação dessa espécie ocorreu a partir da *B. jararaca*, provocada pela separação geográfica entre ilha e continente (DUARTE *et al.*, 1995; AMARAL, 1920). Embora possa ser encontrada em áreas cobertas de capim, sua preferência é a habitação em locais de Mata Atlântica. Possui coloração amarelo claro, hábitos diurnos e geralmente é arborícola. Sua dieta é baseada em pássaros migratórios, capturados tanto no chão quanto nas árvores. Wüster *et al.* (2005) observaram que seu veneno apresenta toxicidade muito maior que o veneno de *B. jararaca* em aves. A população estimada de serpentes na ilha é em torno de 1500 a 2000 unidades na extensão dos 30 hectares de floresta da ilha, representando cerca de 50 a 70 serpentes por hectare (MARQUES e SAZIMA, 2009).

**Figura 5.** *Bothropoides insularis*.



Fonte: [www.biologados.com](http://www.biologados.com)

O veneno de *B. insularis* apresenta características semelhantes aos das outras serpentes do gênero com potência 14 vezes maior (BUTANTAN, 1996). Possui atividade coagulante, fibrinolítica (MEBS, 1970), fosfolipásica, trombina-símile (LÔBO-ARAÚJO *et al.* *apud* COGO *et al.*, 2003), potencializadora de bradicinina (CINTRA *et al.*, 1990), hemorrágica e mionecrótica (SELISTRE *et al.*, 1990). Diversas frações biologicamente ativas foram isoladas dessa peçonha. Por análise proteômica, foi identificado um peptídeo com estrutura relativa a um inibidor de trombina (OLIVEIRA-CARVALHO *et al.*, 2008). Recentemente foram purificadas frações L-aminoácido oxidase (LAAO), fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e Lectina-C com efeito nefrotóxico (BRAGA *et al.*, 2006; BRAGA *et al.*, 2008a; BRAGA *et al.*, 2008b). Além disso, a proteômica desse veneno revela a presença de frações com estruturas de serinoproteases e fatores de crescimento (VALENTE *et al.*, 2009).

### 1.3 Composição e efeitos biológicos de venenos botrópicos

A peçonha botrópica é extremamente complexa e compreende uma variedade de substâncias farmacologicamente ativas que atuam sinergicamente na indução das alterações fisiopatológicas decorrentes do envenenamento, responsáveis pelo desenvolvimento de lesões locais e sistêmicas, e alterações no local do acidente que se desenvolvem rapidamente após o envenenamento (GOMES *et al.*, 2010).

Dentre os efeitos locais mais frequentes observados após os acidentes ofídicos, destacam-se dor intensa, edema, hemorragia local e inflamação. Com frequência o quadro clínico progride com aparecimento de necrose tecidual (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995) (Figura 6). A magnitude desses efeitos é dependente de vários fatores, como tipo de peçonha, quantidade de veneno injetada e condição de saúde do hospedeiro. Em muitos casos, são observadas complicações como degeneração muscular e isquemia, as quais podem culminar na amputação do membro afetado (WARRELL, 2010). Acredita-se que alguns efeitos, como mionecrose e hemorragia, são relacionados a efeitos diretos de toxinas sobre células musculares e endoteliais respectivamente. Edema e infiltrado inflamatório, por outro lado, são provavelmente induzidos pela produção local de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, eicosanoides e aminas vasoativas (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

**Figura 6.** Alterações locais promovidas por acidentes botrópicos.



Legenda: A) Edema, sangramento e equimose em mão esquerda; B) Sangramento eritematoso e edema no tornozelo direito; C) Equimose, bolhas e edema em pé direito; D) Necrose tecidual grave em perna direita.

**Fonte:** OROPEZA *et al.*, 2000; WHO, 2007; OLIVEIRA, 2008.

Os efeitos sistêmicos mais importantes decorrentes da picada de serpentes peçonhentas incluem coagulopatia, hipotensão arterial, alterações hemodinâmicas, hemólise intravascular disseminada, cardiotoxicidade aguda, edema pulmonar aguda e Insuficiência Renal Aguda (IRA), sendo esta última uma das mais importantes complicações, devido ao grande número de óbitos que ocasiona (SITPRIJA, 2008). Apesar da fisiopatologia da IRA causada por venenos botrópicos ainda não ser completamente elucidada, glomerulonefrite e necrose tubular aguda são alterações comumente observadas. Além disso, sabe-se que as

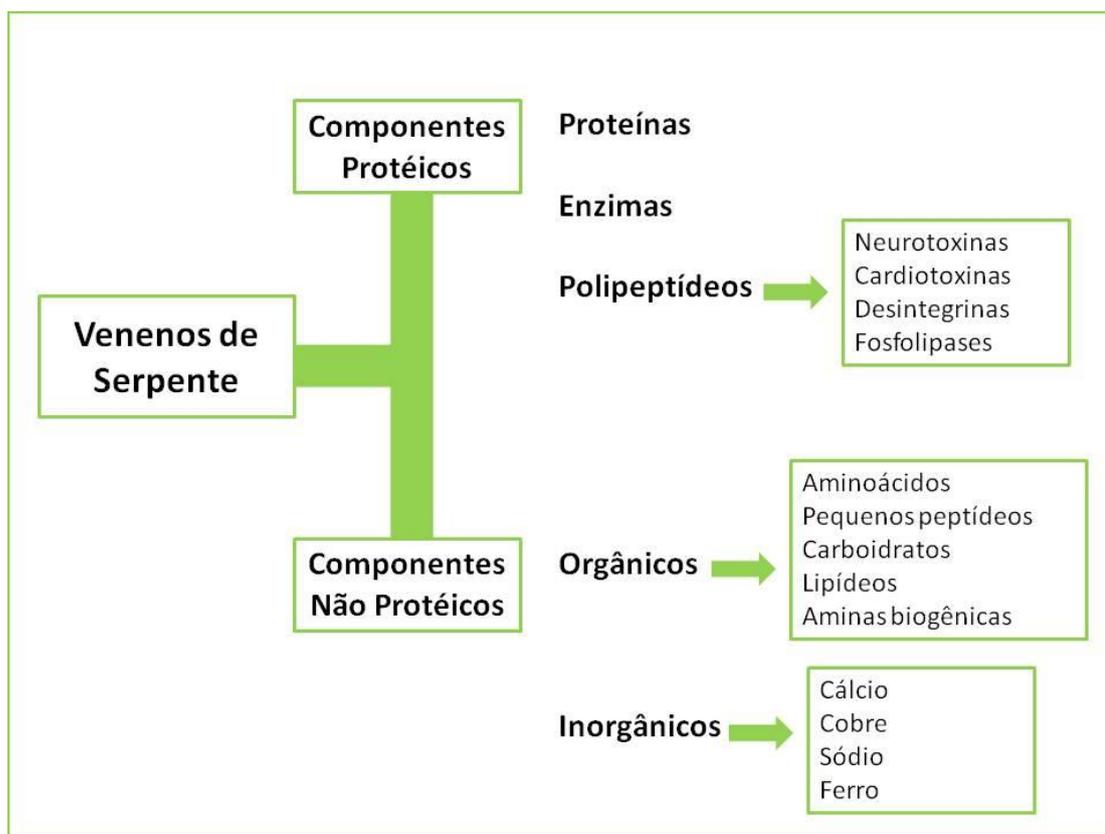
lesões renais podem ser produzidas pela ação isolada ou combinada de diferentes mecanismos isquêmicos e/ou nefrotóxicos (GRISOTTO *et al.*, 2006; DE SOUZA *et al.*, 2008).

### ***1.3.1 Composição geral dos venenos botrópicos***

Os venenos de serpente são misturas complexas contendo componentes protéicos e não-protéicos. Os componentes protéicos correspondem a 95% do peso seco dos venenos, representados por enzimas, proteínas não enzimáticas, além de diversos peptídeos, como neurotoxinas, cardiotoxinas, lecitinas, desintegrinas, peptídeos natriuréticos, proteases, fosfolipases, fosfodiesterases, entre outras, e são os principais responsáveis pela maioria das atividades biológicas características desses venenos; enquanto os componentes não-protéicos incluem constituintes orgânicos e não orgânicos (TU, 1996; MATSUI *et al.*, 2000; RAJENDRA *et al.*, 2004). Os constituintes não orgânicos conhecidos são cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco (FRIEDERICH; TU, 1971) e possuem como possível funções principais: a neutralização das cargas iônicas dos componentes protéicos e a atuação como cofatores importantes para a atividade de outros componentes enzimáticos, como as metaloproteinases (BJARNASON; FOX, 1994). A fração orgânica não protéica é constituída de aminoácidos livres e pequenos peptídeos, carboidratos, lipídios, principalmente fosfolipídios e aminas biogênicas (VARANDA; GIANNINI, 2005) (Figura 7).

Foram identificadas consideráveis variações na composição dos venenos das diferentes famílias, gêneros e espécies, comumente relacionadas a vários fatores como variação sazonal, habitat, dieta, idade e dimorfismo sexual. Essas alterações estão presentes mesmo dentro de uma mesma espécie e são responsáveis pelas variações biológicas encontradas em diversos estudos (ANTUNES *et al.*, 2010).

**Figura 7.** Composição geral dos venenos de serpente.



Fonte: MENEZES, 2010.

### 1.3.2 Frações de venenos botrópicos com importância biológica.

– Fosfolipases A<sub>2</sub>

Dentre as toxinas que compõem os venenos botrópicos estão as fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), enzimas encontradas em diversos tecidos de mamífero e também em venenos de escorpiões, abelhas e serpentes (NICOLAS *et al.*, 1997). Devido ao grande número de efeitos biológicos relacionados à presença dessa enzima em venenos de serpentes, essa fração tem sido amplamente estudada. As PLA<sub>2</sub>s catalisam a hidrólise de glicerofosfolipídios na posição sn-2 da cadeia principal do glicerol, liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos livres (KINI, 2003). Os ácidos graxos podem funcionar como segundos mensageiros celulares ou estar envolvidos em outras reações, como a produção de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxano, mediadores da resposta inflamatória, a partir do ácido araquidônico (VARGAS

*et al.*, 2010). Essa propriedade gera um grande interesse nessa fração, pela interferência na biossíntese de eicosanoides, moléculas importantes em diversas condições fisiológicas e fisiopatológicas (MOREIRA *et al.*, 2011).

As PLA<sub>2</sub>s são classificadas de acordo com sua fonte, sequência de aminoácidos e características bioquímicas (SIX e DENNIS, 2000; MURAKAMI e KUDO, 2002). De acordo com sua localização celular, também são classificadas em citosólicas (cPLA<sub>2</sub>) e secretórias (sPLA<sub>2</sub>) (CHAKRABORTI, 2003), e ainda em dependentes ou independentes de Ca<sup>+2</sup>. As PLA<sub>2</sub> independentes de Ca<sup>+2</sup> (iPLA<sub>2</sub>), apresentam elevado peso molecular (~85kDa) e são encontradas no citosol (BALSINDE e DENNIS, 1997). As fosfolipases extraídas de venenos de serpentes (svPLA<sub>2</sub>s) são constituídas de 120-135 aminoácidos, contendo várias pontes dissulfeto, e possuem estrutura conservada que as caracteriza como PLA<sub>2</sub> (DAVIDSON e DENNIS, 1990).

Atualmente são reconhecidos três tipos diferentes de svPLA<sub>2</sub>: a) as clássicas com ácido aspártico no carbono 49 (Asp 49), que apresentam atividade catalítica; b) as variantes, contendo lisina no carbono 49 (Lys 49); c) as variantes com serina ocupando a posição 49 (Ser 49), sendo estas duas últimas com muito baixa ou nenhuma ação catalítica (OWNBY *et al.*, 1999; LOMONTE *et al.*, 2003). O Asp 49, como parte do sítio de ligação do cálcio, é crítico para a atividade catalítica. As svPLA<sub>2</sub> cataliticamente ativas são peptídeos de baixo peso molecular (aproximadamente 14kDa), apresentam alta estabilidade e uma região estrutural bem conservada. Podem ser monoméricas, homomultiméricas e heteromultiméricas, de forma que um único veneno pode conter várias PLA<sub>2</sub>s (DAVIDSON e DENNIS, 1990).

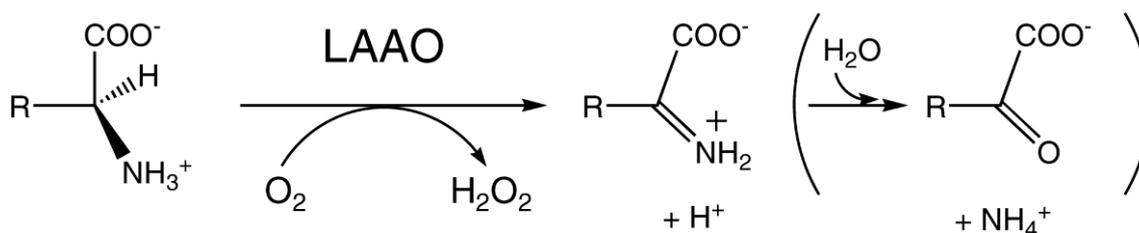
As fosfolipases de venenos de serpentes (svPLA<sub>2</sub>) possuem várias bioatividades, incluindo indução da motilidade de células endoteliais, atividade antimicrobiana, anticoagulante, antitumoral, inibição da agregação plaquetária, neurotoxicidade pré e pós-sináptica, miotoxicidade, cardiotoxicidade, podendo ainda apresentar efeitos convulsivantes, hipotensivos e pró-inflamatórios (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; OWNBY, 1998; SOARES *et al.*, 1998; OWNBY *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2007). Portanto, as svPLA<sub>2</sub> podem exibir uma grande variedade de efeitos farmacológicos, interferindo nos processos fisiológicos normais. Atuam, por exemplo, sobre a cascata de eventos inflamatórios conduzindo ao aumento da permeabilidade microvascular e formação de edema, recrutamento de leucócitos para os tecidos, nocicepção e liberação de mediadores inflamatórios que produzem desordens inflamatórias sistêmicas e locais (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; KOH *et al.*, 2006). Estudos relatam que sua habilidade única de atuar

sobre um órgão ou tecido específico é por conta da elevada afinidade para se ligar a receptores específicos independentemente de sua atividade catalítica (KINI, 2003).

#### – L-Aminoácido Oxidases

As L-aminoácido oxidases (LAAOs) são flavoenzimas, usualmente homodiméricas, de caráter ácido, apresentam FAD (flavina adenina dinucleotídeo) ou FMN (flavinamononucleotídeo) como cofator, possuem massa molecular em torno de 110-150 kDa e catalisam a desaminação estereoespecífica de um L-aminoácido ao seu  $\alpha$ -cetoácido correspondente, com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia, seguindo a reação química ilustrada na figura 8. Estão presentes em diferentes organismos, como bactérias, fungos, algas verdes e serpentes venenosas (DU; CLEMETSON, 2002), e exibem marcada afinidade por aminoácidos hidrofóbicos, incluindo fenilalanina, triptofano, tirosina e leucina (PAWELEK *et al.*, 2000). A toxicidade das LAAOs isoladas de venenos ofídicos (svLAAOs) possivelmente envolve a geração de peróxido de hidrogênio formado como resultado da reoxidação da redução transitória do cofator flavina pelo oxigênio molecular.

**Figura 8.** Desidrogenação de L-aminoácidos catalizada pela LAAO. Os produtos desta reação, os  $\alpha$ -iminoácidos, hidrolisam-se espontaneamente a  $\alpha$ -cetoácido e amônia.



Os equivalentes redutores derivados da desidrogenação são transferidos ao cofator FAD, que é prontamente oxidado pelo oxigênio molecular formando peróxido de hidrogênio.

**Fonte:** MACHEROUX *et al.* 2001; ANDE *et al.*, 2006.

A svLAAOs podem representar 1-9% do total de proteínas que constituem os venenos de serpentes (ALI *et al.*, 2000; DU e CLEMETSON, 2002). Recentemente, as svLAAOs tem se tornado um interessante instrumento farmacológico, bem como modelo estrutural e molecular para estudos biológicos. Embora pouco seja conhecido sobre suas estruturas, a sequência de cDNA de duas svLAAO extraídas de *Crotalus atrox* e

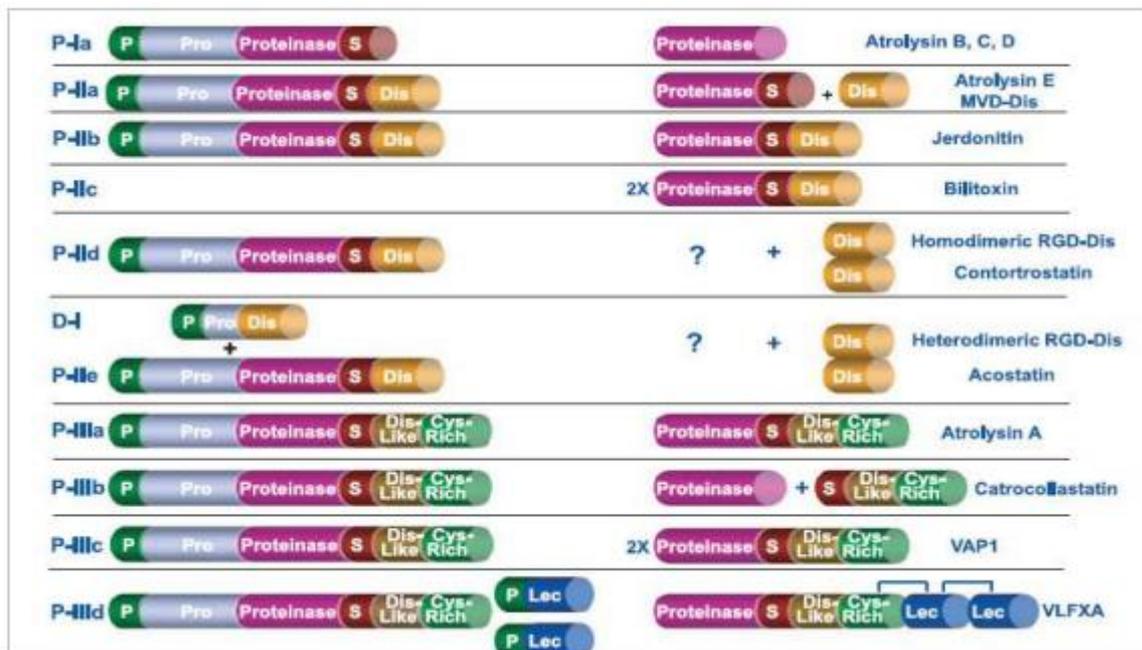
*Crotalus adamanteus* foi determinada e um possível sítio de ligação para FAD e sítios de N-glicosilação foram estabelecidos (RAIBEKAS e MASSEY, 1998; TORII *et al.*, 2000). As svLAAOs apresentam diferenças marcantes em seus efeitos biológicos, como capacidade apoptótica, citotoxicidade, hemólise, efeitos na agregação plaquetária, indução de hemorragia, edema, atividades antibacterianas, leishmanicida, antiviral; efeitos citotóxicos sobre células tumorais (STÁBELI *et al.*, 2004; IZIDORO *et al.*, 2006; STÁBELI *et al.*, 2007; SANT'ANA *et al.*, 2008; VIEIRA SANTOS *et al.* 2008), sendo estes efeitos total ou parcialmente devidos à produção de peróxido de hidrogênio (WEI *et al.*, 2002).

#### – Metaloproteinases

As metaloproteinases isoladas de venenos ofídicos (svMPs) são estruturalmente relacionadas às proteínas de mamíferos, desintegrinas e metaloproteinases envolvidas na ativação e comunicação celular, e com as metaloproteinases de matriz (RUCAVADO *et al.*, 2004). Pertencem à superfamília das metzincinas (BODE *et al.*, 1993), que recebe esse nome devido à presença de domínios de ligação ao zinco, importante para a atividade catalítica das enzimas dessa família. Essas enzimas são classificadas de acordo com seus domínios estruturais, precursores e proteínas geradas após alterações pós-traducionais, em 4 classes básicas com subdivisões, como ilustrado na figura 9. Em algumas classes, há a inclusão de domínios desintegrina (Dis), desintegrina-like (Dis-like), lectina (Lec) e domínios ricos em cisteína (Cys-Rich) (FOX e SERRANO, 2008) (Figura 9).

A especificidade de substrato das svMPs é muito semelhante a das metaloproteinases de matriz (MMPs), envolvendo componentes da membrana basal vascular, produzindo hemorragia (TANJONI *et al.*, 2003). Outros efeitos biológicos das svMPs são atividade lesiva sobre células endoteliais, mionecrose, dermonecrose e inflamação (RUIZ DE TORRENT *et al.*, 1999; GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000). Essas enzimas também tem atividade digestiva sobre proteínas da cascata da coagulação sanguínea, tais como fibrinogênio, fibrina e fator de *Von Willebrand* (LAING e MOURA-DA-SILVA, 2005; SERRANO *et al.*, 2007). Além disso, foram identificados efeitos inibidores sobre a agregação plaquetária através do bloqueio da ligação do colágeno à integrina  $\alpha 2\beta 1$  das plaquetas (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 2001).

**Figura 9.** Esquema de classificação das metaloproteínas de venenos de serpente.



Fonte: FOX e SERRANO, 2008.

#### 1.4 Mecanismos de Morte Celular

O desenvolvimento e a manutenção dos organismos multicelulares dependem de uma interação constante entre as diversas células que constituem seus tecidos e órgãos. Durante o desenvolvimento embrionário, muitas células produzidas em excesso são levadas à morte, um processo através do qual ocorre a formação dos diversos órgãos e sistemas que compõem os seres vivos (MEIER *et al.*, 2000).

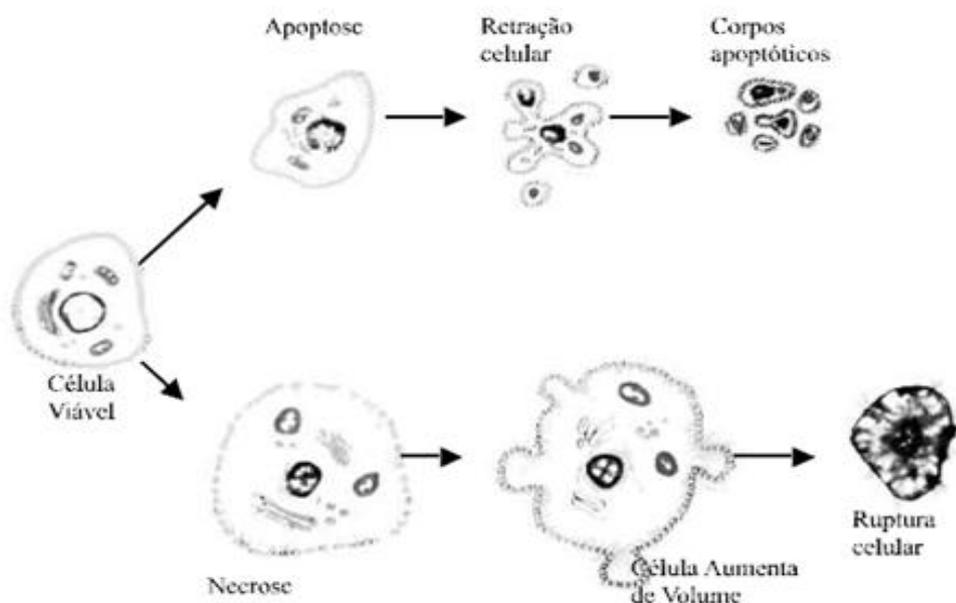
Por muitos anos, acreditou-se que a morte celular era um processo passivo de caráter degenerativo, decorrentes de eventos como lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento, levando a alterações na integridade de membrana citoplasmática, aumento do volume celular, colapso da produção de ATP e perda das demais funções biológicas (YU e CHOI, 2000), processo conhecido como necrose. Esse mecanismo constitui uma forma acidental de morte celular cujas principais características morfológicas são aumento do volume celular, agregação de cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática, lise celular precoce e consequente ruptura celular (Figura 10) com consequente liberação do conteúdo citoplasmático causando dano às células vizinhas além de uma reação inflamatória local (ZIEGLER e GROSCURTH, 2004). Entretanto, embora

considerada uma resposta passiva à injúria celular, estudos recentes já sugerem que a necrose também pode ser regulada geneticamente (ZONG e THOMPSON, 2006).

Atualmente, tipos alternativos de morte celular são reconhecidos, controlado pela expressão gênica e em resposta a diversos estímulos fisiológicos e patológicos (GRIVICICH *et al.*, 2007), denominados genericamente de apoptose. Essa forma de morte celular tem como principais características a ausência de liberação de conteúdo celular, a ausência de reação inflamatória local e dano às células vizinhas e redução do volume celular (KERR *et al.*, 1972). Dessa forma, funciona como um mecanismo de remoção de células lesadas e de renovação celular e tecidual regulada por proteínas que são expressas pelas próprias células durante o processo de injúria (ANAZETTI e MELO, 2007).

Células apoptóticas apresentam morfologia característica, com condensação e fragmentação cromatínica e formação de protuberâncias na superfície celular. Estes prolongamentos da membrana celular aumentam de tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular que são chamados de corpos apoptóticos (ISRAELS e ISRAELS, 1999) (Figura 11). A morte celular por apoptose participa de várias situações fisiológicas tais como o colapso endometrial durante a menstruação, a deleção de células nas criptas intestinais e a embriogênese (GRIVICICH *et al.*, 2007).

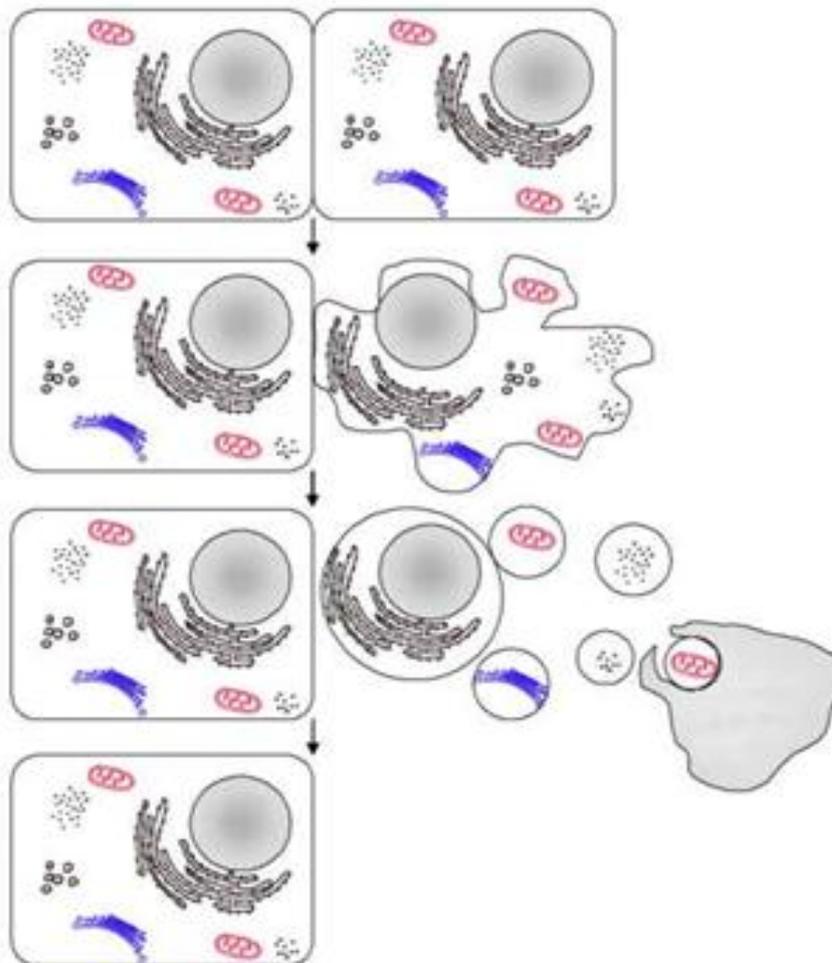
**Figura 10.** Características morfológicas da apoptose e da necrose.



Fonte: GRIVICICH *et al.*, 2007.

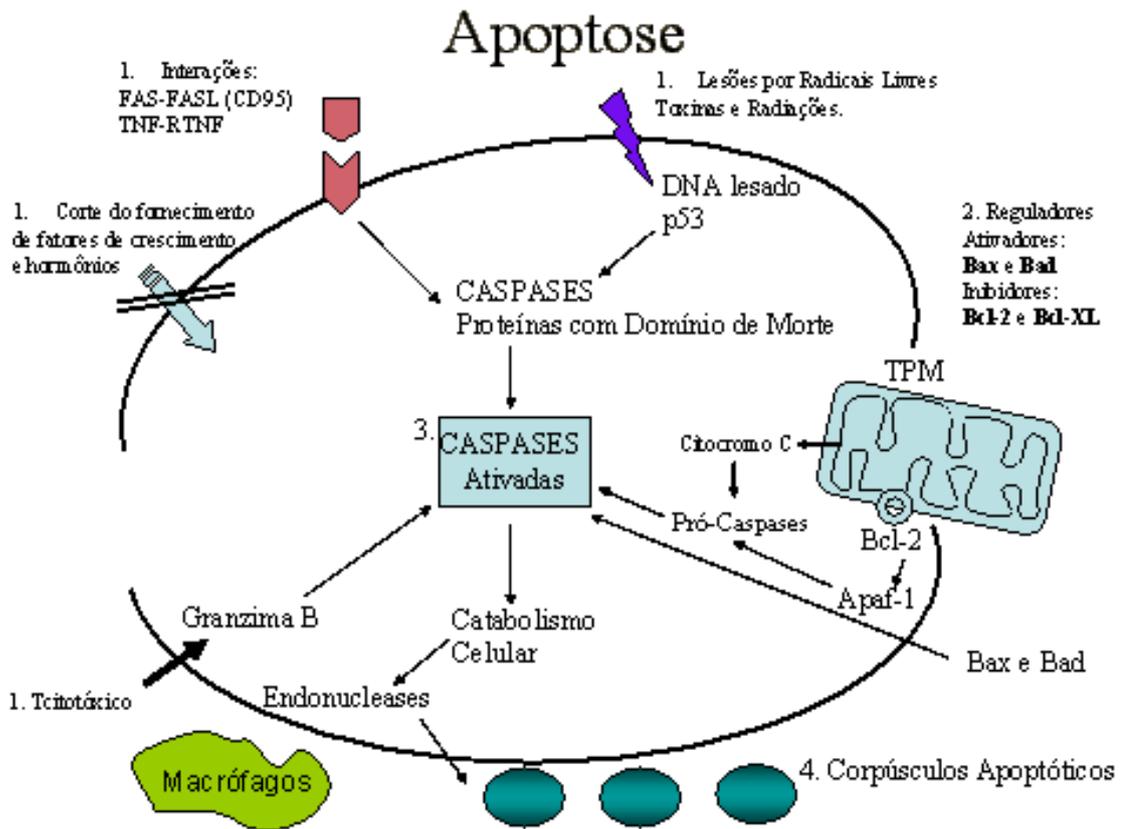
A ativação da morte celular programada pode ocorrer através de duas vias principais: a via extrínseca e a via intrínseca (Figura 12). A primeira é mediada pela ativação de receptores de morte celular localizados na membrana citoplasmática, sendo o fator de necrose tumoral (TNF) e o Fas (membro da família dos receptores de TNF) os mais conhecidos. A via intrínseca depende da participação da mitocôndria, onde há liberação de fatores apoptogênicos como citocromoc, o fator indutor de apoptose (AIF), ATP e proteínas de choque térmico. Como resultado final de ambas as vias, ocorre a ativação das caspases, proteases que quebram proteínas celulares específicas e estão associadas à degradação do DNA (FISHER, 2001; GESKE e GERSCHENSON, 2001; LORO *et al.*, 2003).

**Figura 11.** Etapas do processo de morte celular por apoptose.



Fonte: <http://www.artigosobre.com/Apoptose>

**Figura 12.** Vias de sinalização da apoptose. TPM: transição da permeabilidade mitocondrial.



Fonte: DANTAS, 2010.

Diversos genes estão envolvidos no controle da apoptose, alguns desempenham funções anti-apoptóticas como o gene *TBcl-2*, *TMcl-1* e *TA1* e outros como o *tbx*, o *TBake* o *TBad* agem como promotores da morte celular programada. O gene *TBcl-x*, sintetiza dois produtos, as proteínas *bcl-X<sub>S</sub>* e *bcl-X<sub>L</sub>* que funcionam como indutora e inibidora da apoptose, respectivamente. O gene supressor de tumor, o *TP53*, encontra-se implicado na interrupção do ciclo celular e indução de apoptose nas células com danos irreversíveis no DNA, sendo um regulador positivo da expressão da proteína *bax* e negativo da proteína *bcl-2* (HALE *et al.*, 1996).

Qualquer tipo de injúria celular pode desencadear uma variedade de respostas de adaptação, reparação, proliferação ou morte celular por necrose e/ou apoptose. Pesquisas experimentais com cultura de células evidenciaram que a exposição destas a um mesmo agente tóxico, como um pro-oxidante, por exemplo, pode desencadear morte celular das

mesmas por necrose ou apoptose, a depender da dose e do tempo de exposição ao agente indutor (DYPBUKT, *et al.*, 1994; BONFOCO *et al.*, 1995).

Nos últimos anos, com o desenvolvimento de técnicas de análise celular especializada, tem sido identificados efeitos necróticos e apoptóticos em venenos botrópicos e suas frações isoladas, cujos mecanismos podem estar intimamente associados aos efeitos lesivos dessas substâncias. O veneno de *B. leucurus* induz em apoptose em células tubulares renais e tumorais, com redução do potencial transmembrânico e aumento da concentração intracelular de íons cálcio (NUNES *et al.*, 2012; DE MORAIS *et al.*, 2013). Além disso, a jararhagin, metaloproteinase isolada do veneno de *B. jararaca*, causa morte celular por apoptose e indução gênica de mediadores inflamatórios em células endoteliais (LOPES *et al.*, 2012). A PLA<sub>2</sub>Lys 49 do veneno de *Bothrops asper* produz rápida morte celular em macrófagos, com liberação de ATP citoplasmático e de outros constituintes celulares (LEIQUEZ *et al.*, 2011; TONELLO *et al.*, 2012). A metaloproteinase desse veneno, por sua vez, causa morte celular em células endoteliais e tumorais, com evidências da ocorrência de apoptose e outras formas alternativas de morte (BRENES *et al.*, 2010).

Em macrófagos, células importantes na resposta imune a diversos agentes, peçonhas botrópicas e suas frações possuem muitos efeitos. Foram observados efeitos citotóxicos e proliferativos, dependentes de dose, no veneno de *Bothropoideslutzi* (MENEZES *et al.*, 2012). Efeito citotóxico também foi observado no veneno de *B. marajoensis*, bem como suas frações PLA<sub>2</sub> e LAO (TORRES *et al.*, 2010). O veneno de *B. asper* induz a expressão de COX-2 com conseqüente aumento da concentração de prostaglandinas em macrófagos peritoneais (MOREIRA *et al.*, 2009). AS PLA<sub>2</sub>Asp 49 e Lys 49 desse veneno, por sua vez, causam morte celular e, em concentrações subletais, provocam aumento da capacidade fagocítica, liberação de peróxido de hidrogênio (ZULIANI *et al.*, 2005). A jararhagin apresenta efeito ativador em macrófagos, com produção de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (CLISSA *et al.*, 2001).

Dessa forma, acredita-se que parte dos efeitos tóxicos encontrados em animais e pacientes envenenados com peçonhas botrópicas possa ser explicado pela identificação das alterações celulares induzidas por essas substâncias, incluindo parâmetros de morte celular, alterações morfofuncionais e liberação de substâncias que interfiram em processos biológicos.

*Justificativa*

## 2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, a atenção de muitos grupos de pesquisa tem se voltado para a descoberta dos efeitos biológicos das toxinas de venenos animais, bem como a elucidação dos mecanismos fisiológicos e celulares envolvidos no aparecimento e evolução dos efeitos locais e sistêmicos em pacientes envenenados. Para tal, diversos modelos tem sido empregados tanto *in vivo* quanto *in vitro*, no sentido de ampliar o conhecimento sobre a ação das toxinas em sistemas biológicos (BAILEY e WILCE, 2001). Os venenos de serpentes correspondem a um complexo conjunto de enzimas e polipeptídios biologicamente ativos (ROODT *et al.*, 2000). A composição dos mesmos apresenta características particulares tanto na intensidade como nos tipos de ações, para cada espécie de serpente (FURTADO *et al.*, 1991; SANCHEZ, 1992).

Apesar de ter sido identificada a interferência de processos inflamatórios na ação de venenos botrópicos e suas frações, pouco se conhece a respeito do efeito dessas substâncias diretamente sobre células envolvidas nos mecanismos de defesa, como neutrófilos, macrófagos e mastócitos. Essas células, participando do processo de lesão e resposta no microambiente tissular e hemodinâmico, são peças-chave na determinação das consequências do acidente botrópico (COSTA *et al.*, 2002). Além disso, os macrófagos são células amplamente utilizadas na determinação dos mecanismos citotóxicos de substâncias de interesse biológico (SLATER, 2001).

O veneno de *Bothropoides insularis*, uma serpente endêmica na ilha de Queimada Grande, possui características peculiares, como a alta toxicidade em aves, o que o torna interessante alvo de pesquisas para identificação de toxinas com efeitos biológicos importantes (BRAGA, 2006). Não é completamente conhecido o quanto os processos inflamatórios e citotóxicos interferem no aparecimento dos efeitos locais e sistêmicos dessa peçonha. Adicionalmente, algumas frações com atividades enzimáticas específicas foram identificadas nesse veneno, cujos produtos podem, pelo menos em parte, ser responsáveis pelas alterações evidenciadas nos trabalhos que relatam os efeitos biológicos da peçonha de *B. insularis* (BRAGA *et al.*, 2006; BRAGA *et al.*, 2008).

Portanto, há a necessidade de estudos que visem identificar os eventos celulares envolvidos nos envenenamentos botrópicos. A pesquisa de bioatividades 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).

*Objetivos*

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar as atividades enzimáticas do veneno da serpente *Bothropoides insularis* (BinsVT) e seus efeitos *in vitro* em macrófagos murinos RAW 264.7.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade proteolítica e a produção de peróxido de hidrogênio de BinsVT *in vitro*.
- Estudar o efeito de BinsVT sobre a viabilidade de células RAW 264.7.
- Avaliar a liberação de conteúdo citoplasmático de células RAW 264.7 expostas a BinsVT.
- Analisar as alterações morfológicas induzidas por BinsVT em células RAW 264.7.
- Analisar o efeito de BinsVT sobre a integridade de membrana e a externalização de fosfatidilserina em células RAW 264.7.

*Materiais e Métodos*

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção da substância em estudo e preparo das soluções de trabalho.

O veneno da serpente *Bothropoides insularis* (BinsVT) foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama, do Departamento de Bioquímica da UNESP, Campus do Litoral Paulista. Para realização dos experimentos, foi feita uma solução estoque a 2,0 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4, estéril. Diluições seriadas utilizando PBS foram utilizadas nos protocolos experimentais.

### 4.2 Ensaio de atividade enzimática *in vitro* do veneno da serpente *Bothropoides insularis*.

#### 4.2.1 Atividade proteolítica.

Com o intuito de identificar o envolvimento de metaloproteinases nos efeitos biológicos de BinsVT, a atividade proteolítica da substância foi determinada pelo teste de clivagem da azocaseína (RUCAVADO *et al.*, 2008). Em placas de 96 poços, foram adicionados 90 µL de solução de azocaseína 5 mg/mL dissolvida em tampão de reação (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7.4) e 10 µL de BinsVT (nas concentrações finais de 200; 100; 50; 25; 12,5; e 6,25 µg/mL em tampão de reação). As placas foram incubadas a 37°C por 60 minutos. A reação foi parada com a adição de 200 µL de ácido tricloroacético a 5%. Após centrifugação das placas a 3500 RPM por 5 minutos, 100 µL do sobrenadante foi transferido para outra placa e 100 µL de NaOH 0,5M foram adicionados. Por fim, foi realizada leitura espectrofotométrica a 450 nm em leitora de microplacas (Asys UV Expert Plus®).

#### 4.2.2 Produção de peróxido de hidrogênio.

Para verificar a atividade da enzima L-aminoácido oxidase em BinsVT nas condições experimentais desse estudo, a produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induzida por BinsVT a partir da oxidação de aminoácidos foi avaliada por espectrofotometria. Para tal, 50 µL de mistura reativa (o-fenilenodiamina 50 µg/mL, L-leucina 50 µg/mL e peroxidase 0,81 U/mL dissolvidos em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,4) foram adicionadas a 50 µL da

substância em estudo em diversas concentrações (200; 100; 50; 25; 12,5; e 6,25  $\mu\text{g/mL}$  dissolvida em tampão) e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 60 minutos em placas de 96 poços. Em seguida, 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2M foram adicionados aos poços e as placas foram lidas em leitora de microplacas a 492 nm. Para cálculo das concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , as absorbâncias dos grupos-teste foram comparadas por regressão linear às encontradas em uma curva-padrão de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (BRAGA *et al.*, 2008).

### 4.3 Cultivo, manutenção e tratamento das células RAW 264.7.

As células RAW 264.7, linhagem celular de macrófagos de camundongos, foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas em cultivo no Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará. As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) composto de glutamina (580 mg/L), bicarbonato de sódio (3,7 g/L), glicose (4,5 g/L), piruvato de sódio (110 mg/L), sais inorgânicos, vitaminas e outros aminoácidos, e acrescido de penicilina (100 U/mL), estreptomicina (130 mg/L) e soro bovino fetal (SBF) a 10% em garrafas plásticas estéreis, e mantidas em estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  até atingirem confluência.

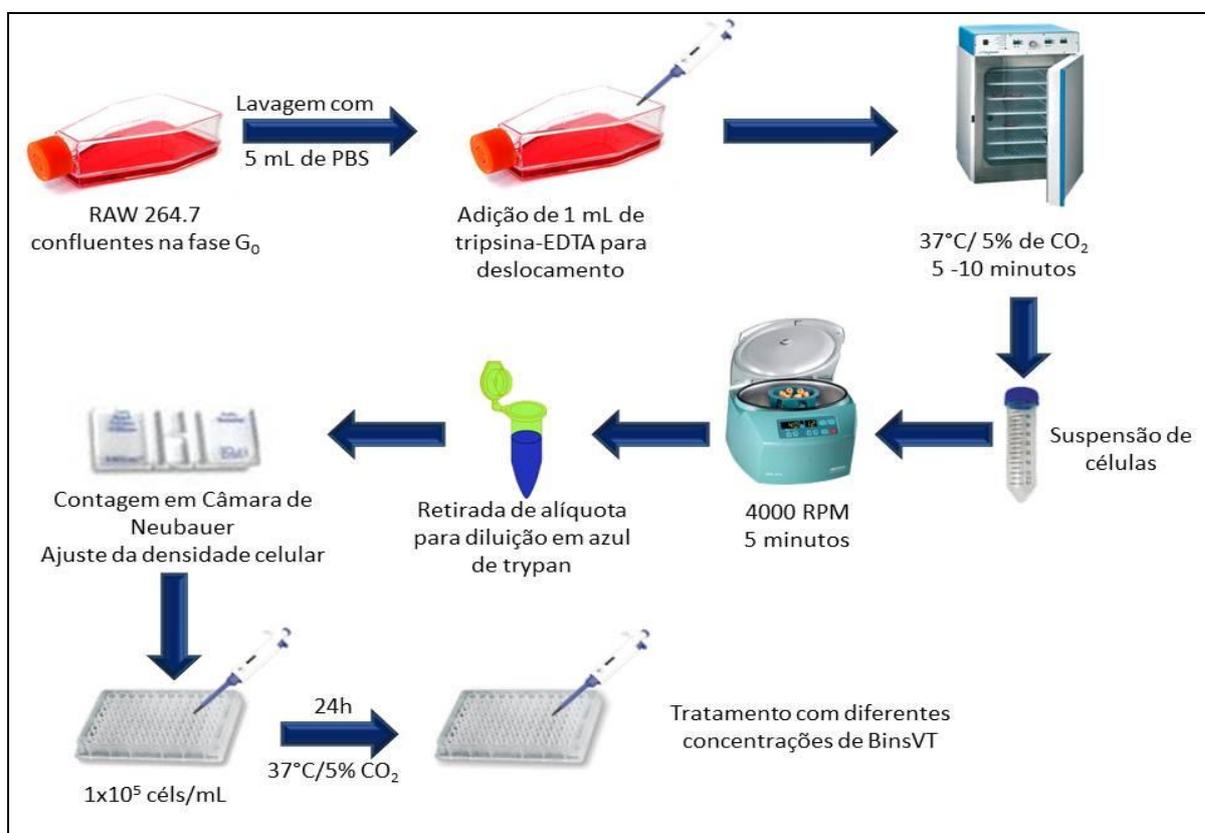
Para manutenção das células, o meio de cultivo das garrafas confluentes foi removido, e as células foram lavadas com 3-5 mL de PBS estéril, pH 7.4. A garrafa foi incubada com 1 mL de solução de tripsina-EDTA (0.05%/0.02%) por 5-10 minutos a  $37^\circ\text{C}$  para deslocamento das células aderidas na superfície de cultivo. Em seguida, para inativação da tripsina-EDTA, foi adicionado 1 mL de DMEM completo, e alíquotas das suspensões celulares obtidas foram transferidas para novas garrafas com meio DMEM completo.

Para produção de estoques celulares, as garrafas foram periodicamente deslocadas, quantificadas e ressuspensas em meio DMEM completo acrescido de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) estéril. Essas suspensões foram armazenadas em *vials* de criopreservação a  $-20^\circ\text{C}$  *overnight* e, em seguida, transferidas para *freezer* a  $-80^\circ\text{C}$ , mantidas por até 4 meses.

Antes de cada experimento, as células RAW 264.7 foram mantidas em meio DMEM sem SBF por 24 horas em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  para sincronização na fase  $G_0$  do ciclo celular. Após esse período, as células foram lavadas e tripsinizadas como descrito acima e centrifugadas a 4000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de meio DMEM completo. Alíquotas foram removidas para quantificação em Câmara de Neubauer pelo método de exclusão do azul de trypan (solução a

0,1% em PBS), a concentração celular foi ajustada e a suspensão foi pipetada na concentração final de  $1 \times 10^5$  células/mL em placas de 24 e 96 poços. Após incubação por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ , diferentes concentrações de BinsVT (200; 100; 50; 25; 12,5; e 6,25  $\mu\text{g/mL}$ ) foram adicionadas (Figura 13). Para análise dos efeitos biológicos *in vitro* de BinsVT, as placas foram incubadas por 2, 6, 12 ou 24 horas e, em seguida, foram realizados os protocolos descritos a seguir.

**Figura 13.** Cultivo e tratamento das células RAW 264.7 com veneno total da serpente *Bothropoides insularis* em placas de 96 poços.



#### 4.4 Determinação do efeito citotóxico do veneno total da serpente *Bothropoides insularis* sobre macrófagos murinos.

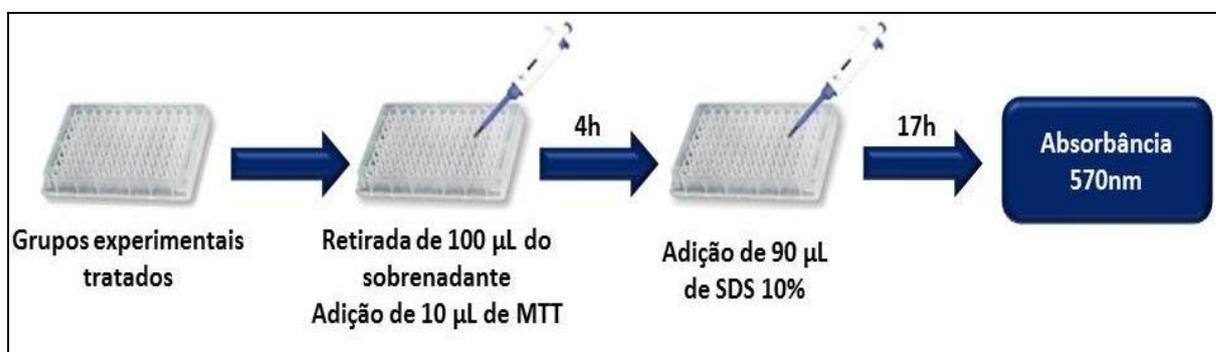
##### 4.4.1 Teste de redução do MTT

O teste do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é amplamente usado na determinação da viabilidade de células em cultivo. É um sal de tetrazólio de cor amarelada, que é internalizado nas células viáveis por endocitose e reduzido

no microambiente intracelular por desidrogenases citoplasmáticas e mitocondriais em um sal de formazan, de cor azul violácea, insolúvel em meio aquoso. Em seguida, deve ser adicionado um agente surfactante para solubilização dos cristais formados. Os produtos finais são lidos por espectrofotometria a 570 nm. Dessa forma, o teste é utilizado como um marcador da capacidade metabólica das células (LIU et al., 1997; MOSMANN, 1983).

Para determinar o efeito citotóxico de BinsVT sobre macrófagos, placas de 96 poços tratadas com diferentes concentrações foram incubadas por 2, 6, 12 e 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Como controle negativo, foi utilizado PBS estéril, pH 7.4. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 4000 RPM por 5 min e 100 µL de sobrenadante foram removidos. 10 µL de uma solução de MTT (Sigma®) a 2,5 mg/mL em PBS foram adicionados e a placa foi incubada por 4 horas a 37°C no escuro e, em seguida, 90 µL de dodecilsulfato de sódio (SDS) (10% em HCl 0,01N). Após 17 horas de incubação, as placas foram lidas em leitor de placas a 570 nm (Figura 14). Os dados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular ± EPM em relação ao controle negativo.

**Figura 14.** Ensaio de redução do 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio.

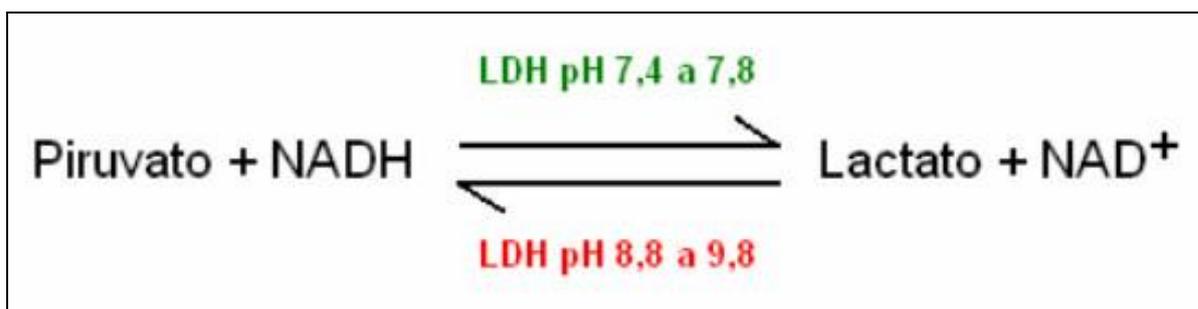


#### 4.4.2 Determinação da liberação de lactato desidrogenase

Para investigar se o tratamento com BinsVT causou lise e liberação do conteúdo celular, foi realizada a dosagem da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante dos grupos tratados no teste do MTT. A enzima LDH é encontrada no citoplasma de todas as células de mamíferos e é responsável pelo consumo e produção de piruvato e lactato em condições anaeróbicas, com envolvimento dos mediadores NAD<sup>+</sup>/NADH (Figura 15) (BAYNES, 2010). Nos últimos anos, a atividade dessa enzima tem

seu uso como principal marcador de lise celular *in vitro*, em substituição aos testes de liberação de [ $^{51}\text{Cr}$ ], devido aos riscos envolvendo o uso de isótopos radioativos.

**Figura 15.** Reações de metabolismo anaeróbico catalisadas pela enzima Lactato Desidrogenase (LDH).



Fonte: <http://blogbiotecnica.ind.br/blog/2011/04/metodologias-para-determinacao-da-desidrogenase-latica-ldh-piruvato-ou-lactato/>

O teste de determinação da atividade de LDH é baseado na utilização do NADH produzido pela ação da enzima sobre o lactato presente no reagente para redução do cloreto de 2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazólio (INT) num composto de cor avermelhada (Figura 16). 100  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes dos grupos experimentais tratados com BinsVT (100; 50; 25; e 12,5  $\mu\text{g/mL}$ ), Triton X-100 1% v/v (controle positivo) e PBS (controle negativo) foram incubados com 100  $\mu\text{L}$  do reagente comercial (Roche®) de determinação de LDH (composto de diaforase,  $\text{NAD}^+$ , INT e lactato de sódio) em temperatura ambiente por 30 minutos no escuro. Por fim, a leitura das absorbâncias finais foi feita em leitora de microplacas a 490 nm, com filtro de referência de 620 nm. Os valores de citotoxicidade foram calculados utilizando os resultados de controle negativo como liberação basal de LDH, e os resultados de controle positivo, como 100% de liberação da enzima.



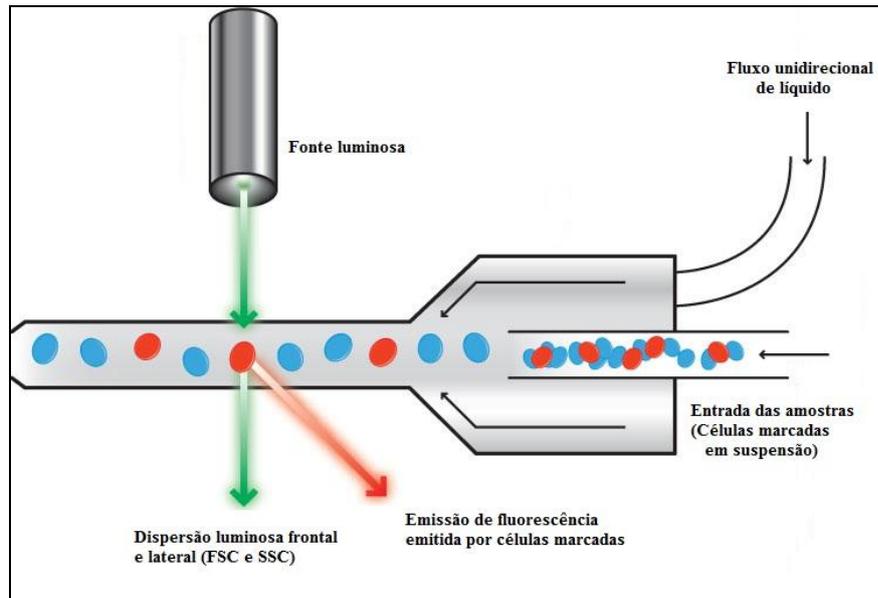
Olympus® (aumento de 40 X) e os grupos foram analisados qualitativamente em relação ao grupo controle. O registro das alterações morfológicas relevantes foi realizado com câmera fotográfica Olympus®.

#### **4.6 Análise do tipo de morte celular induzida pelo veneno da serpente *Bothropoides insularis* por citometria de fluxo.**

A avaliação do tipo de morte celular induzido pela substância em estudo foi realizada pela determinação de características celulares indicativas de morte por necrose ou apoptose por citometria de fluxo. Essa é uma metodologia usada para o estudo de diversas características celulares, uma vez que um dos princípios deste método é a manutenção das condições vitais da célula após sua manipulação, permitindo investigações mais aprofundadas do comportamento biológico da população celular em estudo, inclusive de avaliação funcional. Para realização das análises, as células são conduzidas por um fluxo de líquido unidirecional e forçadas a passar individualmente por um canal, onde são interceptadas por feixes de luz provenientes de lasers específicos (BACAL e FAULHABER, 2003) (Figura 17).

A dispersão do feixe de luz causado pelo contato com células e outras partículas é interceptada e interpretada de diferentes formas. O feixe de luz que sofre pouco ou nenhum desvio é chamado de FSC (*Foward Light Scatter*) e é relacionado ao tamanho das células ou partículas em análise. Os feixes luminosos dispersos lateralmente (*Side Light Scatter – SSC*) fornecem informações a respeito da complexidade das partículas, como presença de grânulos, tamanho e complexidade do núcleo, entre outros (MACHADO-JÚNIOR *et al.*, 2006). Além disso, com a utilização de corantes fluorescentes ou marcadores celulares complexados com fluorocromos, é possível ainda avaliar quali- e quantitativamente diversas características celulares importantes, como conteúdo e integridade de DNA, presença intracelular de moléculas sinalizadoras e aumento ou diminuição da expressão de macromoléculas de membrana (CHATTOPADHYAY e ROEDERER, 2012).

**Figura 17.** Princípio de leitura por citometria de fluxo.

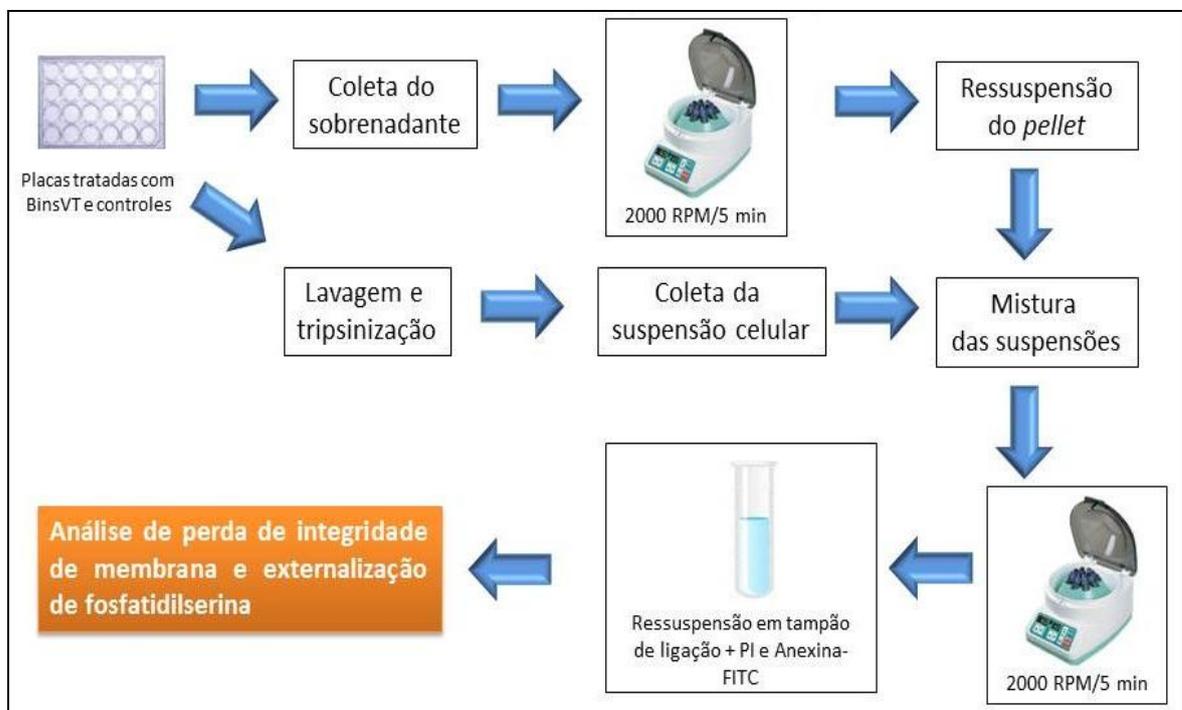


Fonte: Adaptado de <http://www.abcam.com/ps/CMS/Images/Flow-Cytometry-how%20it%20works-Diagram.jpg>

Células necróticas e apoptóticas apresentam características diferenciadas, como integridade de DNA e de membrana e expressão de moléculas de superfície. Um marcador precoce de apoptose é a externalização de fosfatidilserina, um fosfolipídio do folheto interno da membrana plasmática celular, que é externalizado quando a célula entra em processo apoptótico, como sinalização para fagocitose por macrófagos e outras células inflamatórias. A anexina V tem a capacidade de se ligar fortemente à fosfatidilserina e, quando marcada com fluorocromos como a fluoresceína isotiocianato (FITC), pode ser utilizada como marcador da externalização dessa macromolécula (DE LIMA, 2005). Paralelamente, as células podem ser analisadas pela adição do iodeto de propídio (PI), um marcador fluorescente de DNA impermeável à membrana celular intacta, sendo dessa forma um marcador importante de aumento de permeabilidade de membrana, um evento característico nas células necróticas. Nesse ensaio, as células são divididas em quatro populações distintas: células viáveis não são marcadas por nenhum dos corantes fluorescentes; células marcadas unicamente com PI são consideradas como células em necrose; células marcadas unicamente por anexina-FITC são contadas como células apoptóticas; e, por fim, células marcadas duplamente configuram população de corpos apoptóticos que, devido a ausência de fagócitos para finalizar o processo de morte celular, entram em necrose secundária. Esses últimos eventos são também chamados de apoptose tardia. (BOERSMA *et al.*, 2005).

Nesse estudo, as células RAW 264.7 foram incubadas com BinsVT (100 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) e PBS (controle negativo) por 24 horas em placas de 24 poços. Em seguida, o sobrenadante de cultivo foi removido e centrifugado a 2000 RPM por 5 minutos para coleta de células em suspensão. Adicionalmente, as células aderidas foram lavadas com PBS, tripsinizadas e misturadas ao *pellet* obtido do sobrenadante. As misturas foram mais uma vez centrifugadas e o precipitado obtido foi lavado 2 vezes com PBS e ressuspensão em 490  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação (Hepes/NaOH 10 mM, NaCl 140 mM,  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM, pH 7,4). As suspensões foram tratadas com 5  $\mu\text{L}$  de solução de Anexina V-FITC e 5  $\mu\text{L}$  de solução de PI (BD Pharmigen®, ambos na concentração final de 5  $\mu\text{g/mL}$ ) por 15 minutos ao abrigo da luz. Por fim, as amostras foram centrifugadas, ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação e analisadas em citômetro de fluxo (FACSCalibur®, BD Pharmigen) para contagem de células não-marcadas, marcadas unicamente com PI ou anexina V-FITC ou marcadas duplamente (Figura 18).

**Figura 18.** Processamento de amostras de células RAW 264.7 tratadas com o veneno da serpente *Bothropoides insularis* para avaliação de alterações celulares em citômetro de fluxo.



#### **4.7 Análise estatística**

Todos os experimentos foram realizados em triplicata ( $n=3$ ), e os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$  erro padrão médio (EPM). Para comparação dos grupos experimentais, foi utilizado o teste estatístico ANOVA, com pós-teste de Dunnet, utilizando  $p<0,05$  como critério de significância. Para realização dos testes estatísticos, foram utilizados os softwares Microsoft Excel® 2010 e GraphPadPrism® versão 5.0.

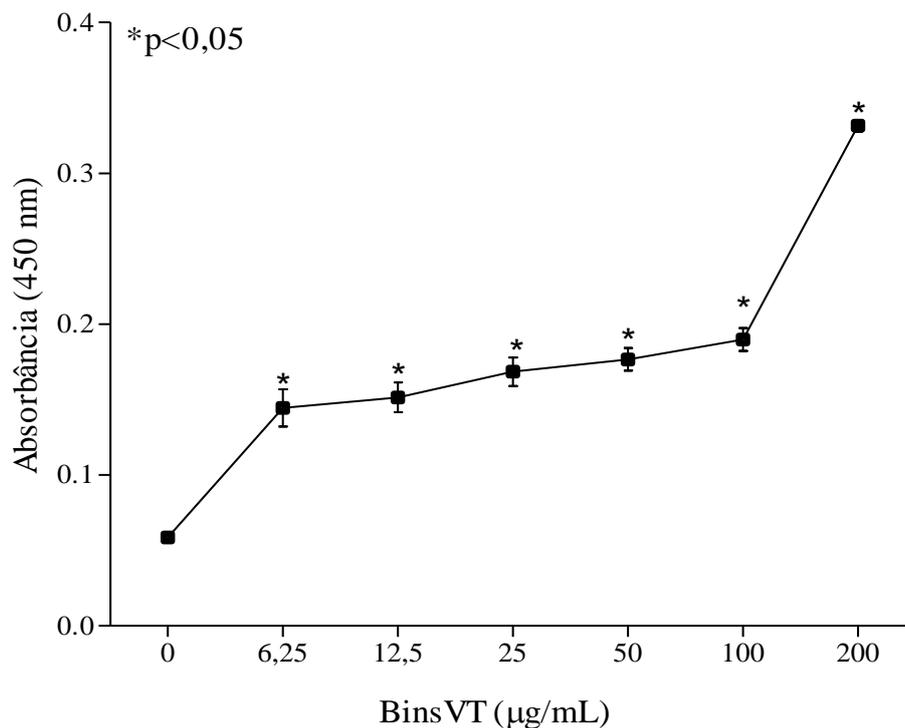
*Resultados*

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Atividade proteolítica *in vitro* do veneno da serpente *Bothropoides insularis*.

No presente trabalho, foi estudada a atividade proteolítica do veneno total da serpente *Bothropoides insularis* (BinsVT), pelo método colorimétrico de clivagem da azocaseína. Após realização dos ensaios, foi verificado um aumento da absorbância nos grupos tratados com todas as concentrações, com pico de efeito proteolítico na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ , conforme demonstrado na figura 19 e tabela 1.

**Figura 19.** Efeito proteolítico do veneno da serpente *Bothropoides insularis* (BinsVT) sobre solução de azocaseína.



Os dados foram expressos como absorbância média  $\pm$  EPM e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnet.

\*p<0,05 vs. grupo controle, na ausência de veneno.

**Tabela 1.** Efeito proteolítico do veneno da serpente *Bothropoides insularis* em diferentes concentrações sobre solução de azocaseína.

BinsVT ( $\mu\text{g/mL}$ )	Abs média $\pm$ EPM
0	0,059 $\pm$ 0,001
6,25	0,145 $\pm$ 0,012*
12,5	0,152 $\pm$ 0,010*
25	0,169 $\pm$ 0,009*
50	0,177 $\pm$ 0,008*
100	0,190 $\pm$ 0,008*
200	0,332 $\pm$ 0,004*

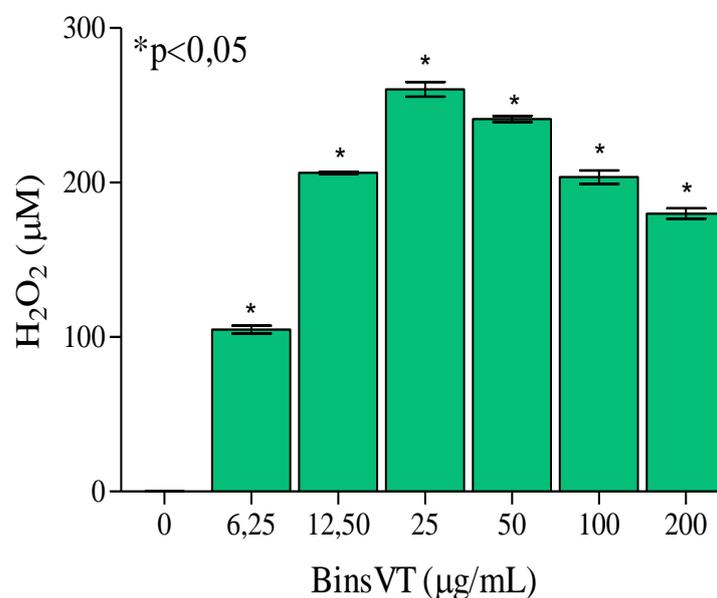
Os dados foram expressos como absorvância média  $\pm$  EPM e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnet.

\* $p < 0,05$  vs. grupo controle, na ausência de veneno.

## 5.2 Produção *in vitro* de peróxido de hidrogênio induzida pelo veneno da serpente *Bothropoides insularis*.

Foi realizada a determinação da atividade catalítica de BinsVT sobre aminoácidos, produzindo peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), através de uma reação de clivagem da L-leucina acoplada com peroxidase e o-fenilenodiamina. As concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas amostras testadas foram calculadas por regressão linear, utilizando como base uma curva-padrão de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (com concentrações entre 0 e 400  $\mu\text{M}$  de peróxido) testada nas mesmas condições dos grupos de estudo. Foi verificado que BinsVT levou a um aumento significativo das concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , quando comparado com o grupo controle (Figura 20 e Tabela 2), tendo apresentado pico de efeito na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$ , com produção quase 3 vezes maior que o grupo controle.

**Figura 20.** Efeito do veneno da serpente *Bothropoides insularis* (BinsVT) sobre a produção de peróxido *in vitro*.



Os dados foram expressos como concentração de  $H_2O_2$  em  $\mu g/mL \pm EPM$  e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnet. \* $p < 0,05$  vs. grupo controle, na ausência de veneno.

**Tabela 2.** Concentração de peróxido de hidrogênio produzido por diferentes concentrações do veneno da serpente *Bothropoides insularis*.

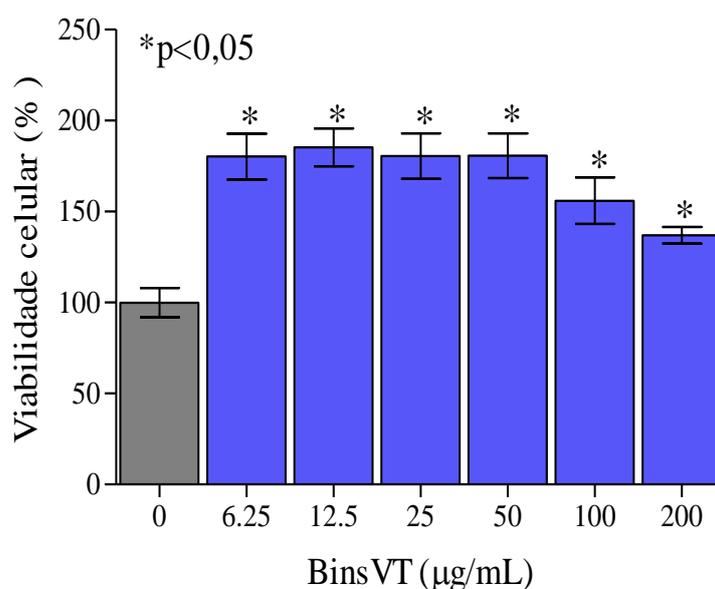
BinsVT ( $\mu g/mL$ )	Produção de $H_2O_2$ ( $\mu M$ )
0	0,052 $\pm$ 0,07
6,25	104,8 $\pm$ 2,47*
12,5	206,3 $\pm$ 0,75*
25	260,4 $\pm$ 4,68*
50	241,2 $\pm$ 1,99*
100	203,5 $\pm$ 4,38*
200	179,9 $\pm$ 3,39*

Os dados foram expressos absobância  $\pm E.P.M.$  e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnet. \* $p < 0,05$  vs. grupo controle, na ausência de veneno.

### 5.3 Efeito do veneno da serpente *Bothropoides insularis* sobre a viabilidade de macrófagos murinos.

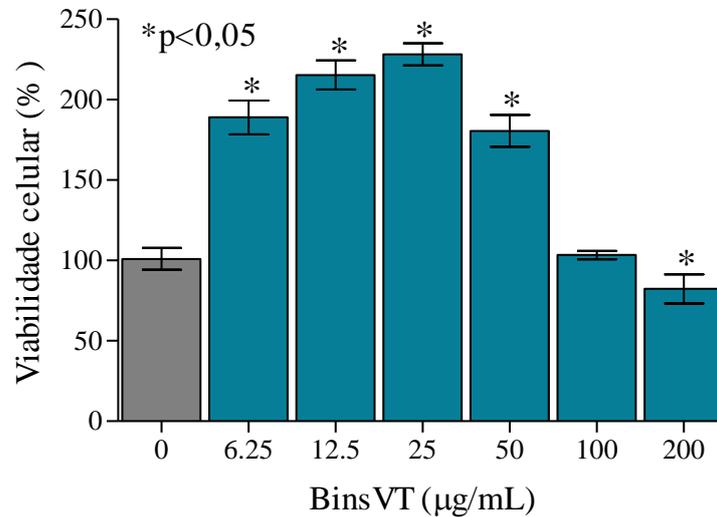
Com o intuito de estudar o efeito de BinsVT sobre macrófagos, a substância foi incubada com as células RAW 264.7 por diferentes períodos de tempo e concentrações. Em seguida, foi realizado o ensaio de redução do MTT, que determina indiretamente a capacidade oxirredutora das células. Após 2 horas de incubação, todos os grupos tratados com BinsVT apresentaram viabilidade celular maiores que 100% em relação ao controle, indicando uma possível proliferação celular. As maiores concentração estudadas (200 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) demonstraram efeito citotóxico crescente no decorrer do tempo de incubação. Nas concentrações mais baixas (6,25 e 12,5  $\mu\text{g/mL}$ ), foi observado um aumento da viabilidade celular tempo-dependente, sugerindo um efeito proliferativo do veneno sobre os macrófagos *in vitro* nessas concentrações. As figuras 21, 22, 23 e 24 e a tabela 3.

**Figura 21.** Efeito do veneno da serpente *Bothropoides insularis* sobre a viabilidade de células RAW 264.7, avaliado pelo método de redução do MTT após 2 horas de incubação com BinsVT.



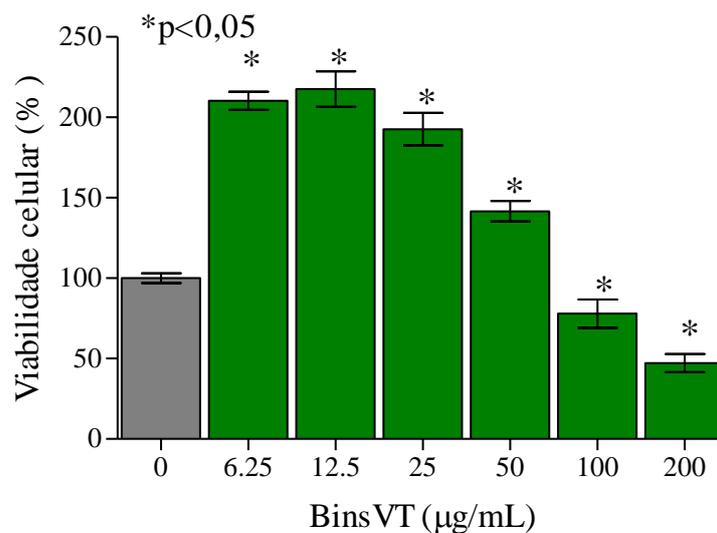
Os experimentos foram realizados em triplicata ( $n=3$ ), e os dados expressos como viabilidade celular média  $\pm$  EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet,  $*p<0,05$  vs. grupo controle.

**Figura 22.** Efeito do veneno da serpente *Bothropoides insularis* sobre a viabilidade de células RAW 264.7, avaliado pelo método de redução do MTT após 6 horas de incubação com BinsVT.



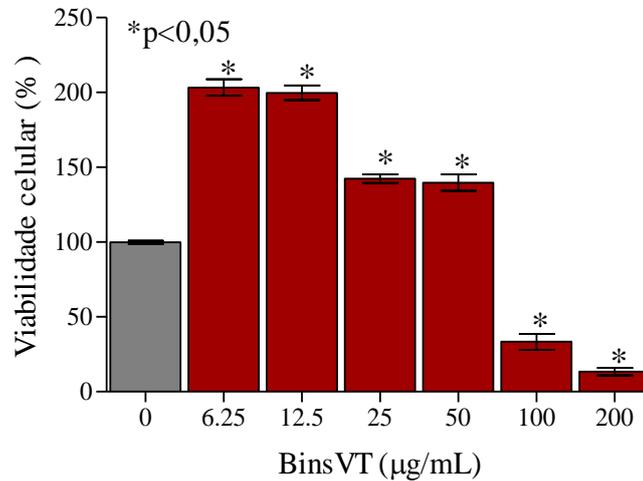
Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3), e os dados expressos como viabilidade celular média  $\pm$  EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet, \*p<0,05 vs. grupo controle.

**Figura 23.** Efeito do veneno da serpente *Bothropoides insularis* sobre a viabilidade de células RAW 264.7, avaliado pelo método de redução do MTT após 12 horas de incubação com BinsVT.



Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3), e os dados expressos como viabilidade celular média  $\pm$  EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet, \*p<0,05 vs. grupo controle.

**Figura 24.** Efeito do veneno da serpente *Bothropoides insularis* sobre a viabilidade de células RAW 264.7, avaliado pelo método de redução do MTT após 24 horas de incubação com BinsVT.



Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3), e os dados expressos como viabilidade celular média  $\pm$  EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet, \*p<0,05 vs. grupo controle.

**Tabela 3.** Viabilidade celular de células RAW 264.7 tratadas com BinsVT em diferentes concentrações e tempos.

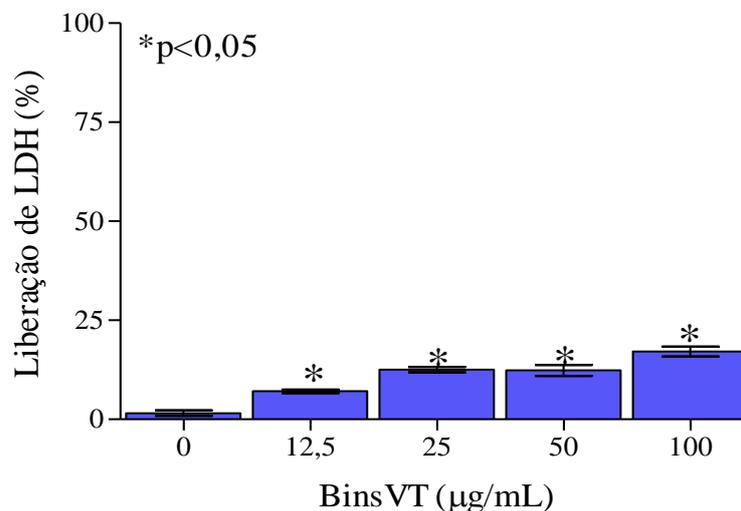
BinsVT (µg/mL)	Viabilidade Celular			
	2 horas	6 horas	12 horas	24 horas
0	99,9 $\pm$ 4,0	101 $\pm$ 3,4	100 $\pm$ 1,5	99,9 $\pm$ 0,5
6,25	180,3 $\pm$ 5,7*	189 $\pm$ 5,2*	210,2 $\pm$ 2,5*#	203,3 $\pm$ 2,8*#
12,5	185,3 $\pm$ 4,3*	215,4 $\pm$ 5,2*#	217,6 $\pm$ 4,9*#	199,7 $\pm$ 2,2*
25	180,5 $\pm$ 5,1*	228,3 $\pm$ 4,0*#	192,7 $\pm$ 4,5*	142,4 $\pm$ 1,5*#
50	180,7 $\pm$ 5,0*	180,5 $\pm$ 4,9*	141,6 $\pm$ 3,2*#	139,8 $\pm$ 2,8*#
100	156 $\pm$ 5,2*	103,4 $\pm$ 1,3#	77,9 $\pm$ 4,0*#	33,4 $\pm$ 2,4*#
200	136,9 $\pm$ 1,9*	82,35 $\pm$ 5,2*#	47,2 $\pm$ 2,8*#	13,4 $\pm$ 1,0*#

Os dados foram expressos como porcentagem de viabilidade  $\pm$  EPM em relação ao grupo controle e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnet. \*p<0,05 vs. grupo controle; #p<0,05 vs. efeito após duas horas de tratamento.

#### 5.4 Efeito do veneno da serpente *Bothropoides insularis* sobre a liberação da enzima lactato desidrogenase.

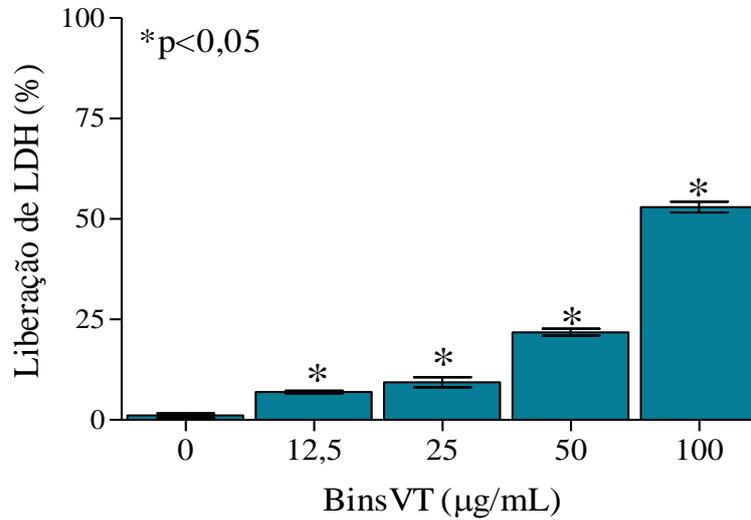
Para determinação dos níveis de lesão celular com liberação de conteúdo citoplasmático, o sobrenadante de cultivo dos poços tratados com BinsVT foi removido para determinação dos níveis de LDH, uma enzima citoplasmática presente em todas as células e liberadas quando a integridade da membrana é prejudicada. A liberação percentual de LDH dos grupos controle e testes foi determinada após a dosagem da enzima em células tratadas com Triton X-100 1%, considerado como grupo controle de 100% de liberação da enzima. Foi observado um aumento significativo da liberação de LDH em relação ao controle de forma concentração e tempo-dependente. Foram observados aumentos gradativos da liberação da enzima, com pico de liberação após 12 horas de incubação. As figuras 25, 26, 27 e 28 e a tabela 4 demonstram o efeito encontrado.

**Figura 25.** Liberação percentual da enzima lactato desidrogenase (LDH) de células RAW 264.7 induzida pelo veneno da serpente *Bothropoides insularis* após 2 horas de tratamento.



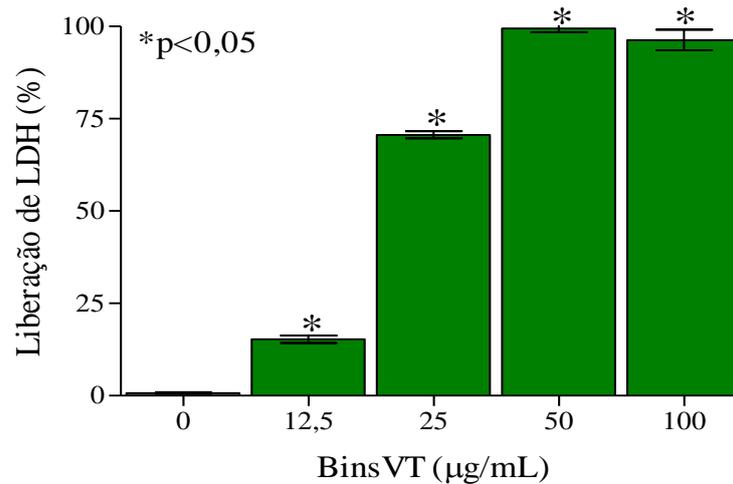
Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3), e os dados expressos como liberação percentual de LDH  $\pm$  EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet, \*p<0,05 vs. grupo controle.

**Figura 26.** Liberação percentual da enzima lactato desidrogenase (LDH) de células RAW 264.7 induzida pelo veneno da serpente *Bothropoides insularis* após 6 horas de tratamento.



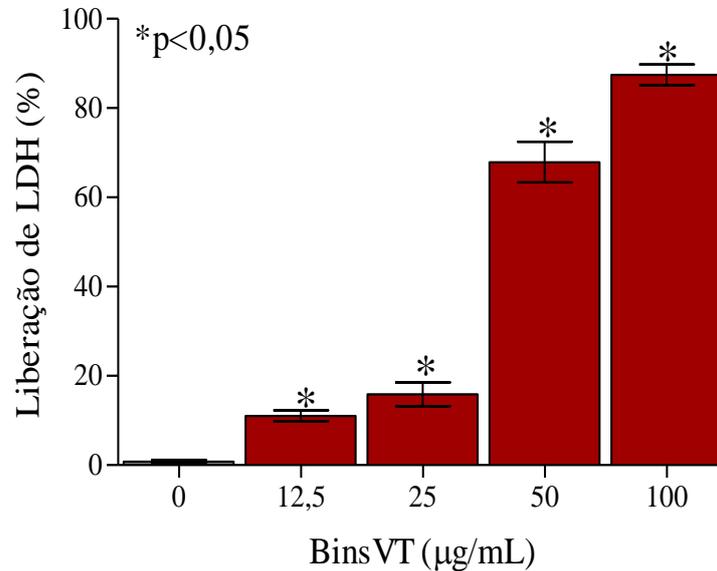
Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3), e os dados expressos como liberação percentual de LDH ± EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet, \*p<0,05 vs. grupo controle.

**Figura 27.** Liberação percentual da enzima lactato desidrogenase (LDH) de células RAW 264.7 induzida pelo veneno da serpente *Bothropoides insularis* após 12 horas de tratamento.



Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3), e os dados expressos como liberação percentual de LDH ± EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet, \*p<0,05 vs. grupo controle.

**Figura 28.** Liberação percentual da enzima lactato desidrogenase (LDH) de células RAW 264.7 induzida pelo veneno da serpente *Bothropoides insularis* após 24 horas de tratamento.



Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3), e os dados expressos como liberação percentual de LDH ± EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet, \*p<0,05 vs. grupo controle.

**Tabela 4.** Liberação de LDH de células RAW 264.7 induzida pelo veneno da serpente em diferentes concentrações e tempos.

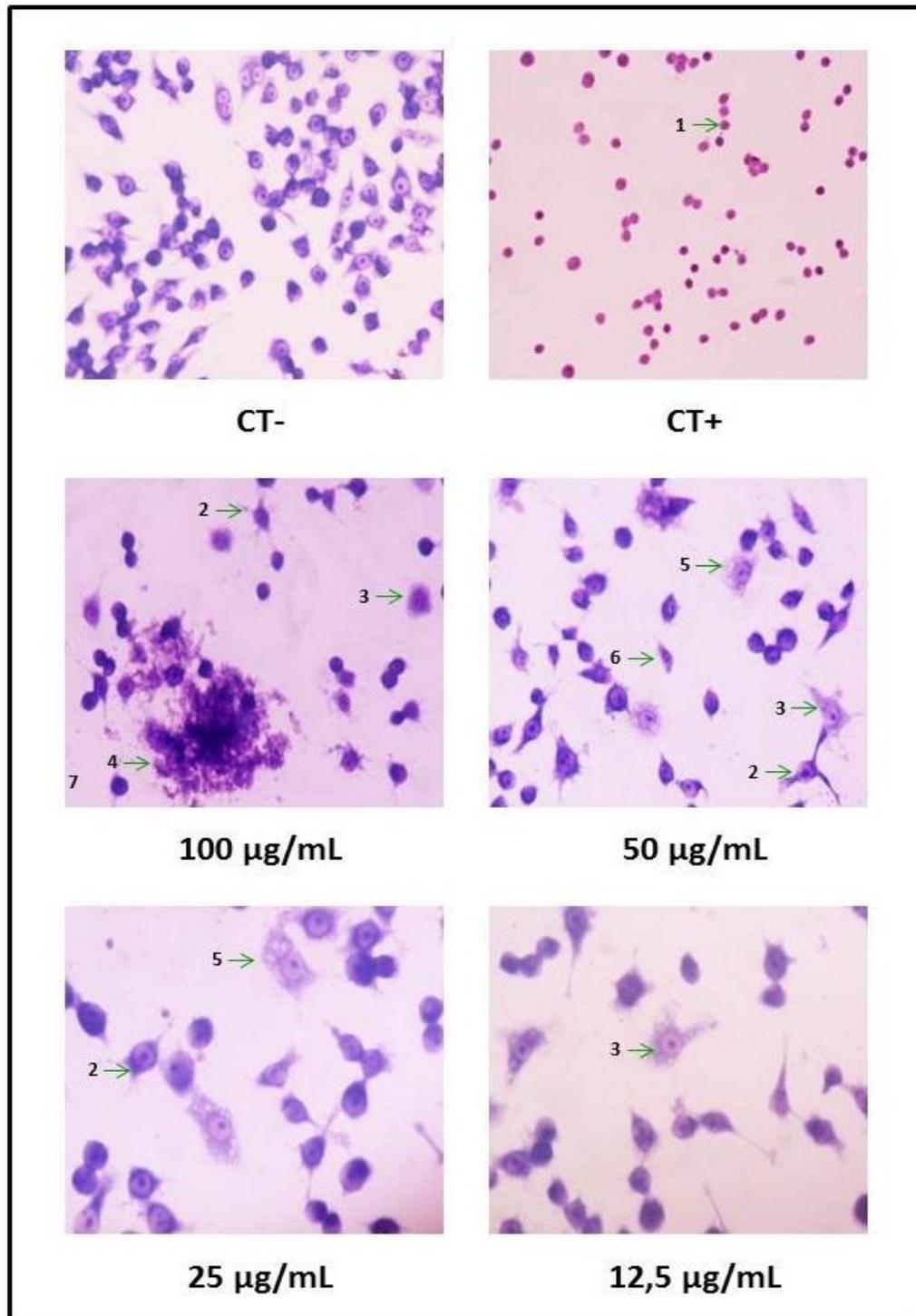
BinsVT (µg/mL)	Liberação percentual de LDH			
	2 horas	6 horas	12 horas	24 horas
0	1,57 ± 0,70	1,10 ± 0,51	0,74 ± 0,20	0,80 ± 0,45
12,5	7,09 ± 0,46*	6,97 ± 0,33*	15,28 ± 1,02*#	11,05 ± 1,20*#
25	12,51 ± 0,67*	9,41 ± 1,25*	70,66 ± 0,96*#	15,88 ± 2,68*
50	12,35 ± 1,39*	21,82 ± 0,86*	99,48 ± 1,01*#	67,2 ± 4,56*#
100	17,15 ± 1,25*	52,5 ± 1,31*#	96,33 ± 2,79*#	87,43 ± 2,33*#

Os dados foram expressos como liberação percentual de LDH ± EPM em relação ao grupo controle e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnet. \*p<0,05 vs. grupo controle; #p<0,05 vs. efeito após duas horas de tratamento.

### **5.5 Alterações morfológicas induzidas pelo veneno da serpente *Bothropoides insularis*.**

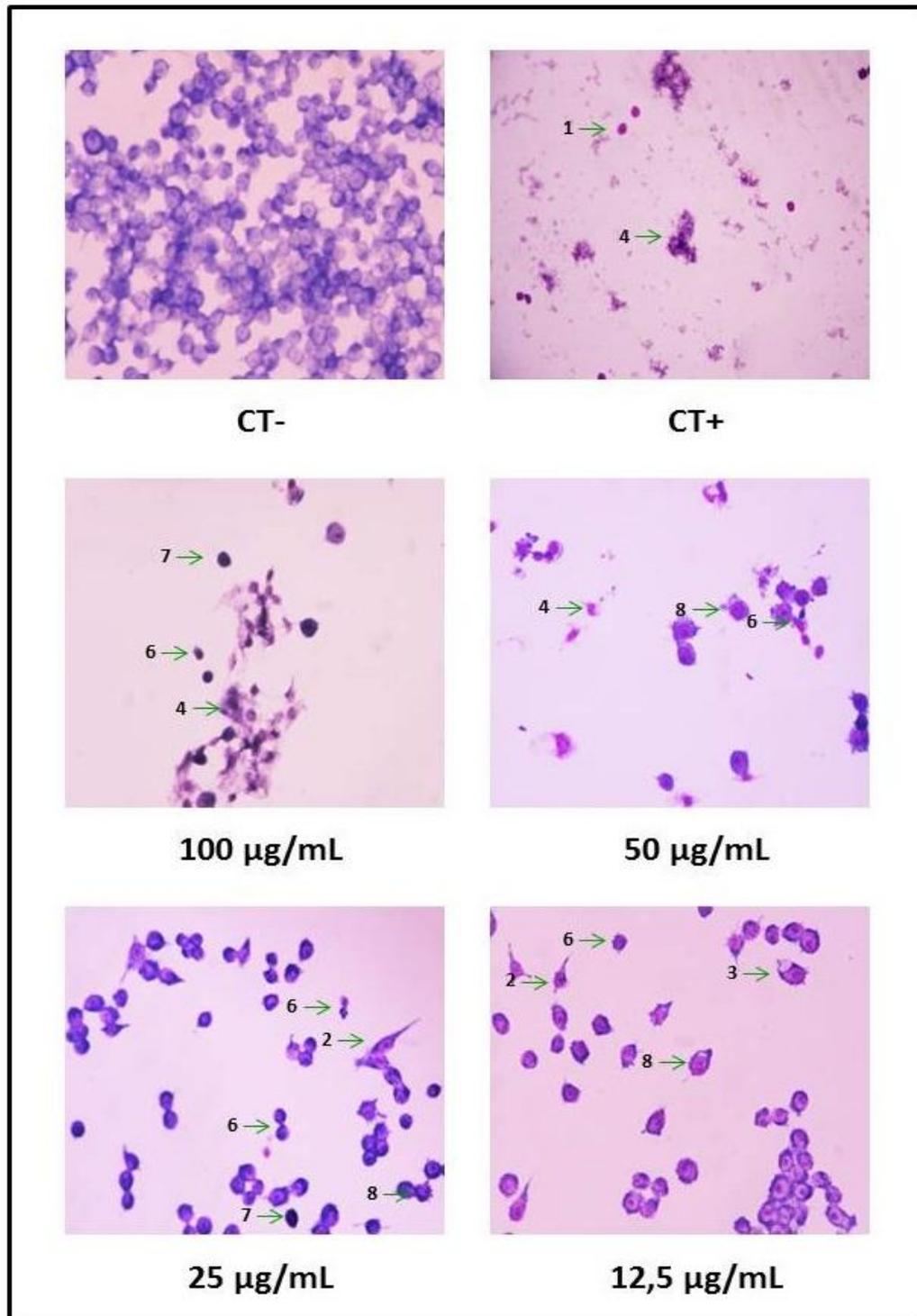
Após 2, 6, 12 e 24 horas de incubação das células RAW 264.7 com BinsVT (100; 50; 25 e 12,5 µg/mL), PBS (controle negativo) e Triton X-100 (controle positivo) sobre a superfície de lamínulas, as células foram fixadas e coradas para avaliação morfológica. As alterações mais características e relevantes foram fotografadas e estão demonstradas nas figuras 29, 30, 31 e 32. Foram encontradas diversas alterações morfológicas importantes nos grupos tratados com BinsVT, como tumefação celular, lise, condensação nucléica, aumento do número de prolongamentos citoplasmáticos, *blebbing*, redução do volume celular e aparecimento de núcleos desnudos.

**Figura 29.** Alterações morfológicas induzidas por BinsVT em células RAW 264.7 após 2 horas de incubação, observadas após coloração May-Grunwald Giemsa.



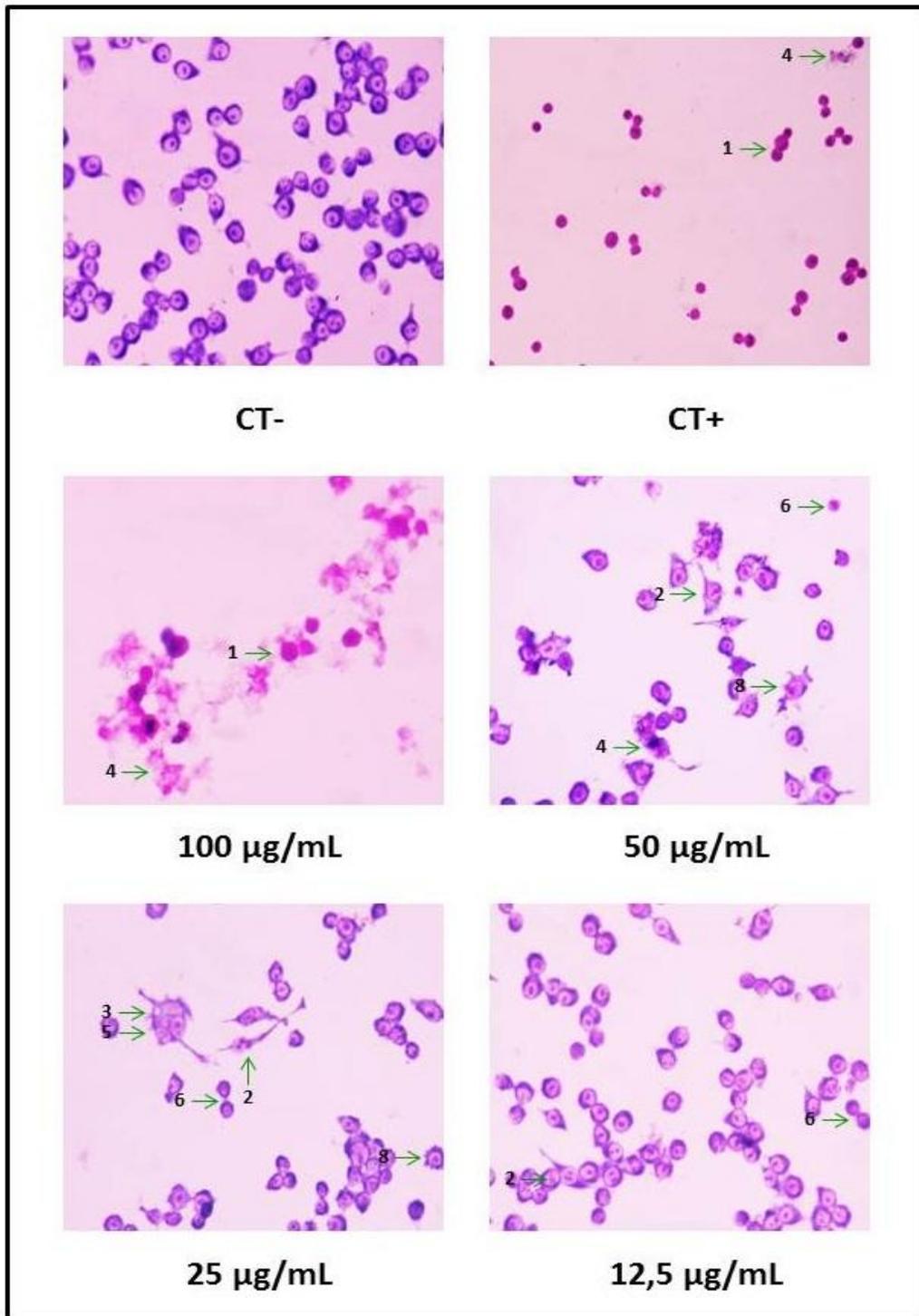
PBS foi usado como controle negativo e Triton X-100, como controle positivo. Legenda: 1. Células com núcleos desnudos, indicativo de lise celular com liberação do conteúdo citoplasmático; 2. Células com prolongamentos citoplasmáticos semelhantes a pseudópodes; 3. Tumefação celular; 4. Deposição de detritos celulares; 5. Aumento do número de células vacuolizadas; 6. Redução do volume celular, com morfologia semelhante a corpos apoptóticos; 7. Condensação nuclear e picnose; 8. *Blebbing*.

**Figura 30.** Alterações morfológicas induzidas por BinsVT em células RAW 264.7 após 6 horas de incubação, observadas após coloração May-Grunwald Giemsa.



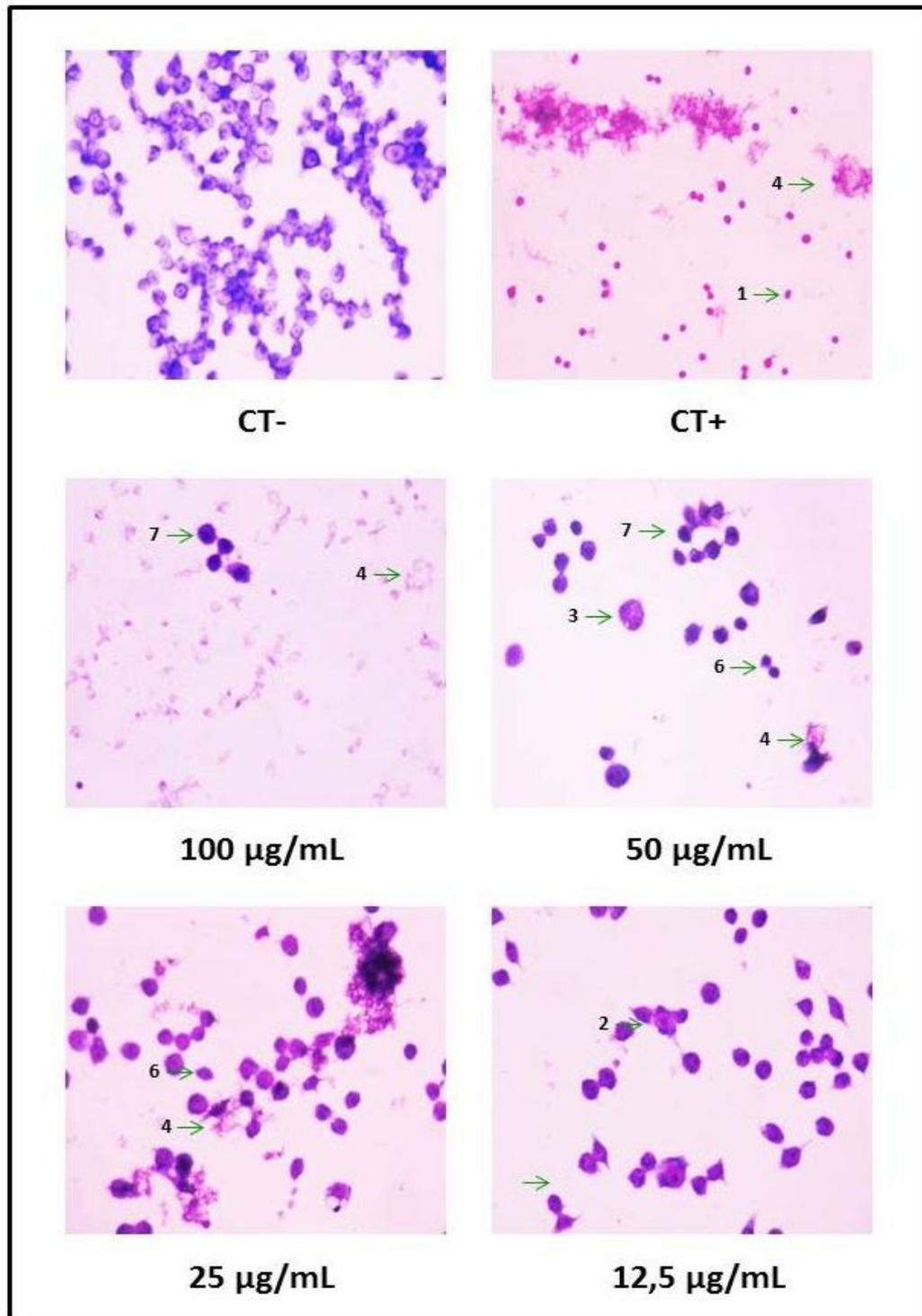
PBS foi usado como controle negativo e Triton X-100, como controle positivo. Legenda: 1. Células com núcleos desnudos, indicativo de lise celular com liberação do conteúdo citoplasmático; 2. Células com prolongamentos citoplasmáticos semelhantes a pseudópodes; 3. Tumefação celular; 4. Deposição de detritos celulares; 5. Aumento do número de células vacuolizadas; 6. Redução do volume celular, com morfologia semelhante a corpos apoptóticos; 7. Condensação nuclear e picnose; 8. *Blebbing*.

**Figura 31.** Alterações morfológicas induzidas por BinsVT em células RAW 264.7 após 12 horas de incubação, observadas após coloração May-Grunwald Giemsa.



PBS foi usado como controle negativo e Triton X-100, como controle positivo. Legenda: 1. Células com núcleos desnudos, indicativo de lise celular com liberação do conteúdo citoplasmático; 2. Células com prolongamentos citoplasmáticos semelhantes a pseudópodes; 3. Tumefação celular; 4. Deposição de detritos celulares; 5. Aumento do número de células vacuolizadas; 6. Redução do volume celular, com morfologia semelhante a corpos apoptóticos; 7. Condensação nuclear e picnose; 8. *Blebbing*.

**Figura 32.** Alterações morfológicas induzidas por BinsVT em células RAW 264.7 após 24 horas de incubação, observadas após coloração May-Grunwald Giemsa.

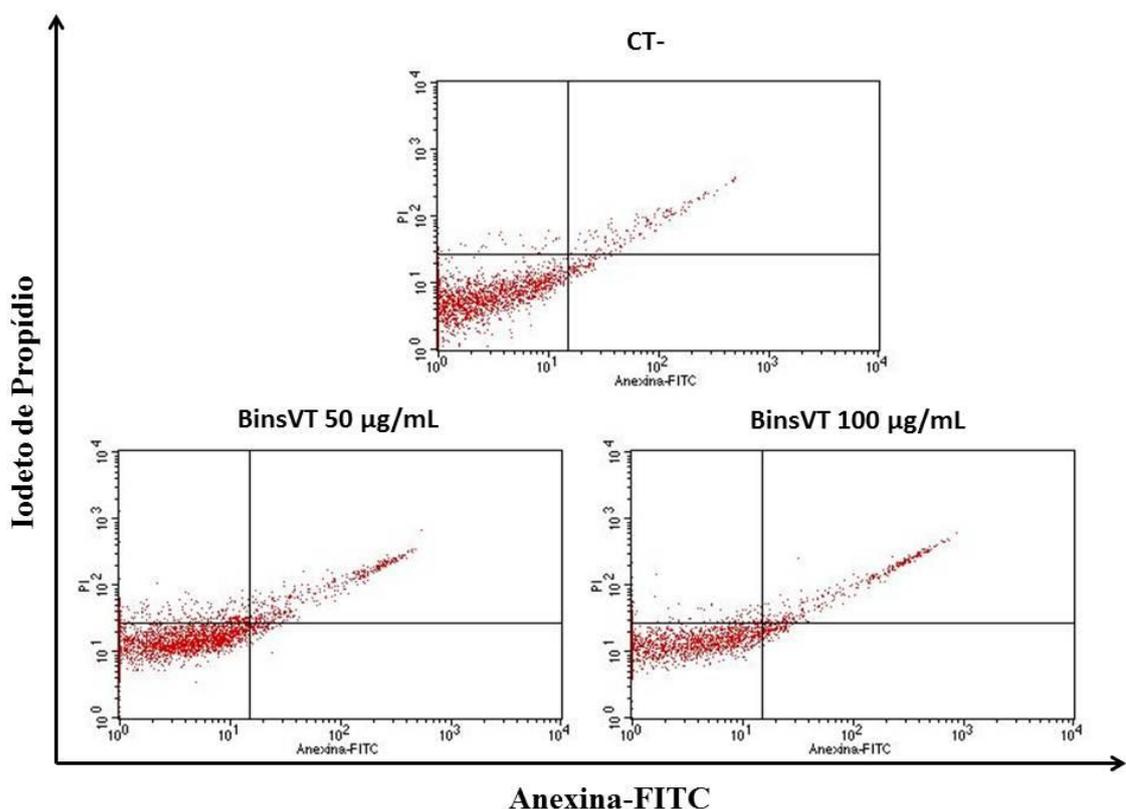


PBS foi usado como controle negativo e Triton X-100, como controle positivo. Legenda: 1. Células com núcleos desnudos, indicativo de lise celular com liberação do conteúdo citoplasmático; 2. Células com prolongamentos citoplasmáticos semelhantes a pseudópodes; 3. Tumefação celular; 4. Deposição de detritos celulares; 5. Aumento do número de células vacuolizadas; 6. Redução do volume celular, com morfologia semelhante a corpos apoptóticos; 7. Condensação nuclear e picnose; 8. *Blebbing*.

## 5.6 Mecanismo de morte celular envolvido no efeito citotóxico do veneno da serpente *Bothropoides insularis*.

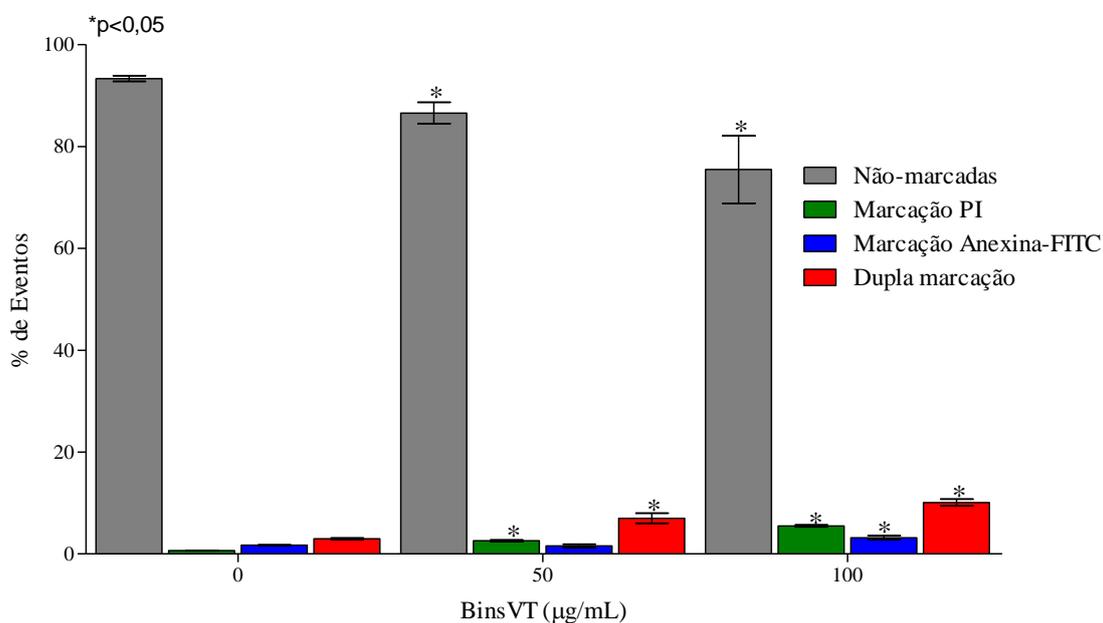
Com o objetivo de identificar alterações celulares indicativas de necrose e/ou apoptose induzidas por BinsVT, as células tratadas por 24 horas foram submetidas ao protocolo de marcação por iodeto de propídio (PI) e anexina-FITC. No ensaio realizado com BinsVT, os resultados encontrados indicam a ocorrência discreta de eventos necróticos e apoptóticos, principalmente representados por células na fase de apoptose tardia, conforme demonstrado nas figuras 33 e 34 e na tabela 6.

**Figura 33.** Avaliação do tipo de morte celular envolvido no efeito veneno da serpente *Bothropoides insularis* sobre células RAW 264.7 após 24 horas de incubação.



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.

**Figura 34.** Avaliação do tipo de morte celular envolvido no efeito veneno da serpente *Bothropoides insularis* sobre células RAW 264.7 após 24 horas de incubação.



Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3), e os dados expressos como porcentagem de eventos  $\pm$  EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet,  $*p < 0,05$  vs. grupo controle.

**Tabela 5.** Avaliação do tipo de morte celular envolvido no efeito veneno da serpente *Bothropoides insularis* sobre células RAW 264.7 após 24 horas de incubação.

BinsVT (µg/mL)	Células viáveis	Células marcadas com PI	Células marcadas com Anexina-FITC	Células com marcação dupla
0	93,37 $\pm$ 0,55	0,66 $\pm$ 0,06	1,71 $\pm$ 0,07	2,95 $\pm$ 0,15
50	86,5 $\pm$ 2,11*	2,57 $\pm$ 0,17*	1,58 $\pm$ 0,32	6,70 $\pm$ 0,9*
100	75,49 $\pm$ 6,61*	5,48 $\pm$ 0,20*	3,18 $\pm$ 0,38*	10,10 $\pm$ 0,64*

Os dados foram expressos como porcentagem de eventos  $\pm$  EPM em relação ao grupo controle.  $*p < 0,05$  vs. grupo controle.

*Discussão*

## 6. DISCUSSÃO

A fisiopatologia do acidente ofídico envolve uma série de eventos complexos e interligados, onde se destacam efeitos vasculares, hemorrágicos, miotóxicos, pró-inflamatórios e citotóxicos, tendo como consequência uma diversidade de alterações locais e sistêmicas, incluindo edema, hemorragia, necrose tecidual, insuficiência renal aguda, falência respiratória, choque e sepse (RIBEIRO *et al.*, 1998; WARRELL, 2005; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009). Vários autores tem comprovado que a ocorrência, extensão e gravidade desses efeitos são dependentes da composição quali-quantitativa da peçonha. Dessa forma, nos estudos realizados com veneno total, uma das preocupações é buscar maneiras de identificar que frações podem ser determinantes para justificar os efeitos biológicos encontrados. Adicionalmente, apesar de serem estudados diversos efeitos de venenos botrópicos em modelos animais, pouco é conhecido sobre o papel direto dessas substâncias em células com funções pró-inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, e de que forma essas células interferem no estabelecimento do quadro lesivo.

No presente trabalho, foram investigados os efeitos do veneno total da serpente *Bothropoides insularis* (BinsVT) sobre células RAW 264.7, linhagem de macrófagos isoladas de camundongos BALB/c. Essas células são amplamente utilizadas em estudos de citotoxicidade *in vitro* e na elucidação dos mecanismos celulares envolvidos em diversas condições inflamatórias (QURESHI *et al.*, 2012). Foram analisados parâmetros de metabolismo oxirredutor, morfologia celular, integridade de membrana, liberação de conteúdo interno e expressão de moléculas sinalizadoras. Com o intuito de correlacionar esses efeitos à presença de determinadas frações em BinsVT, foram realizados ensaios de atividade enzimática *in vitro* para investigar se, nas condições experimentais adotadas nesse trabalho, a atividade catalítica do veneno pode justificar os efeitos encontrados.

Quando submetidos ao método de redução do MTT, os macrófagos tratados com BinsVT demonstraram um comportamento dependente de tempo e concentração, uma vez que o tipo e a intensidade do efeito encontrado foi estritamente relacionado à concentração do veneno e ao tempo de exposição da célula ao mesmo. Enquanto altas concentrações de BinsVT causam morte celular tempo-dependente, menores concentrações são capazes de aumentar a viabilidade celular *in vitro*.

Alguns autores relatam efeitos de venenos animais e suas frações sobre a viabilidade de várias linhagens celulares. Recentemente observamos que o veneno de *Bothropoideslutzii* possui efeito semelhante ao encontrado nesse trabalho, induzindo morte celular em altas concentrações e aparente proliferação nas menores (MENEZES *et al.*, 2012). Sendo macrófagos células envolvidas no processo inflamatório, resultados dessa natureza podem indicar um efeito pró-inflamatório, através da ativação dos macrófagos e consequente liberação de citocinas que, exercendo efeito parácrino e autócrino, estimulam a proliferação local de macrófagos. Foi verificada a indução de citocinas dessa natureza em macrófagos peritoneais por jararhagin, uma metaloproteínase isolada do veneno de *B. jararaca* (CLISSA *et al.*, 2001). Além disso, Zhycaret *et al.* (2010) relata, em estudo realizado *in vivo*, o envolvimento de PLA<sub>2</sub> e metaloproteínases no efeito inflamatório de venenos botrópicos, demonstrado através de dano tecidual local com hemorragia, dor e mionecrose, além da migração peritoneal de células inflamatórias. Em outros estudos, também foram evidenciados fortes indícios de processo inflamatório mediado por miotoxinas, como edema (OLIVEIRA *et al.*, 2009), infiltrado inflamatório (TEIXEIRA *et al.*, 2009) e dano endotelial com envolvimento apoptótico (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009).

São descritos na literatura alguns efeitos do veneno de *B. insularis* e de suas frações isoladas que demonstram seu potencial inflamatório. Barbosa *et al.* (2003) demonstraram que essa peçonha é capaz de induzir edema de pata em animais, sendo essa indução mediada por produtos do prostaglandinas, óxido nítrico e histamina. Indução de edema e bloqueio neuromuscular também foram encontrados no estudo de duas fosfolipases A<sub>2</sub> (svPLA<sub>2</sub>) isoladas desse veneno (COGO *et al.*, 2006). Adicionalmente, a metaloproteínase isolada desse veneno induziu extravasamento de plasma e migração leucocitária sem efeito hemorrágico em camundongos (SILVA *et al.*, 2012).

Potencial pró-inflamatório não é restrito ao veneno de *B. insularis*. Resultados semelhantes foram observados em diversos trabalhos utilizando venenos animais e suas frações. Recentemente foram descritos efeitos miotóxicos e inflamatórios dos venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu*, envolvendo lesão tecidual e migração leucocitária (PATRÃO-NETO *et al.*, 2013). Adicionalmente, foram identificadas alterações como edema de pata e dor inflamatória em peçonhas de outras espécies, como os venenos de *Montiviperaxanthina*, *Viperalebetina*, *Apismellifera* e as toxinas Ts2 e Ts6 isoladas do veneno do escorpião *Tityusserrulatus* (ZHOU *et al.*, 2012; NALBANTSOY *et al.*, 2013; ZOCCAL *et al.*, 2013).

Esses mecanismos estão relacionados a aumento da permeabilidade vascular, citotoxicidade, liberação de citocinas pró-inflamatórias e migração leucocitária.

Os grupos experimentais também foram submetidos à determinação da liberação percentual da enzima lactato desidrogenase, através de uma reação colorimétrica. Essa enzima, importante marcador de lise e morte celular, é amplamente usada na determinação da citotoxicidade de substâncias, devido à facilidade de execução, segurança do método e reprodutibilidade de resultados. BinsVT provocou um aumento na liberação de LDH tempo- e concentração-dependente. Esses dados, quando comparados aos encontrados no teste do MTT, sugerem a presença de efeitos celulares distintos. Acredita-se que, devido à presença de diferentes proteínas na peçonha de *B. insularis*, coexistam efeitos proliferativos e citotóxicos, e a concentração e o tempo de exposição à substância devem determinar qual desses efeitos será sobressalente.

Essa hipótese de um efeito dual, pró-inflamatório e lesivo, de BinsVT sobre macrófagos foi reforçada pela avaliação das alterações morfológicas presentes nas células após tratamento com BinsVT em diferentes tempos. A análise qualitativa revelou alterações indicativas de lesão celular, tais como tumefação, deposição de fragmentos celulares, aparecimento de núcleos desnudos, redução do volume celular e condensação nuclear. Além disso, observou-se o aumento de células com prolongamentos citoplasmáticos, que são características conhecidas de ativação de macrófagos.

A fim de identificar os mecanismos de morte celular envolvidos no efeito citotóxico de BinVT, as células tratadas foram submetidas à avaliação em citômetro de fluxo. O presente estudo revelou envolvimento necrótico e apoptótico no efeito de BinsVT sobre células RAW 264.7. Foi observado nesse ensaio o aparecimento de quatro populações celulares: células viáveis, não marcadas com PI ou anexina-FITC; células necróticas, cuja perda de integridade de membrana é detectada pela marcação com PI; células apoptóticas, detectadas pela ligação específica da anexina-FITC à fosfatidilserinatranslocada para o folheto externo da membrana plasmática; e células marcadas duplamente, consideradas células que passaram pelo processo de indução apoptótica e, por não terem sido fagocitados, são lisados e entram em necrose secundária.

Apesar dos efeitos de BinsVT *in vitro* serem pouco estudados, Mello (2011) demonstrou sua citotoxicidade em células MDCK (Madin-DarbyCanineKidney) com envolvimento apoptótico e redução do potencial transmembrânico mitocondrial. Nesse estudo,

a substância apresentou um potencial citotóxico mais acentuado do que os resultados encontrados nesse trabalho, uma vez que as células MDCK são células epiteliais do túbulo renal, incapazes de liberar mediadores inflamatórios interferentes na ação de BinsVT. Além disso, esse veneno e suas frações apresentam acentuada nefrotoxicidade, com redução de ritmo de filtração glomerular e cortes histológicos revelando morte celular nos túbulos renais (BRAGA *et al.*, 2008).

O presente estudo demonstrou o efeito proteolítico *in vitro* de BinsVT, confirmando os achados encontrados por Lira *et al.* (2007) e indicando a presença de metaloproteinases nesse veneno nas condições experimentais adotadas nesse trabalho. Esse achado é um indicativo de que os efeitos biológicos encontrados sobre macrófagos podem estar relacionados à ação catalítica direta sobre proteínas celulares.

Injúria e morte celular *in vitro* já foram descritas em ensaios realizados com metaloproteinases (svMPs) de outros venenos botrópicos. A svMP isolada de *B. atrox* demonstrou um efeito apoptótico sobre linhagem de células endoteliais BAEC, com inibição da progressão do ciclo celular, fragmentação de DNA e ativação de caspases (BRENES *et al.*, 2010). A metaloproteinase do veneno de *B. leucurus* provocou perda de adesão e alterações morfológicas importantes em células endoteliais (GREMSKI *et al.*, 2007). Esses autores sugerem que degradação das proteínas de matriz extracelular, responsáveis pela manutenção do contato e interação com as células circunvizinhas, está envolvida no processo de morte celular.

Além disso, diversos outros efeitos de natureza lesiva e/ou inflamatória foram encontrados em svMPs. Gay *et al.* (2005) demonstraram que a fração metaloproteinase do veneno de *B. alternatus* causou efeito hemolítico, mionecrótico e edematogênico em camundongos. Jararhagin, por sua vez, é indutora de um tipo específico de apoptose, conhecido como anoikis, em células endoteliais (TANJONI *et al.*, 2005). A anoikis é um mecanismo de apoptose induzido e mediado pela perda de adesão celular (SILVA, 2003). A mesma proteína demonstrou potencial edematogênico e hemorrágico (LAING *et al.*, 2003). Por fim, efeito mionecrótico, inflamatório e hemorrágico foi observado em uma metaloproteinase isolada do veneno de *B. asper* (GUTIÉRREZ *et al.*, 1995).

O veneno estudado nesse trabalho demonstrou atividade oxidativa sobre L-leucina, produzindo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), uma reação que caracteriza a atividade da enzima L-aminoácido oxidase (LAAO). Essa enzima está presente em muitos venenos animais, e sua

presença está associada a uma diversidade de efeitos biológicos. Foram descritos efeitos inflamatórios, citotóxicos, anticoagulantes, nefrotóxicos e antimicrobianos associados a LAAOs isoladas de venenos animais (BRAGA *et al.*, 2008; TORRES *et al.*, 2010; NAUMANN *et al.*, 2011). Em alguns desses casos, a adição de catalase inibiu total ou parcialmente os efeitos biológicos encontrados, indicando que, pelo menos em parte, o mecanismo de ação dessas LAAOs estão relacionados aos efeitos biológicos do peróxido. A LAAO isolada do veneno de *Bungarus fasciatus*, por exemplo, é capaz de migração de neutrófilos sem a presença de dano muscular, indicando que essa enzima é responsável, pelo menos em parte, pelo efeito inflamatório desse veneno, independente da ocorrência de lesão tecidual (WEI *et al.*, 2009). Além disso, estudando os efeitos antiofídicos do extrato das folhas de *Camelliasinensis L.*, Pithayanukulet *al.* (2010) identificou que esse extrato causou um bloqueio da atividade catalítica da LAAO presente em venenos de serpentes, e isso foi seguido de acentuada diminuição dos efeitos hemorrágicos e dermonecroticos, confirmando a importância dessa enzima no estabelecimento das lesões teciduais induzidas por venenos.

Além das svMPs e LAAOs, as PLA<sub>2</sub> são frações importantes dos venenos botrópicos, e não conhecidos vários efeitos biológicos dessa enzima. Sua capacidade de degradar fosfolipídios é uma característica que é comumente associada com lesões teciduais e citotoxicidade. A BnSP-7, uma miotoxina com atividade fosfolipásica do veneno de *Bothrops (neuwiedi) pauloensis*, causou edema, necrose tecidual e marcante liberação de IL-1 $\beta$ , IL-8 e IL-6, e foi observado que a ação dessas citocinas foi determinante da gravidade e progressão da lesão tecidual (OLIVEIRA *et al.*, 2009). É importante ressaltar, porém, que nem sempre a atividade enzimática da PLA<sub>2</sub> é necessária para que sejam observados efeitos biológicos importantes. Monteiro (2010), estudando duas PLA<sub>2</sub> isoladas do veneno de *B. erythromelas*, verificou que o efeitos tóxicos sobre a perfusão renal e sobre células MDCK foi mais acentuado na fração com baixa atividade enzimática, sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidos na toxicidade dessa fração.

Em conclusão, outros estudos podem ser desenvolvidos para determinar o quanto essas atividades enzimáticas são importantes para estabelecimento dos efeitos pró-inflamatórios do veneno de *B. insularis*. Ensaio promovendo bloqueio das atividades proteolítica, fosfolipásica e produtora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se tornam úteis, pois a identificação dos mecanismos de ação envolvidos na ação dos venenos pode contribuir para estratégias terapêuticas de manejo de pacientes picados.

*Conclusões*

## 7. CONCLUSÕES

O veneno da serpente *Bothropoides insularis* apresentou atividade proteolítica e produção de peróxido de hidrogênio *in vitro*. Adicionalmente, obteve potencial citotóxico tempo-dependente sobre macrófagos murinos em altas concentrações, com envolvimento necrótico e apoptótico. Paralelamente, foi encontrado um possível efeito proliferativo em menores concentrações, também de forma tempo-dependente. Esses achados sugerem a presença de frações com atividade lesiva e pró-inflamatória.

# *Referências Bibliográficas*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, A.R.; SANCHEZ,E.E.; MARQUEZ, A.; CARVAJAL, Z.; SALAZAR, A.M.; GIRÓN, M.E., ESTRELLA, A.; GIL, A.; GUERRERO, B.

Hemostatic properties of Venezuelan Bothrops snake venoms with special reference to Bothropsisab  
ela venom. **Toxicon**, v. 56, p. 926-935, 2010.

ALBUQUERQUE, H. N. de.; COSTA, T. B. G. da.; CAVALCANTE, M. L. F. Estudo dos  
acidentes ofídicos provocados por serpentes do gênero Bothrops no Estado da Paraíba.

**Revista de Biologia e ciências da terra**, v.5, n.1, 2004.

ANAZETTI, M. C.; MELO, O. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e  
molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, jan./jun. 2007.

ANTUNES, C.T.; YAMASHITA, K.M.; BARBARO, K.C.; SAIKI, M.; SANTORO, M.L.  
Comparative analysis of newborn and adult Bothrops jararaca snake venom. **Toxicon**, v. 56,  
1443–1458, 2010.

AZEVEDO-MARQUES, M. M. de.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais  
peçonhentos: Serpentes peçonhentas. **Medicina**, v. 36, p.480-489, 2003.

BACAL, N.S.; FAULHABER, M.H.W. Introdução à Citometria de Fluxo. In: \_\_\_\_\_.  
**Aplicação Prática em Citometria de Fluxo**. São Paulo: Atheneu, cap.1, p. 1-4.

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 A<sub>2</sub>. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 26, p. 16069-16072, 1997.

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

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.

BAYNES, J.W. Metabolismo Anaeróbico da Glicose nos Eritrócitos. In: BAYNES, J.W.; DOMINICZAK, M.H. **Bioquímica Médica**. Tradução da 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. Cap. 12, p. 147.

BÉRNILS, R. S. (org.). 2010. *Brazilian reptiles – List of species*.  
Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia.

BJARNSON, J. B.; FOX, W.J. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac Ther**, v62, p325-372, 1994.

BOCHNER R.; STRUCHINER C.J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad Saúde Pública**, v. 19, p. 7-16. 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.

BONFOCO, E.; KRAINIC, D.; ANKARCRONA, M.; NICOTERA, P.; LIPTON, S. A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 7162–7166, 1995.

BRAGA, M. D. M.; MARTINS, A. M. C.; ALVES, C. D.; BESERRA DE MENEZES, D.; MARTINS, R. D.; BARBOSA, P. S. F.; OLIVEIRA, I. M. S.; HIKARITTOYAMA, M.; TOYAMA, D. O.; FILHO, E. B. S. D.; FAGUNDES, F. H. R.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Purification and renal effects of phospholipase A2 isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**. v. 51, p. 181–190.

BRAGA, M. D. M.; MARTINS, A. M. C.; AMORA, D. N.; BESERRA DE MENEZES, D.; HIKARITTOYAMA, M.; 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.

BRAGA, M. D. M.; MARTINS, A. M. C.; AMORA, D. N.; BESERRA DE MENEZES, D.; HIKARITTOYAMA, M.; 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.

BRAGA, M. D. M.; MARTINS, A. M. C.; AMORA, D. N.; BESERRA DE MENEZES, D.; HIKARITTOYAMA, M.; 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 C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**. v. 47, p. 859–867, 2006.

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, 2001. **Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 2001.

BRASIL, 2012. **Epidemio- Ministério Da Saúde, SVS – Sistema De Informação De Agravos De Notificação –SINAN Net.** Acesso em 23/02/2013.

BRENES, O.; MUÑOZ, E.; ROLDÁN-RODRÍGUEZ, R.; DÍAZ, C. Cell death induced by Bothrops asper snake venom metalloproteinase on endothelial and other cell lines. **ExpMolPathol.** v. 88, n. 3, p. 424-32, 2010.

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

CARVALHO, A. L. O.; GUIMARAES, P. R.; ABREU, P. A.; DUTRA, D. L.S.; AZEVEDO, I. L.M. J.; RODRIGUES, C. R.; HO, P. L.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B. Identification and characterization of a new member of snake venom thrombin inhibitors from *Bothrops insularis* using a proteomic approach. **Toxicon.** v. 51, p. 659–671, 2008.

CHAKRABORTI, S. Phospholipase A<sub>2</sub> isoforms: a perspective. **Cell Signalling,** v. 15, p. 637-665, 2003.

CHATTOPADHYAY, P.K.; ROEDERER, M. Cytometry: Today's technology and tomorrow's horizons. **Methods,** v. 57, p. 251-258, 2012.

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

COGO, J. C.; LILLA, S.; SOUZA, G. H. M. F.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A<sub>2</sub> from the venom of *Bothrops insularis* (jararacailhoa). **Biochimie.** v. 88, p. 1947-1959, 2006.

DAVIDSON, F. F.; DENNIS, E. A. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipases A<sub>2</sub> from snake venom to human secreted forms. **J. Mol. Evol.,** v. 31, p. 228-238, 1990.

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: A clue for antibiotics and CAM. *eCAM*, v. 2, n. 1, p. 39-47, 2005.

DE MENEZES, R. R.; TORRES, A. F.; DA SILVA, T. S.; DE SOUSA, D. F.; LIMA, D. B.; NORJOSA, D. B.; NOGUEIRA, N. A.; OLIVEIRA, M. F.; DE OLIVEIRA, M. R.; MONTEIRO, H. S.; MARTINS, A.

M. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothropoides lutzii* venom. *Nat Prod Commun.*; v. 7, n. 1, p. 71-74, 2012.

DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon*, v. 40, n. 6, p. 659-665, 2002.

DYPBUKT, J. M.; ANKARCORONA, M.; BURKITT, M.; SJOHOLM, A.; STROM, K.; ORRENIUS, S.; NICOTERA, P. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 30553-30560, 1994.

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.

FISHER, D. E. Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.*, v. 15, n. 5, 2001.

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

GARCIA, L.M.; LEWIS, R.J. Therapeutic potential of venom peptides. *Nature*, v. 2, p. 790 – 802, 2003

GAY, C. C.; LEIVA, L. C.; MARUÑAK, S.; TEIBLER, P.; ACOSTA DE PÉREZ, O. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon**. v. 46, n. 5, p. 546-554, 2005.

GESKE, F. J.; GERSCHENSON, L. E. The biology of apoptosis. **Hum Pathol**, v. 32, p. 1029-38, 2001.

GREMSKI, L. H.; CHAIM, O. M.; PALUDO, K. S.; SADE, Y. B.; OTUKI, M. F.; RICHARDSON, M.; GREMSKI, W.; SANCHEZ, E. F.; VEIGA, S. S. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. **Toxicon**. v.50, n. 1, p. 120-134, 2007.

GRIESS, P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Uebereinigeazverbindungen." **Chem. Ber.**, v. 12, p. 426-428, 1879.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROMERO, M.; NÚÑEZ, J.; CHAVES, F.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Exp Mol Pathol**. v. 62, n. 1, p. 28-41, 1995.

HALE, A. J.; SMITH, C. A.; SUTHERLAND, L. C. *et al.* Apoptosis: molecular regulation of cell death. **Eur. J. Biochem.**, v. 236, p. 1-26, 1996.

HICKMAN, C. P. J.; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia**. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, cap. 28, p. 540-541, 846p.

HIGUCHI, D.A.; BARBOSA, C.M.V.; BINCOLETTA, C.; CHAGAS, J.R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F.; PESQUERO, J.B.; ARAÚJO, R.C.; PESQUERO, J.L. Purification and partial characterization of two phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 89, p. 319 - 328, 2007.

ISRAELS, L. G.; ISRAELS, E. D. Apoptosis. *Stem Cells*, n. 17, p. 306-313, 1999.

JORGE, R. J. B.; MARTINS, A. M.C.; MORAIS, I. C. O.; XIMENES, R. M.; RODRIGUES, F. A. R.; SOARES, B. M.; EVANGELISTA, J. S. A. M; TOYAMA, M. H.; MARTINS, A. M. A.; MORAES FILHO, M. O.; MONTEIRO, H. S. A. In vitro studies on *Bothrops* venom scytotoxic effect on tumor cells. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**. v. 9, p. 249-253, 2011.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; DURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, n. 26, p. 239-257, 1972.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Toxicon**, v.42, p.827-840, 2003.

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.

LAING, G. D.; CLISSA, P. B.; THEAKSTON, R. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; TAYLOR, M. J. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. **Eur J Immunol**. v. 33, n. 12, p. 3458-3463, 2003.

LAING, G.D.; MOURA-DA-SILVA, A.M. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. **Toxicon**, v.45, p.987-996, 2005.

LEIGUEZ, E.; ZULIANI, J. P.; CIANCIARULLO, A. M.; FERNANDES, C. M.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. A group IIA-secreted phospholipase A<sub>2</sub> from snake

venom induces lipid body formation in macrophages: the roles of intracellular phospholipases A2 and distinct signaling pathways. **J Leukoc Biol.** v. 90, n. 1, p. 155-166, 2011.

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.

LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **J. Neurochem**, v. 69, p. 581-593, 1997.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 885-901, 2003.

LORO, L. L.; A. C. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. **J Oral PatholMed**, v. 32, p. 125-38, 2003.

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.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim.Biophys.Acta**, v. 1477, p. 146-156, 2000.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**, v. 407, p. 796-801, 2000.

MELGAVAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, Luiz da Costa et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003, cap. 4, p. 33, 468p.

MENEZES, R. R. P. P. B. **Estudo dos potenciais antimicrobiano e antiparasitário do veneno da serpente *Bothrops lutzi* e avaliação de sua citotoxicidade *in vitro***. 2010. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2010.

MORAIS I. C.; TORRES, A. F.; PEREIRA, G. J.; PEREIRA, T. P.; BEZERRA DE MENEZES, R. R. P. P.; MELLO, C. P.; COELHO, J. A. R.; BINDÁ, A. H.; TOYAMA, M. H.; MONTEIRO, H. S.; SMAILI, S. S.; MARTINS, A. *M. Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. **Toxicon**. v. 61, p. 38-46, 2013.

MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; AMARAL, R. B.; ZAMUNÉR, S. R.; TEIXEIRA, C. F. Effects of *Bothrops asper* snake venom on the expression of cyclooxygenases and production of prostaglandins by peritoneal leukocytes in vivo, and by isolated neutrophils and macrophages in vitro. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v. 80, n. 2-3 p. 107-114, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **J Immunol Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOURA-DA-SILVA, A.M; MARCINKIEWCZ, C.; MARCINKIEWCZ, M.; NIEWIAROWSKI, S. Selective recognition of alpha2beta1 integrin by jararjhagin, a Metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. **Thromb. Res.**, v.102, p.153-159, 2001.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A<sub>2</sub>. **J. Biochem.**, v. 131, n. 3, p. 285-292, 2002.

NALBANTSOY, A.; EREL, S. B.; KÖKSAL, C.; GÖÇMEN, B.; YILDIZ, M. Z.; KARABAYYAVAŞOĞLU, N. U. Viper venom induced inflammation with

Montiviperaxanthina (Gray, 1849) and the anti-snake venom activities of *Artemisia absinthium* L. in rat. **Toxicon**. 2013 Jan 17;65C:34-40. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.12.017. [Epub ahead of print].

NICOLAS J. P.; LIN, Y.; LAMBEAU, G.; GHOMASHCHI, F.; LAZDUNSKI, M.; GELB, M. H. Localization of structural elements of bee venom phospholipase A<sub>2</sub> involved in N-type receptor binding and neurotoxicity. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 7173-7181, 1997.

NUNES, E. S.; SOUZA, M. A.; VAZ, A. F.; SILVA, T. G.; AGUIAR, J. S.; BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M.; GUARNIERI, M. C.; COELHO, L. C.; CORREIA, M. T. Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**. v. 59, n. 7-8, p. 667-671, 2012.

NUNES, E. S.; SOUZA, M. A.; VAZ, A. F.; SILVA, T. G.; AGUIAR, J. S.; BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M.; GUARNIERI, M. C.; COELHO, L. C.; CORREIA, M. T. Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**. v. 59, n. 7-8, p. 667-671, 2012.

NUNES, E. S.; SOUZA, M. A.; VAZ, A. F.; SILVA, T. G.; AGUIAR, J. S.; BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M.; GUARNIERI, M. C.; COELHO, L. C.; CORREIA, M. T. Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**. v. 59, n. 7-8, p. 667-671, 2012.

OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; MENDES, M. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; HAMAGUCHI, A.; DE ALCÂNTARA, T. M.; CLISSA, P. B.; RODRIGUES, V. M. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedi) pauloensis* snake venom. **Toxicon**. v. 53, n. 5, p. 560-569, 2009.

OLIVEIRA, F.N.; BRITO, M.T.; MORAIS, I.C.O.; FOOK, S.M.L.; ALBUQUERQUE, H.N. Accidents caused by *Bothrops* and *Bothropoides* in the State of Paraíba: epidemiological and clinical aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, 2010.

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

OWNBY, C.L.; SELIESTRE-DE-ARAUJO, H.S.; WHITE, S.P., FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**, v.37, p. 411–445, 1999.

PATRÃO-NETO, F. C.; AMORIM-TOMAZ, M.; ABRAHÃO-STRAUCH, M.; MONTEIRO-MACHADO, M.; DA SILVA, R. J. J.; MELO, P. A. Dexamethasone Antagonizes the in vivo Myotoxic and Inflammatory Effects of Bothrops Venoms. **Toxicon**. 2013 Feb 14. pii: S0041-0101(13)00057-3. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.01.023. [Epub ahead of print]

PAWELEK, P. D.; CHEAN, J.; COULOMBE, R.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; VRIELINK, A. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. **EMBO J.**, v. 19, n. 16, p. 4204-4215, 2000.

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.

PITHAYANUKUL, P.; LEANPOLCHAREANCHAI, J.; BAVOVADA, R. .Inhibitory effect of tea polyphenols on local tissue damage induced by snake venoms. **Phytother Res**. Jan; 24Suppl 1:S56-62. 2010.

QURESHI, N.; MORRISON, D. C.; REIS, J. Proteasome protease mediated regulation of cytokine induction and inflammation. **BiochimBiophysActa**. v. 1823, n. 11, p. 2087-2093, 2012.

RAIBEKAS, A. A.; MASSEY, V. Primary structure of the snake venom L-amino acid oxidase shows high homology with the mouse B cell interleukin 4-induced Fig1 protein. **Biochem.Biophys.Res. Commum.**, v. 248, n. 3, p. 476-478, 1998.

RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A; JEYASEELAN, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. **Toxicon**, v44, p1-17, 2004.

RIBEIRO L. A.; ALBUQUERQUE, M. J.; DE CAMPOS, V. A.; KATZ, G.; TAKAOKA, N. Y.; LEBRÃO, M. L.; JORGE, M. T. Deaths caused by venomous snakes in the State of São Paulo: evaluation of 43 cases from 1988 to 1993. **Rev Assoc Med Bras.** v.44, n. 4, p. 312-318, 1998.

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

RUCAVADO, A.; HENRÍQUEZ, M.; GARCÍA, J.; GUTIÉRREZ, J.M. Assessment of metalloproteinase inhibitors clodronate and doxycycline in the neutralization of hemorrhage and coagulopathy induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v.52, p.754-759, 2008.

SANCHEZ, M.C.A. Testes sorológicos. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-ímmunes.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2001. Cap. 2, p. 23-28.

SANT'ANA, C. D.; MENALDO, D. L.; COSTA, T. R.; GODOY, H.; MULLER, V. D. M.; AQUINO, V. H.; ALBUQUERQUE, S.; SAMPAIO, S. V.; MONTEIRO, M. C.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Antiviral and antiparasite properties of the L-amino acid oxidase from the snake *Bothrops jararaca*: cloning and identification of a complete cDNA sequence. **Biochem. Pharmacol.**, v. 76, p. 279-288, 2008.

SELISTRE, H. S.; QUEIROZ, L. S.; CUNHA, O. A.; SOUZA, G. E.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararacailhoa) snake venom. **Toxicon**. v. 28, p. 261-273, 1990.

SERRANO, S.M.; WNG, D.; SHANNON, J.D.; PINTO, A.F.; POLANOWSKA-GRABOWSKA, R.K.; FOX, J.W. Interaction of the cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinase with the A1 domain of von Willebrand factor promotes site-specific

proteolysis of von Willebrand factor and inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet aggregation. **FEBS J.**, v. 274, p. 3611-3621, 2007.

SILVA, E. F. **Indução de apoptose relacionada com perda de adesão (anoikis) em células A431 por óxido nítrico.** 2003. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: classification and characterization. **Biochim.Biophys.Acta**, v. 1488, p. 1-19, 2000.

SLATER, K. Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery. **Current Opinion in Biotechnology.** v. 12, n. 1, p. 70-74, 2001.

SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications of phospholipases A<sub>2</sub> 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.

STÁBELI, R. G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B.; PIETRO, R. C. L. R.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; OLIVEIRA, E. B.; SOARES, A. M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 12, p. 2881-2886, 2004.

STÁBELI, R. G.; SANT'ANA, C. D.; RIBEIRO, P. H.; COSTA, T. R.; TICLI, F. K.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; ALBUQUERQUE, S.; MALTA-NETO, N. R.; MARINS, M.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. **Int. J. Biol. Macrom.**, v. 41, p. 132-140, 2007.

SUN, J.; ZHANG, X.; BRODERICK, M.; FEIN, H. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. **Sensors**, v. 3, p. 276-284, 2003.

TANJONI, I.; WEINLICH, R.; DELLA-CASA, M. S.; CLISSA, P. B.; SALDANHA-GAMA, R. F.; DE FREITAS, M. S.; BARJA-FIDALGO, C.; AMARANTE-MENDES, G. P.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selectively in endothelial cells. **Apoptosis**. v. 10, n. 4, p. 851-861, 2005.

TONELLO, F.; SIMONATO, M.; AITA, A.; PIZZO, P.; FERNÁNDEZ, J.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MONTECUCCO, C. A Lys49-PLA2 myotoxin of *Bothrops asper* triggers a rapid death of macrophages that involves autocrine purinergic receptor signaling. **Cell Death Dis.** Jul 5;3:e343, 2012.

TORII, S.; YAMANE, K.; MASHIMA, T.; HAGA, N.; YAMAMOTO, K.; FOX, J. W.; NAITO, M.; TSURUO, T. Molecular cloning and functional analysis of apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. **Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 3197-3205, 2000.

TORRES, A. F. C.; DANTAS, R. T.; MENEZES, R. R. P. P. B.; TOYAMA, M. H.; FILHO, E. D. OLIVEIRA, M. F.; NOGUEIRA, N. A. P.; OLIVEIRA, M. R.; MONTEIRO, H. S. A.; MARTINS, A. M. C. Antimicrobial activity of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops leucurus* snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v. 16, n. 4, p. 614-622, 2010.

TORRES, A. F. C.; DANTAS, R. T.; TOYAMA, M. H.; DIZ FILHO, E.; ZARA, F. J.; DE QUEIROZ, M. G. R.; NOGUEIRA, N. A. P.; DE OLIVEIRA, M. R.; TOYAMA, D. O.; MONTEIRO, H. S.; MARTINS, A. M. Antimicrobial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. **Toxicon**. v. 55, n. 4, p. 795-804, 2010.

TU, A. T. Overview of snake venom chemistry. Natural toxins II. **Plenum Press**, p37-62, 1996.

VALENTE, R. H.; GUIMARÃES, P. R.; JUNQUEIRA, M.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; SOARES, M. R.; CHAPEAUROUGE, A.; TRUGILHO, M. R.O.; LEÓNA, I. R.; ROCHA, S. L.G.; CARVALHO, A. L. O.; WERMELINGER, L. S.; DUTRA, D. L.S.; LEÃO L. I.; AZEVEDO, I. L.M. J.; HO, P. L.; ZINGALI, R. B.; PERALES, J.; DOMONT, G.

*B.Bothropsinsularis* venomics: A proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. **Journal of Proteomics**. v. 72, 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.

VARGAS, F. F. R.; SOTO, L. A. P.; SOUZA, D. M.; MARAGONI, S. Biological and biochemical characterization of two new PLA2 isoforms Cdc-9 and Cdc-10 from *Crotalus durissus cumanensis* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 151, p. 66–74, 2010.

VIEIRA SANTOS, M. M.; SANT'ANA, C. D.; GIGLIO, J. R.; SAMPAIO, S. V.; DA SILVA, R. J.; SOARES, A. M.; et al. Antitumoral effect of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 102, p. 533-542, 2008.

VIEIRA, G.C. **Avaliação *in vitro* do potencial citotóxico de quatro análogos de benzotiazóis**. 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2011.

WARRELL D.A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management. In: Campbell JA, Lamar WW (eds) *The venomous reptiles of the Western Hemisphere*. **Cornell University Press**, New York, p.709-715, 2004.

WEI, J. F.; WEI, Q.; LU, Q. M.; TAI, H.; JIN, Y.; WANG, W. Y.; XIONG, Y. L. Purification, characterization and biological activity of an L-amino acid oxidase from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, v. 35, p. 219-339, 2002.

WEI, J. F.; YANG, H. W.; WEI, X. L.; QIAO, L. Y.; WANG, W. Y.; HE, S. H. Purification, characterization and biological activities of the L-amino acid oxidase from *Bungarus fasciatus* snake venom. **Toxicon**. v. 54, n. 3, p. 262-271, 2009.

XU, C.; MA, D.; YU, H.; LI, Z.; LIANG, J.; LIN, G.; ZHANG, Y.; LAI, R. A bactericidal homodimeric phospholipases A<sub>2</sub> from *Bungarus fasciatus* venom. **Peptides**, v. 28, p. 969-973, 2007.

YU, S. P. ; CHOI, D. W. Ions, cell volume, and apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 9360-9362, 2000.

ZHOU, Z. H.; WANG, J. X.; LIU, B. J.; LI, M.; LU, Y.; CHEN, H. S. Contribution of the spinal P2X7 receptors to bee venom-induced nociception and inflammation in conscious rats. **Neurosci Lett**. v. 7, 531(2), p. 145-8, 2012.

ZIEGLER, U; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol. Sci.**, v. 19, p. 124-128, 2004.

ZOCCAL, K. F.; BITENCOURT, C. D. A. S.; SORGI, C. A.; BORDONKDE, C.; SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C.; FACCIOLI, L. H. Ts6 and Ts2 from *Tityus serrulatus* venom induce inflammation by mechanisms dependent on lipid mediators and cytokine production. **Toxicon**. v. 61, p. 1-10, 2013.

ZONG, W. X.; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. **Genes Dev.**, v. 20, p. 1-15, 2006.

ZULIANI, J. P.; GUTIÉRREZ, J. M.; CASAS E SILVA, L. L.; SAMPAIO S. C.; LOMONTE, B.; TEIXEIRA C. F. P. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A<sub>2</sub>. **Toxicon**. v. 46, n. 5, p. 523-32, 2005.