UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação das vias de sinalização de danos e indução de citocinas
inflamatórias na presença da toxina BthTX-I, isolada da peçonha de
Bothrops jararacussu

Cássio Prinholato da Silva

Ribeirão Preto

- 2012 -

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação das vias de sinalização de danos e indução de citocinas
inflamatórias na presença da toxina BthTX-I, isolada da peçonha de
Bothrops jararacussu

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado: Cássio Prínholato da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Suely Vilela

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 19/10/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

- 2012 -

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Prinholato da Silva, Cássio

Avaliação das vias de sinalização de danos e indução de citocinas inflamatórias na presença da toxina BthTX-I, isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*. Ribeirão Preto, 2012.

117 p.: il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Sampaio, Suely Vilela.

1. BthTX-I. 2. Apoptose. 3. Miotoxina. 4. Morte celular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Aluno: Cássio Prinholato da Silva

Nome do trabalho: Avaliação das vias de sinalização de danos e indução de citocinas inflamatórias na presença da toxina BthTX-I, isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho aos meus avós
Wálter, Vera, Antônio e Alzíra,
aos meus pais e à minha
querida namorada por
me amarem e pelo
carinho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar o dom da vida e pelas pessoas maravilhosas que trouxe em minha vida.

À Profa. Suely, por abrir as portas de seu laboratório, pela oportunidade de fazer minha pós-graduação e pela disposição em me ajudar com os problemas que sempre lhe apresentei.

A meus avós Wálter (in memorian), Vera, Antônio (in memorian) e Alzira (in memorian), pelo amor dado ao longo de suas vidas. Vocês são pessoas maravilhosas em minha vida, obrigado por tanto carinho e amor.

A meus pais Francisco e Marli, pelo amor incondicional, pelo carinho, correções e punições, que moldaram meu caráter, pelo incentivo ao longo de minha vida, pelo apoio, fé e esperanças dadas a mim. Vocês são demais.

Ao Prof. Sérgio de Albuquerque e à sua aluna Mariana Rosa, pela paciência e apoio na reta final de meu projeto.

À Dra. Thaís Gasporoto, da Faculdade de Odontologia de Bauru (USP-BAURU), pela disponibilidade, atenção e colaboração na realização das dosagens de citocinas.

Ao Laboratório de Nutrigenômica, onde desenvolvi parte do meu projeto de pesquisa. Obrigado pessoal, por me ajudarem e cederem gentilmente o laboratório, bem como se mostrarem profissionais íntegros e dedicados. Obrigado pela ajuda.

Não posso esquecer também de agradecer a companhia prazerosa do pessoal do laboratório, meus amigos, Vinícius, Farah, Marinas, Regis, Jeferson, Tarcila, Carla, Léo, Bruno e Xandão, obrigado galera.

À minha família do dia a dia, meus irmãos Franco, (que demonstrou ser um profissional digno e exemplo de pessoa), Sante, Luiz, Norival, Marco, Danilo, Lucas, Renato (vovozinho), Thales,

Wallace e minhas irmãzinhas, Carolina, Tatiana, Lanuze, nossa "mamãe" Dona Adélia e também a minha super amigona Tássinha, minha "cria", sua moça "crazy" você é nota dez. Obrigadoo a todos vocês pelos momentos alegres do nosso laboratório.

Aos meus amigos de pós, Mateus, Elisa, Johara, Renata, Roberto, Wyllis, Rodrigo, Carol Marroni, Fernanda, Fernando, Felipe.

Um agradecimento às minhas amigonas Fabiana, Leka e Maju, pelos bons e divertidos momentos no Flowjo e ModFit.

A toda a galera do AikilUSP, pelo ensinamento passado e filosofia de vida, sempre me ajudando e ter "harmonia", "equilíbrio" e disposição para o dia-a-dia.

À Regina Aguenta (Rê), Ana e Rose, secretárias que sempre se dispuseram a ajudar a todo o momento em que precisei.

Aos meus companheiros de futsal de todas as terças e quintas; o pessoal do Prof. Abel, obrigado pelos momentos de descontração e risadas que sempre tivemos.

Agradeço a duas pessoas incríveis, Hélder e Raquel, por sua amizade, companheirismo e exemplo de pessoas. Valeu Hélder pela sua ajuda e disposição. Já a você "Teacher" (Raquel), o que eu vou dizer, devo praticamente tudo a você. Você me ensinou tudo que sei, como fazer, porque fazer, onde achar as respostas, criou seu "fiote", me ensinou a ser responsável e dedicado. Vocês dois são exemplos de dignidade, integridade, honestidade, bondade e etc, etc, etc, e mais etc...(rsrs). Agradeço por fazerem parte de minha vida!

Por fim agradeço a um alguém todo especial para mim, alguém que ilumina minha vida todo o dia, que me faz enxergar cor onde antes era cinza, alguém que me enche de alegria,

carinho e amor. Agradeço a você minha Gatinha (Tamiris), por entrar na minha vida e trazer essa enorme felicidade que sinto ao seu lado, felicidade essa que divido com você a cada dia. Nosso amor surgiu de uma amizade linda e nos amamos de modo tão lindo, hoje não vejo mais minha vida sem você, obrigado por me amar, apoiar, amparar, resumindo, obrigado por me AMAR! Eu a amo meu A..M..O..R!

Agradeço às fundações de apoio à pesquisa, CAPES, CNPq e principalmente à FAPESP pelo apoio financeiro (processo nº 2010/03243-3), viabilizando a realização deste projeto.

RESUMO

PRINHOLATO DA SILVA, C. **Avaliação das vias de sinalização de danos e indução de citocinas inflamatórias na presença de BthTX-I, isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

As fosfolipases são bastante estudadas e podem ser encontradas de forma abundante nas peçonhas. Algumas fosfolipases que sofrem modificação no resíduo 49 com a substituição do aminoácido Asp por Lys, o que provoca perda do seu sítio catalítico, são classificadas como miotoxinas. A miotoxina BthTX-I foi isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*, possui 121 resíduos de aminoácidos, pI 8,2 e massa molecular de 13kDa. O objetivo do presente projeto foi avaliar a ação da BthTX-I, quanto à sua ação citotóxica, indutora de morte celular, interferência na cinética celular e expressão de genes responsáveis pela morte celular em quatro linhagens tumorais, HL-60 (leucemia promielocítica), HepG-2 (hepatocarcinoma humano), PC-12 (feocromocitoma murino) e B16F10 (melanoma murino). Também foi analisada a indução de citocinas inflamatórias IL-8 e TNF- α em linhagens humanas HL-60 e HepG2. A citotoxicidade, avaliada pela metodologia do MTT, apresentou valores citotóxicos em torno de 62, 53, 53 e 63%, respectivamente para HepG2, HL-60, PC12 e B16F10. A toxina mostrou ação moduladora do ciclo celular na fase S em células HepG2; na fase G2/M em células HL-60. Nas linhagens B16F10 e PC-12 a toxina provocou atraso na fase G0/G1 e redução de células na fase S e G2/M. O perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% mostrou fragmentação do conteúdo do DNA, indicando possível apoptose, que foi confirmada pelo ensaio de morte celular por citometria de fluxo. O ensaio revelou que a linhagem B16F10 tem maior índice apoptótico (~40%), seguido da HepG2 (~35%), PC-12 (~25%) e HL-60 (~4%). A indução de citocinas pela metodologia de ELISA apresentou valores elevados de IL-8 para linhagem HL-60 (~400 pg/mL) e HepG2 (~400 pg/mL), sugerindo uma possível quimiotaxia/migração de células de defesa. TNF- α também apresentou alteração em seus níveis representando cerca de 150 pg/mL na linhagem HepG2. A expressão dos genes *Bax*, *Bcl-2* e *p53* demonstrou que o gene *p53* se altera somente na linhagem HepG2, todavia a expressão dos genes *Bax* e *Bcl-2* mostrou ser diferente para cada linhagem. Em células B16F10 a toxina aumentou os níveis de *Bax* e diminuiu os níveis de *Bcl-2* enquanto que, as células PC-12 exibiram aumento nos níveis de ambos. Em HepG2 houve redução da expressão do gene antiapoptótico *Bcl-2* e valor inalterado de *Bax*, ao passo que a linhagem HL-60 apresentou resultado contrário ao de células HepG2, com aumento na expressão de *Bax* e valores inalterados de *Bcl-2*. Assim a toxina mostra diferente ação na expressão dos genes responsáveis pela apoptose em diferentes linhagens celulares, mostrando que a BthTX-I influencia a expressão desses genes, ou promove apenas a alteração de desses, levando assim à apoptose celular das linhagens tratadas com a miotoxina. Diante dos dados obtidos ficou evidenciado o potencial antitumoral da BthTX-I levando a busca de outros mecanismos de atuação da toxina, abrindo perspectivas de sua aplicação biotecnológica para a produção de novo fármaco antitumoral e tornando-se uma terapia alternativa a essa enfermidade.

Palavras-chave: BthTX-I, apoptose, miotoxina, morte celular.

ABSTRACT

PRINHOLATO DA SILVA, C. **Evaluation of damage signaling pathways and induction of inflammatory cytokines in the presence of BthTX-I, isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom.** Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Phospholipases are widely studied and can be found in abundance in several animal venoms. Some phospholipases, classified as myotoxins, present a modification at residue 49, with replacement of the amino acid Asp by Lys, causing loss of their catalytic site. BthTX-I was isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* and is a myotoxin with 121 amino acid residues, pI 8.2 and a molecular mass of 13kDa. The aim of this study was to evaluate BthTX-I regarding its cytotoxic action, induction of cell death, interference with cell kinetics and expression of genes responsible for cell death in four tumor cell lines: HL-60 (promyelocytic leukemia), HepG2 (human hepatocellular carcinoma), PC-12 (murine pheochromocytoma) and B16F10 (murine melanoma). The induction of inflammatory cytokines (IL-8 and TNF- α) in the human cell lines HepG2 and HL-60 was also analyzed. Cytotoxicity, as assessed by the MTT methodology, showed values around 62, 53, 53 and 63% for HepG2, HL-60, PC12 and B16F10, respectively. The toxin showed modulating action of the cell cycle in the S phase in HepG2 cells, in the G2/M phase in HL-60 cells and delay in the G0/G1 phase. The toxin also caused a delay in the G0/G1 phase and reduced the number of cells in the S and G2/M phases in B16F10 and PC-12 cell lines. The electrophoretic profile on 1,5% agarose gel showed fragmentation of DNA content, possibly indicating apoptosis, which was confirmed by flow cytometry cell death assays. This assay revealed that B16F10 cells presented a higher apoptotic rate (~40%), followed by HepG2 (~35%), PC-12 (~25%) and HL-60 (~4%) cells. Induction of cytokines analyzed by ELISA showed high levels of IL-8 in HL-60 (~400 pg/mL) and HepG2 (~400 pg/mL) cells, suggesting a possible chemotaxis and migration of immune cells. The levels of TNF- α also showed changes, representing about 150 pg/mL in HepG2 cells and 14 pg/mL in HL-60 cells. Gene expression of *Bax*, *Bcl-2* and *p53* showed that the *p53* gene did not change only in HepG2 cells, with the gene expression of *Bax* and *Bcl-2* being different for each cell line. The toxin increased the levels of *Bax* and decreased the levels of *Bcl-2* in B16F10 cells, while PC-12 cells showed increased levels of both genes. Regarding HepG2 cells, a decrease in the expression of the antiapoptotic gene *Bcl-2* was observed, with unchanged values for *Bax*, while opposite results were observed for HL-60 cells, with increased expression of *Bax* and unchanged values of *Bcl-2*. Thus, the toxin showed different actions on the expression of genes responsible for apoptosis in different cell lines, showing that BthTX-I influences the expression of both genes, promoting changes in one or another apoptotic gene, thus leading the tumor cell lines treated with this myotoxin to apoptosis. The obtained data evidenced the antitumor potential of BthTX-I, leading to the search for other mechanisms of action of this toxin and opening prospects for its biotechnological applications for the production of new anti-cancer drugs.

Keywords: BthTX-I, apoptosis, myotoxin, cell death.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sítio de ação das fosfolipases.....	8
Figura 2: Esquema de suspensão do ciclo celular na fase G1.	14
Figura 3: Esquema de suspensão do ciclo celular na fase G2.....	15
Figura 4: Vias de apoptose.....	19
Figura 5: Diferenças morfológicas entre morte por apoptose e por necrose.....	21
Figura 6: Purificação da BthTX-I da peçonha de <i>B. jararacussu</i>	44
Figura 7: Viabilidade celular da linhagem HepG2 após tratamento com BthTX-I...45	
Figura 8: Viabilidade celular da linhagem HL-60 após tratamento com BthTX-I...47	
Figura 9: Viabilidade celular da linhagem PC-12 após tratamento com BthTX-I...48	
Figura 10: Viabilidade celular da linhagem B16F10 após tratamento com BthTX-I.....	50
Figura 11: Inibição da progressão do ciclo celular em células HepG2 após o tratamento com BthTX-I.....	52
Figura 12: Inibição da progressão do ciclo celular em células HL-60 após o tratamento com BthTX-I.....	53
Figura 13: Inibição da progressão do ciclo celular em células B16F10 após o tratamento com BthTX-I.....	55
Figura 14: Inibição da progressão do ciclo celular em células PC-12 após o tratamento com BthTX-I.....	57
Figura 15: Perfil apoptótico/necrótico da linhagem HL-60 tratada com BthTX-I....	59
Figura 16: Perfil apoptótico/necrótico da linhagem HepG2 tratada com BthTX-I..61	
Figura 17: Perfil apoptótico/necrótico da linhagem PC-12 tratada com BthTX-I....	63
Figura 18: Perfil apoptótico/necrótico da linhagem B16F10 tratada com BthTX-I..64	

Figura 19: Fragmentação de DNA em gel de agarose a 1,5%: Células HL-60 submetidas ao tratamento com BthTX-I.....	66
Figura 20: Fragmentação de DNA em gel de agarose a 1,5%: Células HepG2 submetidas ao tratamento com BthTX-I.....	67
Figura 21: Fragmentação de DNA em gel de agarose a 1,5%: Células B16F10 submetidas ao tratamento com BthTX-I.....	68
Figura 22: Fragmentação de DNA em gel de agarose a 1,5%: Células PC-12 submetidas ao tratamento com BthTX-I.....	69
Figura 23: Genes <i>Bax</i> , <i>Bcl-2</i> e <i>p53</i> expressos na linhagem HL-60.....	71
Figura 24: Genes <i>Bax</i> , <i>Bcl-2</i> e <i>p53</i> expressos na linhagem HepG2.....	72
Figura 25: Genes <i>Bax</i> , <i>Bcl-2</i> e <i>p53</i> expressos na linhagem PC-12.....	74
Figura 26: Genes <i>Bax</i> , <i>Bcl-2</i> e <i>p53</i> expressos na linhagem B16F10.....	75
Figura 27: Indução de citocina IL-8 em linhagem HepG2 na presença de BthTX-I.....	77
Figura 28: Indução de citocina IL-8 em linhagem HL-60 na presença de BthTX-I.....	78
Figura 29: Indução de TNF- α em linhagem HepG2 na presença de BthTX-I.....	80
Figura 30: Indução de TNF- α em linhagem HL-60 na presença de BthTX-I.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diferenças morfológicas entre células em apoptose e necrose20

Tabela 2: Condições de tempo, temperatura e ciclos, para a amplificação de genes pelo método de PCR em tempo real (RT-PCR).....40

LISTA DE ABREVIATURAS

B16F10	Linhagem celular de melanoma murino
BP	Pares de base (<i>base pair</i>)
DMEM	Meio de cultura (modificação do meio basal <i>Eagle</i> –BME)
DMSO	Dimetilsulfóxido
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
HepG2	Linhagem celular de hepatocarcinoma humano
HL-60	Linhagem celular de leucemia promielocítica aguda humana
IL	Interleucina
MTT	3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium
PBS	Tampão Salina Fosfato
PC-12	Linhagem celular de tumor de glândula adrenal
PI+/AV+	Iodeto de Propídeo positivo e anexina V positiva
PLA₂	Fosfolipase A ₂
RPMI	Meio de cultura (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
TBE	Tampão borato-EDTA
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>tumor necrosis fator</i>)

Sumário

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	v
Lista de Abreviaturas.....	vi
Introdução.....	1
1.1 <i>As serpentes</i>	2
1.2. O Gênero <i>Bothrops</i>	5
1.2.1 <i>Bothrops jararacussu</i>	6
1.3 Fosfolipases	6
1.4 Miotoxinas e BthTX-I	10
1.5 Ciclo celular.....	12
1.6 Morte celular	16
1.6.1 <i>Apoptose</i>	17
1.6.2 <i>Necrose</i>	19
1.7 Ações de peçonhas/toxinas sobre linhagens celulares.....	21
1.8 Citocinas e envenenamento.....	24
Objetivos	28
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
Materiais e métodos.....	30
3.1 Material	31
3.1.1 Toxina	31

3.1.2 Linhagens Celulares	31
3.1.3 Outros reagentes	31
3.2 Métodos	31
3.2.1 Purificação da BthTX-I	31
3.2.1.1.Cromatografia de exclusão molecular da peçonha de <i>B. jararacussu</i>	31
3.2.1.2.Cromatografia de troca iônica em coluna Resource Q da fração BjPIV	32
3.2.1.3.Cromatografia de fase reversa em coluna C18-ODS	32
3.2.1.4.Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	32
3.2.1.5 Determinação quantitativa de proteínas	33
3.2.2 Manutenção da linhagem de células em suspensão e semi-aderentes (HL-60 e PC-12)	33
3.2.2.1 Subcultivo da linhagem de células em suspensão e semi-aderentes	33
3.2.3 Manutenção das linhagens de células aderentes (HepG2 e B16F10)	34
3.2.3.1 Subcultivo das linhagens de células aderentes	34
3.2.4 Tratamento com a toxina BthTX-I	35
3.2.4.1 Viabilidade celular	35
3.2.4.2 Ensaios de citotoxicidade (MTT)	36
3.2.4.3 Análise de apoptose/necrose	36
3.2.4.4 Análise do ciclo celular	38
3.2.4.5 Dosagem de citocinas inflamatórias por ELISA	39
3.2.4.6 Expressão dos genes pró e anti-apoptótico Bax, Bcl-2 e p53	39
3.3 Análise Estatística	41
Resultados	42
4.1 Purificação da BthTX-I da peçonha de <i>B. jararacussu</i>	43
4.2 Avaliação da citotoxicidade induzida pela BthTX-I	43
4.3 Análise da cinética do ciclo celular	49
4.3.1. Células HepG2	49

4.3.2. Células HL-60	51
4.3.3 Células B16F10	54
4.3.4 Células PC-12.....	56
4.4 Análise do potencial apoptótico/necrótico da BthTX-I	58
4.5 Expressão dos genes pró e anti-apoptóticos: <i>Bax</i> , <i>Bcl-2</i> e <i>p53</i>	65
4.6 Análise das citocinas inflamatórias IL-8 e TNF- α	76
Discussão	82
Conclusão	94
Referências Bibliográficas	95

Introdução

1.1 As serpentes

Animais peçonhentos são aqueles que possuem glândulas especializadas na produção de veneno que se comunica com dentes ocos, ou ferrões, ou agulhões, por onde o veneno passa ativamente (ex.: serpentes, aranhas, escorpiões, abelhas). Animais venenosos são aqueles que produzem veneno, mas não possuem um aparelho inoculador (dentes, ferrões) e provocam envenenamento passivo por contato (taturana), por compressão (sapo) ou por ingestão (peixe baiacu) (SINITOX, 2011).

Entre as toxinas animais, estão presentes as toxinas oriundas de peçonhas das serpentes, as quais são fontes de vários componentes bioativos com um amplo espectro de atividades biológicas, com função primordial de digestão e paralisia da presa e que constituem valores potenciais de uso médico e biotecnológico (BARRAVIERA, 1994).

Estima-se que existem cerca de 2900 espécies de serpentes no mundo, dispostas em 20 famílias e 465 gêneros, dos quais 410 são considerados peçonhentos e classificados de acordo com suas características morfológicas em quatro famílias: *Viperidae*, *Elapidae*, *Hydrophiidae* e *Colubridae*, espalhadas por todo o mundo (BARRAVIERA, 1999; MEBS, 2002; CARDOSO et al., 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007).

No Brasil, podemos dar destaque a duas famílias: *Viperidae* e *Elapidae*. Para a família *Viperidae* os gêneros mais conhecidos são: *Bothrops*, *Bothropoides*, *Rhinocerophis*, *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucu). O gênero mais conhecido da família *Elapidae* é o gênero *Micrurus* (corais), (BÉRNILS, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Fenwick et al. (2009) e Bérnils et al. (2010) classificaram as serpentes da família *Viperidae*, mais precisamente o gênero *Bothrops*, cujas espécies contidas nesse gênero, foram realocadas em 5 gêneros: *Bothrops*, *Bothropoides*, *Rhinocerophis*, *Bothriopsis* e *Bothrocophias*.

Esta classificação está fundamentada em um conjunto de dados morfológicos e multigênica mitocondrial (análise comparativa mitocondrial), que reconhece linhagens evolutivamente, ecologicamente e morfologicamente distintas como

gêneros. Além dos dados morfológicos e de multigênica mitocondrial, foi considerada a diversidade nutricional à que cada espécie é submetida, pois influência na composição da peçonha, levando à diversificação destes animais. O arranjo taxonômico pode ter um impacto importante na área médica, no qual a correta identificação da espécie responsável pelo acidente de uma determinada área é essencial para a produção e uso eficiente da soroterapia (GREENE et al., 1983; CHIPPAUX et al., 1991; RODRIGUES et al., 2012).

O gênero *Bothropoides* (derivado do grego sendo “*bothros*” e “*ops*” relacionados ao poço facial, e “*oides*” que significa semelhante) inclui as espécies: *Bothropoides alcatraz*, *Bothropoides diporus*, *Bothropoides erythromelas*, *Bothropoides insularis*, *Bothropoides jararaca*, *Bothropoides lutzi*, *Bothropoides mattogrossensis*, *Bothropoides neuwiedi*, *Bothropoides pubescens* e *B. pauloensis* (FENWICK et al., 2009).

No gênero *Bothrops* estão incluídas as espécies: *Bothrops atrox*, *Bothrops brazili*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops marajoensis*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops muriciensis* (Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2010).

Para o gênero *Rhinocerophis* ainda não se tem os motivos de sua criação, mas Sociedade Brasileira de Herpetologia estima que, no final do ano de 2012 ou começo de 2013, será publicado um artigo sobre as mudanças na classificação desse gênero. Atualmente o gênero compreende as seguintes espécies: *Rhinocerophis alternatus*, *Rhinocerophis cotiara*, *Rhinocerophis fonsecai* e *Rhinocerophis itapetiningae* (Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2010).

Devido a estes estudos, hoje no Brasil a classificação dos gêneros para cada família segundo a Sociedade Brasileira de Herpetologia (2010) é a seguinte: Viperidae: 7 gêneros (*Bothrops*, *Bothropoides*, *Rhinocerohpis*, *Bothriopsis*, *Bothrocohpias*, *Crotalus* e *Lachesis*); Elapidae: 2 gêneros (*Micrurus* e *Leptomicrurus*) e a Colubridae 60 gêneros (*Apostolepis*, *Atractus*, *Liophis*, *Xenodon* entre outras).

Como esta informação é recente, ainda não tem sido amplamente utilizada nas publicações da área. No entanto, consideramos importante relatar esta nova classificação, no presente trabalho, inclusive para se estabelecer uma maior familiaridade com a mesma.

No Brasil foram registrados, em 2010, 29.635 acidentes por serpentes, dentre

os quais, 85% foram ocasionados por serpentes peçonhentas; 4% por não peçonhentas e 11% por serpentes não identificadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Nos meses mais quentes e chuvosos (janeiro a maio) foi registrada a maior incidência de acidentes botrópicos, com 72,5%. As regiões Norte, Nordeste e Sudeste possuem maior incidência de casos, respectivamente 9.191; 8.238 e 6.343. Essas regiões concentram a maioria dos acidentes botrópicos e laquéticos, enquanto que no Nordeste há predomínio dos acidentes crotálicos e elapídicos. No total ocorreram 146 mortes por serpentes, sendo que 92 delas foram ocasionadas por jararacas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). O sexo mais acometido é o masculino, com 77% das notificações e a faixa etária é entre 20 e 49 anos (51,3%), ou seja, na idade produtiva. Mais de 80,3% dos acidentes ocorreram na zona rural. Mais de dois terços dos acidentes ofídicos ocorrem nos pés e pernas (19.964), indicando que o uso de botas e perneiras ajudaria na redução do número de acidentes.

Os acidentes ofídicos do ano de 2010 tiveram letalidade de 0,5%. A serpente com maior letalidade é a cascavel, com taxa de 1,1% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Em cerca de 90% dos acidentes a soroterapia foi instaurada, sendo que nos casos de acidentes botrópicos, crotálicos e laquéticos este número é superior a 90%. Esse índice cai para 77,7% nos acidentes elapídicos, possivelmente porque essas serpentes possuem presas proteróglifas, que dificultam a inoculação da peçonha (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

O envenenamento causado por serpentes é um problema médico-social de considerável magnitude. Em adição à mortalidade, os envenenamentos por serpentes são também importantes problemas de saúde em países tropicais em desenvolvimento como resultado de uma morbidade crônica a eles associada (por exemplo, amputações, deformações e falência renal) e também com a frequência com que ocorrem, acarretando significantes efeitos socioeconômicos (PINHO e PEREIRA, 2001; LIZANO et al., 2003). Os acidentes causados pelas serpentes bothrópicas não apresentam uma alta letalidade, porém devido à alta incidência, são considerados de grande importância epidemiológica no país (FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

A toxicidade da peçonha é devido à presença de enzimas e proteínas, causando distúrbios que afetam o sistema de coagulação sanguínea, induzem hemorragia, edema e necrose local. Isso ocorre porque as toxinas de peçonhas de serpentes possuem inúmeras propriedades bioquímicas, funcionais e estruturais, que atuam por diferentes mecanismos na paralisia, morte e digestão da presa, além de representar uma arma eficiente na defesa contra predadores e outros inimigos naturais (BARRAVIERA, 1994; PINHO e PEREIRA, 2001; MEBS et al., 2002; LIZANO et al., 2003).

1.2. O Gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops* é composto por serpentes de espécies como *Bothrops atrox*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops pirajai*, *Bothrops moojeni* entre outras (SBH, 2010).

É o gênero com a maior incidência de acidentes ofídicos. A peçonha botrópica pode induzir efeitos locais que incluem sintomas como dor, edema, hemorragia e necrose, e adicionalmente distúrbios sistêmicos como coagulopatias, hemorragia sistêmica e falência renal.

Cerca de 90% do peso seco da peçonha é constituído por proteínas compreendendo grande variedade de enzimas tais como: proteases (metaloproteases e serinoproteases), fosfolipases A2 e miotoxinas. O envenenamento é a somatória do efeito de diversos constituintes presentes na peçonha da serpente, cada um responsável por diferentes ações locais ou sistêmicas, como alterações hematológicas ou fisiopatológicas. Assim os efeitos provocados, tais como hemorragia, mionecrose, ausência de coagulação, entre outros, se deve a uma fração específica. As metaloproteases são responsáveis pela ação hemorrágica dos acidentes; as desintegrinas e proteases, pela ação proteolítica; as L-aminoácido oxidases promovem ação agregadora de plaquetas e as fosfolipases agem na promoção de edema, dor e necrose (BARRAVIERA, 1994; MEBS, 2002; CARDOSO et al., 2003).

1.2.1 *Bothrops jararacussu*

A serpente *Bothrops jararacussu*, também conhecida popularmente com jararacuçu, pode atingir até 2 m de comprimento e coloração dorsal variável entre cinza, rosa, amarela, marrom ou preta, com manchas triangulares marrom-escuras. É encontrada na Bolívia, Brasil (Bahia e Mato Grosso até o Rio Grande do Sul), Paraguai e Argentina (MILANI et al., 1997).

Bothrops é uma junção dos termos gregos bothros, "buraco" e ops, "face" ou "olho". É uma alusão à região sensível ao calor dessas cobras, que se localiza entre as narinas e os olhos. Na língua tupi, jararaca significa "o que tem bote venenoso" e *uçu* deriva de *gûasu*, "grande", portanto "jararacuçu" significa "a que tem um grande bote venenoso" (FERREIRA, 1986).

A peçonha desta serpente contém serinoproteases, metaloproteases e fosfolipases, sendo assim importante fonte de estudo desta classe de enzimas, recebendo especial atenção em virtude dos aspectos clínicos e epidemiológicos, ou seja, devido ao grande número de acidentes que provocam e à gravidade destes (GUTIÉRREZ, 2002).

VIDAL e STOPPANI (1971) isolaram duas fosfolipases desta peçonha. RODRIGUES-SIMIONI et al. (1983) investigaram os efeitos do veneno e de suas frações na junção neuromuscular. QUEIROZ et al. (1984) estudaram a necrose e regeneração muscular causadas pelo envenenamento e AMARAL et al. (1985) detectaram uma necrose cortical renal em indivíduos picados por *Bothrops jararacussu*.

Desta peçonha foram isoladas três proteases, sendo duas metaloproteases, a BjussuMP-I (MAZZI et al., 2004) e a BjussuMP-II (MARCUSSE et al., 2007); uma serinoprotease (SANT'ANA et al., 2008) e um α -inibidor de miotoxina denominado α BjussuMIP (OLIVEIRA et al., 2008), sendo que grande parte do peso seco bruto é constituído por fosfolipases e miotoxinas.

1.3 Fosfolipases

Dentre os constituintes das peçonhas de serpentes, as fosfolipases são comumente encontradas nas peçonhas da família Viperidae, sendo assim amplamente estudadas devido às suas características químicas e efeitos biológicos

(BARRAVIERA, 1994). As fosfolipases A₂ (PLA₂s E. C. 3.1.1.4) são enzimas de grande interesse médico-científico devido ao envolvimento em inúmeras patologias humanas inflamatórias e no envenenamento por peçonhas de serpentes e abelhas. A atividade das PLA₂s foi observada pela primeira vez em peçonha de cobra (*Naja naja*) e em extratos pancreáticos de mamíferos (SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004). São enzimas que suportam altas temperaturas sem perda de atividade, e podem ou não possuir isoformas, como exemplo a peçonha de *Vipera russeli*, com 7 isoformas de fosfolipases. Por outro lado, *Rhinocerothis alternatus*, e *Bothrops jararaca* não apresentam múltiplas isoformas, quando submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (BARRAVIERA, 1994).

As fosfolipases podem ser divididas em intracelular e extracelular. As fosfolipases intracelulares são aquelas presentes na transdução de sinal, metabolismo de fosfolipídios e nas mais variadas funções celulares. Fosfolipases extracelulares estão presentes no suco pancreático humano e nas peçonhas de serpentes e insetos, apresentando atividade esterásica, promovendo a catálise de fosfolipídeos e glicerofosfolipídeos e, como ação principal, a quebra do ácido araquidônico dando início à cascata de eicosanóides, responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios (ARNI; WARD, 1996). As fosfolipases, além da atividade catalítica, podem conter outras diversas funções como miotoxidade, cardiotoxidade, neurotoxicidade entre outras, (KINI; EVANS, 1987) e estão divididas em 4 tipos: fosfolipases A₁(PLA₁), fosfolipases A₂(PLA₂), fosfolipases B(PLB), fosfolipases C (PLC) e fosfolipases D (PLD) (**Figura 1**), divisão essa instituída de acordo com o local onde ocorre a ligação no sítio de clivagem (KINI, 1997).

X: álcool polar como colina, serina, etanolamina, mio-inositol, glicerol e fosfatidilglicerol

R₁ e R₂ : cadeias hidrocarbônicas de ácidos graxos

Figura 1: Sítio de ação das fosfolipases. Adaptado de Kini, 1997. (Fonte: OLIVEIRA, 2006).

As fosfolipases A₁ (PLA₁) são caracterizadas pela clivagem na posição *sn*-1 da cadeia fosfolipídica e podem ser encontradas nos mais diversos tecidos e organismos (AOKI et al., 2002). São empregadas em empresas farmacêuticas, devido a sua atividade emulsificante (SONG: RHEE, 2001).

As fosfolipases A₂ hidrolisam os glicerofosfolídeos de membrana pela catálise na posição *sn*-2. A partir dessa clivagem tem-se como subproduto, o ácido araquidônico, precursor de eicosanóides (presentes na inflamação). Além disso, há liberação não somente do ácido araquidônico, mas também de outros subprodutos como: ácido lisofosfatídico e lisofosfatidilcolina, que também são precursores de mediadores bioativos como o fator de ativação plaquetária (PAF) (KUDO, 2004).

As fosfolipases B são enzimas com capacidade de clivar as ligações *sn*-1 e *sn*-2, simultaneamente, demonstrando assim atividade fosfolipídica e lisofosfolipídica, desacilando completamente os seus substratos, além de possuir também atividade fosfolipase-transacilase em fungos (CHEN et al., 2000), sendo considerada fator de virulência para alguns patógenos (SHEN et al., 2004).

As fosfolipases C (PLC) são de importância relevante no metabolismo de fosfolípidos inositólicos, pois as PLC são fosfodiesterases de domínios múltiplos, que geram inositol 1,4,5-trifosfato (InsP₃, mensageiro mobilizador de cálcio) e diacilglicerol (DAG) ativador da quinase C (REBECCHI; PENTYALA, 2000). Por essas razões possuem ação importante na sinalização celular em mamíferos, agindo

em hormônios, neurotransmissores, fatores de crescimento e outros estímulos extracelulares (HARDEN; SONDEK, 2006).

As fosfolipases D (PLD) hidrolisam glicerofosfolipídios, produzindo aminoálcool e ácido fosfatídico, além de catalisarem reações de transfosfatidilação (ULBRICH-HOFMANN et al., 2005).

Dentre os grupos acima citados, as fosfolipases A_2 estão amplamente distribuídas na natureza e principalmente na peçonha das serpentes e apresentam elevado interesse médico científico, por estarem diretamente envolvidas em várias doenças inflamatórias humanas (VERHEIJ et al., 1981).

As PLA_2 s constituem uma superfamília subdividida em 15 subgrupos, de acordo com as seguintes características: a) sequência molecular; b) peso molecular; c) pontes dissulfeto; d) dependência ou não de cálcio; e) capacidade de hidrolisar ligações sn-2 de substratos fosfolipídicos, como atividade principal (porém não sendo a única); f) estrutura primária conhecida; g) grau 1 de identidade de sequência; h) havendo mais de um gene homólogo na espécie, deverá ser atribuído uma letra indicativa do subgrupo (ex.: Grupo GVII-A e GVII-B), e existindo variações de proteína geradas por processamento estas devem ser consideradas proteínas diferentes, mas pertencentes ao mesmo subgrupo, podendo receber o numeral diferenciador após confirmação de suas atividades (ex.: GVI A-1 e GVI A-2) (SIX; DENNIS, 2006; BURKE; DENNIS, 2009).

As fosfolipases A_2 pertencem aos grupos IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIII, XIV. As PLA_2 de peçonhas ofídicas são proteínas secretadas pertencentes aos grupos I e II. As fosfolipases A_2 do grupo I são encontradas em peçonhas da família *Elapidae* enquanto as do grupo II em peçonhas da família *Viperidae* (*Viperinae* e *Crotalinae*). Essas enzimas tem função digestiva sobre a presa e no envenenamento por acidente ofídico interferem nos processos fisiológicos, causando vários efeitos farmacológicos e fisiopatológicos, caracterizados por efeito neurotóxico, cardiotoxico, anticoagulante, antiplaquetário, hemolítico, inflamatório e mionecrótico (HARRIS, 1991).

A maioria das PLA_2 s das serpentes do gênero *Bothrops* já descritas são proteínas básicas, com ponto isoelétrico entre 7-10, apresentando ou não atividades catalítica, miotóxica, edematogênica e anticoagulante (GUTIÉRREZ;

LOMONTE, 1995; OWNBY et al., 1999; PONCE-SOTO et al., 2006; ABREU et al., 2007). Por outro lado, as PLA₂s ácidas presentes nas peçonhas de serpentes deste gênero foram pouco estudadas e pouco se sabe sobre o mecanismo de ação destas enzimas (SERRANO et al., 1999; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; FULY et al., 2002; ROBERTO et al., 2004; COGO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007).

A relação estrutura-função de diversas enzimas homólogas às PLA₂s de peçonhas de serpentes tem sido amplamente pesquisada, com o emprego de grande variedade de metodologias, na tentativa de elucidar o mecanismo de ação destas enzimas multifuncionais, como modificações químicas de resíduos de aminoácidos, mutagênese sítio dirigida (SÁ et al., 2004; CHIOATO; WARD, 2003; CHIOATO et al., 2007), técnicas espectrofotométricas, cristalográficas (MARCHI-SALVADOR et al., 2008; CORRÊA et al., 2008) e ressonância magnética nuclear (TORRES et al., 2003; AMININASAB et al., 2004), além de estudos de ligação com inibidores e substratos naturais e artificiais (OWNBY et al., 1999; LIZANO et al., 2003; DOS SANTOS et al., 2005; MARCHI-SALVADOR et al., 2006). Foi proposto que a capacidade de estas enzimas atingirem um órgão ou tecido específico está relacionada com a sua alta afinidade por proteínas específicas que agem como receptores (KINI, 2003).

A maioria destas PLA₂ com sua estrutura terciária já determinada possuem os resíduos His48 e Asp49 conservado (ARNI E WARD, 1996). A sequência (D₄₂XCCXXHD₄₉) representa o sítio catalítico e o sítio de ligação do cálcio (X₂₇CGXGG₃₂) presentes em todas as PLA₂ do grupo II, cataliticamente ativas (MURAKAMI E KUDO, 2002).

1.4 Miotoxinas e BthTX-I

As miotoxinas ocorrem naturalmente nas peçonhas de serpentes; são fosfolipases A₂ que apresentam His48 e uma substituição do resíduo Asp (ácido aspártico) da posição 49 por uma Lys (lisina) e alterações no sítio de ligação do cálcio (cofator essencial para catálise e estabilização da conformação catalítica). Esses elementos justificam sua baixa ou inexistente atividade catalítica, que as conferem o nome de fosfolipases miotóxicas ou miotoxinas.

Apesar de apresentarem atividade catalítica baixa ou inexistente, estas proteínas são responsáveis, por grande parte do efeito mionecrótico apresentado pelas peçonhas, responsável pela perda ou amputação do membro afetado (GUTIÉRREZ, LOMONTE, 1997).

Além da miotoxicidade, elas participam de efeitos farmacológicos/tóxicos tais como edema, anticoagulação, neurotoxicidade, hemólise indireta, citotoxicidade, além de atividade bactericida, antiviral e antiparasitária (TEIXEIRA et al., 2003).

Embora várias PLA₂s tenham tido sua sequência de aminoácidos já determinada, somente sete PLA₂ -Lys 49 miotóxicas do gênero *Bothrops* foram descritas: a miotoxina II (Basp II) de *Bothrops asper* (FRANCIS et al., 1991), a Bothropstoxina I (BthTX-I) de *Bothrops jararacussu* (CINTRA et al., 1993), as piratoxinas I e II de *Bothrops pirajai* (TOYAMA et al., 1998, 2000), a miotoxina II (BnSP-7) de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (SOARES et al., 2000a) e as miotoxinas I e II (MjTX-I e II) de *Bothrops moojeni* (SOARES et al., 2000b; STÁBELI et al., 2006). Dentre estas, a Bothropstoxina I (BthTX-I) é um exemplo de miotoxina básica que apresenta alta atividade miotóxica, com estrutura PLA₂. No entanto, não apresenta atividade fosfolipásica em lecitina de gema de ovo (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988). A BthTX-I é uma proteína de cadeia única, PM 13.700, contendo 7 pontes dissulfeto com 121 resíduos de aminoácidos e pI 8,2, isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*, com ação sobre o músculo gastrocnêmio e citotoxicidade em células musculares murinas (C2C12) (CHIOATO et al., 2007). As miotoxinas são componentes das peçonhas das serpentes, com especificidade por células musculares causando extensa lesão ao músculo esquelético (mionecrose) (MONTECUCCO et al., 2008).

A BthTX-I foi isolada da peçonha de *B. jararacussu* por Homsi- Brandeburgo (1988), através da associação de processos cromatográficos, Sephadex G-75 e troca iônica SP-Sephadex C-25. Em 1993 e 1998 foi determinada a sequência de aminoácidos (CINTRA et al., 1993) e a elucidação tridimensional através de cristalografia e difração de Raio-X (da SILVA GIOTTO et al., 1998).

Na última década novos estudos foram realizados com a BthTX-I cabendo ressaltar: Cavalcante e colaboradores em 2005 que descreveram a atividade da BthTX-I, sob diferentes temperaturas; Ferreira e Ward em 2009, sugeriram que a

interação com a membrana celular se dá por um triptofano na superfície da membrana na qual a toxina se liga; de Oliveira e colaboradores (2009) demonstraram que em pH inferior a 5, a toxina perde sua conformação natural resultando em perda de atividade; Rostelato-Ferreira e colaboradores (2010), mostraram a ação inibitória da heparina frente à ação mionecrosante da BthTX-I; Balduino e colaboradores (2011), estudaram a clonagem e expressão da BthTX-I em *E. coli*

A análise da literatura demonstra que a BthTX-I é amplamente estudada em termos de estrutura e atividade biológica como mostram os artigos descritos. No entanto tem sido pouco explorada quanto ao seu potencial antitumoral (ver item 1.7)

1.5 Ciclo celular

O ciclo celular é um processo regulado por sinais positivos (CDK's) e negativos (CKI's), que atuam na cinética do ciclo de modo a permitir progressão ou atraso.

As CDK's (quinases dependentes de ciclina) são proteínas serino/treonina quinases que são ativadas em pontos específicos do ciclo celular. Uma CDK somente é ativa, quando a mesma forma um complexo CDK-ciclina, (A, B, D1, D2, D3, E e H). O complexo CDK-ciclina é necessário para a promoção da fase seguinte do ciclo (sinais positivos), no qual sua inativação previne a mitose. As CKI's (inibidores de quinases dependentes de ciclina) inibem a ligação da CDK com a ciclina, inativando a CDK. As CKI's são divididas em duas famílias INK4 e Cip/Kip. Na família INK4 são observados os genes *p15*, *p16*, *p18* e *p19*, já na família Cip/Kip estão presentes *p21*, *p27* e *p57* (SCHAFFER, 1998; VERMEULEN et al., 2003).

As fases G0, G1, S e G2 são responsáveis por adaptar a célula à mitose. O ciclo celular é um processo no qual a célula reúne proteínas, RNA e DNA sendo que do ponto de vista microscópico, é apenas um crescimento celular. Porém é sabido tratar-se de um mecanismo extremamente organizado (SCHAFFER, 1998; DOUGLAS; HADDAD, 2003; VERMEULEN et al., 2003).

Cada fase é responsável por promover quantidades suficientes de proteínas (G2), DNA (S) e RNA (G1), para a célula, de modo que uma célula possa ser dividida em duas células semelhantes.

As células começam a percorrer os ciclos uma vez que sai de G0, fase essa onde as células estão quiescentes, ou seja, mantem-se sem atividade, isso acontece com os linfócitos, que são células mononucleares sanguíneas, que só entram em G1 após sofrerem estímulos por antígenos. As células são iniciadas ao ciclo uma vez que recebem estímulos para crescimento celular, os quais as encaminham para a fase G1, caso o estímulo seja interrompido a célula volta à G0 (SCHAFFER, 1998).

Em G1 ocorre a presença de sinais positivos (CDK's) e negativos (CKI's). Nesta fase temos presentes as ciclinas D1, D2 e D3 além de CDK4 e CDK6 (SHERR; 1994). Em G1 a célula recebe estímulos para crescimento celular e ocorre a produção de RNA para síntese do DNA e a fosforilação do complexo pRb/E2F. Este complexo pRb (proteína de retinoblastoma) desempenha o papel de fator de crescimento e o E2F (fator de transcrição), atua na ativação ou repressão de genes responsáveis por processos celulares como proliferação, diferenciação e apoptose (WU et al., 2009). A pRb torna-se fosforilada e isto leva a ruptura do complexo com a proteína desacetilase histona (HDAC) e liberação dos fatores de transcrição E2F-1, que regulam positivamente a transcrição de genes cujos produtos são necessários para a progressão à fase S (BUCHKOVICH *et al.* 1989; KATO *et al.*, 1993; BREHM *et al.*, 1998).

Na fase G1 atuam as CDK's, CKI's (inibidores de quinases dependentes de ciclina) e CHK (proteínas "*checkpoint*"), sendo as duas últimas responsáveis pela inibição da progressão do ciclo. As proteínas denominadas "*checkpoint*" (CHK) são responsáveis por avaliar a integridade do DNA antes da sua replicação, onde geram sinais "*delay*" por meio de um gene chamado *ataxia-telangiectasia mutated* (ATM). Quando ATM é ativada, há mobilização de CHK-2 que promove a fosforilação de p53 e Cdc25A, sendo que, uma vez que Cdc-25A é fosforilado, esta se torna incapaz de ativar CDK2/E (quinase responsável pela transição de G1/S), pois sofre ubiquitinação e se degrada, promovendo a suspensão do ciclo (MICHALIDIS et al., 2001). A p53 atua recrutando p21, uma CKI que inibe os complexos CDK, assim, ele

inibe a ligação da ciclina com sua subunidade e leva ao atraso ou suspensão do ciclo (**Figura 2**) (VERMEULEN et al., 2003).

Figura 2: Esquema de suspensão do ciclo celular na fase G1. A lesão do DNA ativa ATM que age em p53, que recruta o inibidor de ciclinas *p21* e inibe diretamente CDK2. ATM atua mobilizando CHK2, que por sua vez inibe a proteína Cdc25A assim, CDK2 não é ativado e causa o atraso na fase G1 (Adaptado de MICHALIDES et al., 2001).

Assim o DNA pode ser reparado e o ciclo celular pode prosseguir, tendo-se assim, atraso na fase G1 antes da síntese de um novo DNA. Caso este esteja íntegro, sem nenhum dano, a CDK2 guiará o ciclo até a próxima fase, do contrário ocorrerá a suspensão do ciclo até que o DNA lesado seja reparado ou encaminhado à apoptose.

Na fase S e G2 o atraso do ciclo celular é regulado por ATR (ataxia-telangiectasia-related protein) que ativa as CKI's, nessas fases (DOUGLAS; HADDAD, 2003).

Uma vez que a célula passa pelo ponto de restrição e seu ciclo é suspenso, os mecanismos de reparo ao DNA são iniciados. A lesão ao DNA pode ser provocada por diversos fatores como: luz UV, radiação ionizante, ROS (espécie reativa e oxigênio), agentes químicos e outros (BRANZEI; FOIANI, 2008).

Depois de realizado os reparos, as células passam para a fase S pela ação da CDK2/E. Na fase S ocorre a replicação do DNA (por isso o reparo é efetuado anteriormente). A CDK/A tem função importante para a replicação do DNA, fosforilando proteínas específicas envolvidas nas origens de replicação do DNA. Na fase S são observadas várias origens de replicação. Estas são igualmente

importantes nesta fase, em vista dos pontos de metilação, pois enviam sinais que determinada sequência da molécula já foi replicada, impedindo excesso de material duplicado. Outro componente é o complexo mitótico ciclina B-cdc2 ou fator promotor da mitose (MPF) que permanece inativo durante toda a fase S e protege a célula de uma divisão antes que ela esteja totalmente pronta para isto (DOUGLAS; HADDAD, 2003).

A lesão gerada ao DNA em S ou vinda da fase G1 deve ser reparada, pois é a última linha de defesa frente ao DNA lesado e, caso o mesmo não seja reparado, a célula prossegue para mitose e dará início a produção de células alteradas, podendo surgir, assim, células tumorais por recombinação homóloga ou incompatibilidade de reparo (MMR = *mismatch repair*).

A fase G2/M é basicamente a síntese de RNA e proteínas que serão usadas para a mitose. Há condensação da cromatina e a ativação do MPF (fator de promoção de maturação), composto por CDK1 e ciclina-B (auxiliando a indução da mitose). O processo de entrada e saída da mitose é regulado pelo acúmulo e ativação de CDK1/B e CDK2/A, onde CDK1/B é necessária ao avanço para mitose e CDK2/A parece estar envolvida com a prófase. O atraso em G2/M não requer o uso do gene *p53*, diferentemente de G1, em vez disso, o atraso se dá pelo acúmulo de proteínas mitóticas. O checkpoint parece atuar prevenindo que Cdc25C ative a CDK1/B, ocorrendo a permanência de Cdc25 em uma forma fosforilada, impedindo seu acúmulo no núcleo e a ativação de CDK1 (**Figura 3**) (DOUGLAS; HADDAD, 2003; SCHAFER, 1998).

Figura 3: Esquema de suspensão do ciclo celular na fase G2. A lesão do DNA ativa ATR (*ataxiatangiectasia-related protein*), que age em CHK1/B inibindo Cdc25C levando a inibição da atividade de CDK1, resultando atraso em G2. (Adaptado de MICHALIDES et al., 2001).

Quando as proteínas checkpoints não atuam e/ou o reparo do DNA não é realizado as células sofrem processo de morte celular podendo ser morte celular por apoptose ou necrose.

1.6 Morte celular

A morte celular é a resposta a uma lesão celular, a qual chega a um ponto em que os danos causados são irreversíveis. Os tipos de morte celular são classificados em 3 tipos: apoptose, necrose e autofágica de acordo com o NNCD (*The Nomenclature Committee on Cell Death*), (KROEMER et al., 2009).

O processo apoptótico se caracteriza pela condensação da cromatina, fragmentação do DNA, perda de volume celular, formação de corpos apoptóticos, que serão fagocitados por macrófagos, na qual o processo inflamatório não se manifesta (LEWIN, 2001; YAKOVLEV; FADEN, 2004; ELMORE, 2007).

A necrose é caracterizada pelo extravasamento do material intracelular. São observados danos às organelas, ruptura dos lisossomos e resposta inflamatória local oriunda de citocinas, resultantes de uma exposição exacerbada ao agente tóxico (YAKOVLEV; FADEN, 2004).

A anóxia ainda não foi classificada com um tipo de morte celular segundo a NNCD devido à necessidade de uma melhor elucidação do processo, mas é aceita ser “descrita” como sendo um tipo de morte celular, devido à quantidade de citações. Consiste na lesão mitocondrial decorrente da hipóxia (falta de oxigênio), ou como resultado do aumento do Ca^{2+} no citosol, pelo estresse oxidativo, ou pela degradação dos fosfolípidos. Resulta na formação de poro de transição de permeabilidade mitocondrial, que permite a saída de prótons e dissipa o potencial eletromotivo, o qual permite a fosforilação oxidativa. O dano causado ao nível mitocondrial também permite o extravasamento do citocromo c, que aciona a apoptose (SHROFF et al., 2007; KROEMER, 2009).

Autofagia ocorre geralmente em momentos de privação de nutrientes, na qual a célula degrada os próprios componentes celulares através do mecanismo lisossômico de modo a gerar energia à célula. São observados vacúolos, sugerindo presença de membranas celulares nessa estrutura (KLIOSKY; EMR, 2000).

1.6.1 Apoptose

O termo apoptose foi proposto por Kerr, Wyllie e Currie (1992) para descrever a via de morte programada das células. Ocorre, normalmente, durante o desenvolvimento, envelhecimento e manutenção dos tecidos e da população das células.

O processo de apoptose é disparado frente a lesões do DNA causadas por agentes físicos, químicos, biológicos e outros. Ao entrar em apoptose podemos observar características muito marcantes do processo de morte programada como: redução do tamanho da célula (retração da célula), citoplasma denso, organelas fortemente compactadas, condensação da cromatina, formação de *blebs* (prolongamentos da membrana celular), aumento de número e tamanho dos *blebs* que se rompem formando assim os corpos apoptóticos que serão fagocitados por macrófagos sem causar inflamação (Figura 4) (GRIVICICH et al., 2007; ELMORE, 2007; McHUGH; TURINA, 2006).

O processo de apoptose pode ocorrer principalmente por 2 vias principais: via intrínseca (mitocondrial) e extrínseca (receptores de morte),(Figura 4), (McHUGH;TURINA, 2006; ELMORE, 2007).

A via intrínseca pode ser desencadeada por estímulos (positivos ou negativos) intracelulares que agem diretamente em alvos dentro da célula e iniciam eventos mitocondriais, (Figura 4), (ELMORE, 2007).

Estímulos negativos são caracterizados pela ausência de fatores de crescimento, hormônios e citocinas, levando a falha de supressão de morte programada e ativação de apoptose. Por outro lado, os estímulos positivos incluem (mas não se limitam a esses): radiação, toxinas, hipóxia, hipertermia, infecções virais e radicais livres (ELMORE, 2007).

Qualquer estímulo (positivo ou negativo) causará mudanças na membrana mitocondrial, ocasionando a perda do potencial de membrana, posterior aumento da permeabilidade e a liberação de dois grupos de proteínas pró-apoptóticas (ELMORE, 2007).

O primeiro grupo compreende: citocromo c, Smac/DIABLO e HtrA2/Omi que ativam a via mitocondrial caspase-dependente. O citocromo c liga-se a Apaf-1 e este complexo liga-se à pró-caspase 9 originando o apoptossomo. Por sua vez, leva a

ativação da caspase 9 (iniciadora) e consequente ativação de caspase-3, 6 ou 7 (efetoras) (ELMORE, 2007).

O segundo grupo de proteínas pró-apoptóticas incluem AIF (fator indutor de apoptose), a endonuclease G e CAD (DNase Caspase-Ativado), porém são liberados tardiamente, após desencadeamento da apoptose. A proteína AIF promove a fragmentação do DNA (50-300 kb) além da condensação da cromatina nuclear periférica, considerada como estágio I da condensação. A endonuclease G cliva a cromatina nuclear e produz DNA oligossomal fragmentado, de modo que ambos AIF e endonuclease G tenham função caspase-independente (ELMORE, 2007). CAD é liberado depois de endonuclease G e AIF e também promove a fragmentação do DNA oligossomal e condensação de cromatina (estágio II) (ELMORE, 2007).

O processo apoptótico é controlado por proteínas da família Bcl-2, sendo reguladas por *p53* (proteína supressora tumoral), que regula a expressão de outras proteínas da família Bcl-2 (anti ou pró-apoptóticas). Dentre as proteínas antiapoptóticas podem ser citadas: Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xl, Bcl-xs, Bcl-w, BAG e pró-apoptóticos: Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik e Blk. Essas proteínas têm a função de promover ou abortar o processo de apoptose e possuem ainda, função de regular a liberação de citocromo *c* (ELMORE, 2007).

A via extrínseca tem o envolvimento de receptores transmembrânicos que medeiam a interação. Os receptores são da família TNF, membros dessa família compartilham domínios extracelulares ricos em cisteínas e no citoplasma possuem o “domínio de morte” (DD, death domain), que leva os sinais da superfície da membrana para a via de sinalização intracelular (Figura 4), (ELMORE, 2007).

Dentre os aceptores e receptores que participam da via extrínseca podemos citar: FASL/FASR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 e Apo2L/DR5 onde a sequência de eventos que difundem a fase extrínseca são FASL/FASR e TNF- α /TNFR1 (ELMORE, 2007).

Figura 4 - Vias da apoptose: Via extrínseca (lado esquerdo): FasL se liga a FasR (“domínio da morte”) formando FADD. FADD se associa à pró-caspase 8, que ativa caspase 8 e essa ativa caspase 3, 6 e 7, efetoras de apoptose. **Via intrínseca** (lado direito), o dano ao DNA ativa *p53*, mobilizando BAX e liberando citocromo c que se liga à Apaf 1, que por sua vez irão se complexar com pró-caspase 9 formando o apoptossomo, ao passo que Smac/DIABLO inibe as IAP’s. Pró-caspase 9 é ativada em caspase 9, que por sua vez ativa as caspases efetoras 3, 6 e 7. (Fonte ASHKENAZI, 2002).

Eventos que recrutam proteínas adaptadoras do citoplasma exibindo o domínio de morte irão se complexar com receptores FASL/FASR que resultam no adaptador FADD e TNF- α /TNFR1 na proteína TRADD, recrutando FADD e Rip. Assim, FADD associa-se a pró-caspase 8, o complexo DISC (*death inducing signaling complex*, complexo sinalizador e indução de morte) é formado e leva à ativação de caspase 8. Uma vez ativada a caspase 8, é iniciado o processo de apoptose. (ELMORE, 2007).

1.6.2 Necrose

Necrose é o processo de morte celular que induz inflamação local e é proposta como uma forma de morte celular (KERR et al., 1971).

O processo necrótico difere-se da apoptose, pois este resulta em processo de morte imediata sem que a célula possa se rearranjar para ser fagocitada. A necrose ocorre quando há falha na homeostasia celular depois que a célula sofre danos (SCHULTZ; HARRINGTON, 2003). Uma célula em necrose tem aumento de tamanho, o que causa fragilidade da membrana e aumento da permeabilidade causando o seu rompimento, liberando o conteúdo celular, gerando a inflamação local (Figura 5) (SCHULTZ; HARRINGTON, 2003).

É uma possível via caspase-independente que pode ser distinta ou inter-relacionada com a via apoptótica. O processo de morte por necrose ocorre devido a quatro lesões celulares: depleção de adenosina trifosfato (ATP) (hipóxia, isquemia ou inibição da respiração aeróbia), radicais livres (espécies de oxigênio reduzido), dano a membrana (defeitos na permeabilidade) e influxo de cálcio (homeostasia de cálcio). Qualquer um desses fatores resulta no vazamento do conteúdo celular, leva a inflamação e culmina em desintegração da célula além de produzir fragmentação do DNA em pares de base randômicos (SCHULTZ; HARRINGTON, 2003). A tabela 1 apresenta a comparação entre as principais características morfológicas entre células em apoptose e necrose:

Tabela 1: Diferenças morfológicas entre células em apoptose e necrose

Morfologia apoptose	Morfologia necrose
Retração da célula	Aumento celular
Conteúdo celular íntegro	Vazamento do conteúdo celular
Liberação de citocromo c pela mitocôndria	Destruição das organelas
Fragmentação do DNA em pares de base múltiplos de 180	Fragmentação do DNA em pares de bases aleatórios
Formação de corpos apoptóticos para fagocitose	Formação de detritos, porém nem todos são fagocitados.
Processo não inflamatório	Processo inflamatório

Fonte: Adaptada de McHUGH; TURMINA,(2006)

Figura 5: Diferenças morfológicas entre morte por apoptose e por necrose. Lado esquerdo: necrose celular com aumento da célula, rompimento da membrana e extravasamento do conteúdo celular. Lado direito: apoptose da célula; retração da célula, formação de corpos apoptóticos e fagocitose. (Fonte: retirado do site http://minutosaber.blogspot.com/2010_08_01_archive.html, data 06/04/2011).

1.7 Ações de peçonhas/toxinas sobre linhagens celulares

Danos celulares induzidos por muitos compostos, presentes nas peçonhas das serpentes, cujo mecanismo de ação ainda é desconhecido, torna-se alvo para o estudo desses componentes e seu modo de ação, resultando no isolamento e na caracterização de diversas toxinas.

Além da ação miotóxica, atividades citotóxicas das frações miotóxicas do gênero *Bothrops* têm sido estudadas, pois apresentam ação sobre linhagens celulares como células musculares murinas (C2C12) (NÚÑES et al., 2001; VILLA LOBOS et al., 2007; HAMZA et al., 2010) e ação direta sobre fibras do

músculo gastrocnêmico de camundongos (STABÉLI et al., 2006; CINTRA-FRANCISCHINELLI et al., 2010). Alguns autores realizaram experimentos sobre células imaturas da série branca como: mieloblastos (BONFIM et al., 2009) e linfoblastos (MORA et al., 2005). As miotoxinas apresentam preferência por células musculares diversas e podem ter ação citotóxica para outras linhagens não musculares, apresentando atividade citotóxica com ação sobre o DNA e/ou ciclo celular, causando assim, mutações perceptíveis a receptores que levarão ao reparo do DNA ou a indução de morte celular (apoptose/necrose).

A MjTX-II, uma miotoxina isolada de *Bothrops moojeni*, apresenta atividade citotóxica acentuada para linhagens Jurkat e EAT (tumor ascítico de Elrich) e menos acentuada para a linhagem tumoral SK-BR-3 (STÁBELI et al., 2006).

Outras frações do gênero botrópico apresentaram características citotóxicas, moduladoras da regulação do ciclo celular e potencial apoptótico e necrótico como a L-amino ácido oxidase de *Bothrops atrox* (BatroxLAO), com atividade antitumoral em células HL-60, PC-12, Jurkat e B16F10, mostrando potencial apoptótico e supressor de ciclo em linhagem HL-60 (ALVES et al., 2008; ALVES PAIVA et al., 2011).

Outras toxinas de gêneros e espécies diferentes também mostraram sua atividade supressora de ciclo celular como demonstrado pela CTX-III (cardiotoxona 3) de *Naja naja atra* com ação supressora da fase G2/M em linhagem K562 (YAN et al., 2007). Já a toxina NC-CT1(cardiotoxina-citotóxica) derivada de *Naja kaouthia*, exibe atividade supressora de ciclo em fase sub-G1 e ação citotóxica em linhagens K562 e U937 (DEBNATH et al., 2010). CTX-III (citotoxina-3) de *Naja naja atra* exibiu atividade citotóxica em linhagens HepG2 e supressão de ciclo na fase S (CHEN et al., 2009). A dtCT-I isolada de *Daboia russelli russelli* possui atividade citotóxica, supressora de ciclo na fase G1 e atividade PI⁺/AV⁺, em linhagens U937 e K562 (GOMES et al., 2007).

Alguns estudos mostram apenas a citotoxicidade de outras espécies de serpentes e frações isoladas como a CTX3 (cardiotoxina 3) e CTX4 (cardiotoxina 4) isoladas de *Naja naja atra* com ação sobre linhagem SK-N-SH (neuroblastoma humano) (CHEN et al., 2008) e a CrTX (crotoxina) isolada da serpente *Caudisona durissa terrificus*, que possui ação citotóxica frente a linhagem K562 (leucemia

mielóide crônica) (YAN et al., 2007). Outros estudos descrevem que a toxina LAAO de *Agkistrodon acutus* promove a morte de linhagem A549 por apoptose (ZHANG; CUI, 2007), a LAAO de *Ophiophagus hannah* também mostra ação citotóxica em linhagens tumorais SNU-1 (AHN et al., 1997) e a toxina Jararagina, uma metaloprotease isolada da serpente *Bothropoides jararaca*, apresenta atividade inibitória de adesão em células Skmel-28 (CORRÊA et al., 2002).

ANDRIÃO-ESCARSO et al. (2000) avaliaram a atividade citotóxica da BthTX-I (Lys49) e BthTX-II (Asp49) de *B. jararacussu* sob linhagem celular C2C12 (miotubos de camundongo) após modificações químicas dos resíduos de His, Tyr e Trp demonstrando que as alterações nos resíduos de His e Trp contribuem relevantemente para a redução em 85% e 58% respectivamente, sendo que modificações no resíduo de Tyr não contribuiu para o efeito citotóxico.

Dois mecanismos foram propostos para explicar a citotoxicidade apresentada pelas miotoxinas Lys49: 1. *Hidrólise de ácido graxos dependente da ativação da miotoxina*; 2. *Ativação de uma lipase intracelular desencadeada pela ligação da miotoxina a um receptor* (OWNBY et al., 1999; FLETCHER et al., 1998).

GEBRIM et al. (2009) avaliaram a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* da BthTX-I nativa e modificada com BPB (brometo de p-bromofenacil) em linhagens celulares Jurkat, SKBR3, B16F10 e S180. A proteína nativa apresentou de 75% a 90% de citotoxicidade em diferentes linhagens tumorais enquanto que a BthTX-I modificada com BPB apresentou de 10% a 40%. Ensaios *in vivo* com a toxina modificada 5 dias após transplantação das células tumorais de S180 em camundongos, reduziu em 30% o tamanho do tumor, em 14 dias e 76% em 60 dias, quando comparado com o grupo não tratado, concluindo assim que esta atividade antitumoral, pode ser de interesse no desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra o câncer.

Devido a grande diversidade da citotoxicidade das toxinas de serpentes, torna-se interessante o estudo em linhagens celulares diversas, tanto para células tumorais leucêmicas, tumores sólidos e células do sangue periférico ou células imaturas normais, com o intuito de encontrar toxinas com potencial antitumoral e biotecnológico, mais seletivos e eficazes.

1.8 Citocinas e envenenamento

O envenenamento por serpentes leva ao quadro de inflamação aguda. Este processo inflamatório envolve uma variedade de fatores no recrutamento de leucócitos, gerados através de fatores de quimiotaxia e de moléculas de adesão celular. Dentre esses fatores, podemos destacar as citocinas como fatores inerentes da inflamação (FEGHALI; WRIGHT, 1997).

Citocinas são substâncias sinalizadoras produzidas por diferentes tipos celulares que atuam em receptores específicos. Elas regulam a comunicação intercelular e possuem diferentes células alvo e diferentes ações. Compreendem as quimiocinas, interleucinas (IL), interferon, fatores de estimulação de colônia (CSF), citotoxinas e fatores de crescimento (ROITT & DELVES, 2001; ABBAS & LICHTMAN, 2004).

Analisar o perfil de liberação de citocinas é importante para o conhecimento da modulação da resposta inflamatória no sentido de minimizar os danos do envenenamento.

Estudos mostram que as principais citocinas avaliadas no envenenamento do gênero bothrópico são: IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α (CARNEIRO et al., 2002; LOPES et al., 2009; NUNES et al., 2004). A IL-1 é produzida principalmente por fagócitos mononucleares ativados cuja principal função é mediar a resposta inflamatória do hospedeiro na imunidade inata. Tem função principal de aumentar a produção de defensinas pelo epitélio, são capazes de ativar LT (fator de ativação dos linfócitos), além de aumentar a hematopoiese estimulando a secreção de IL-3. A IL-6 é secretada por muitos tipos de células, incluindo fagócitos mononucleares, células endoteliais e fibroblastos, que funcionam tanto na imunidade inata como na adaptativa. IL-6 estimula a síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos e o crescimento de linfócitos B produtores de anticorpos. Sua principal função é aumentar a produção de neutrófilos pela medula óssea. A interleucina 10 é um inibidor de macrófagos ativados, o que lhe cabe um importante papel no controle homeostático das reações de imunidade inata e de imunidade celular. Tem a função de inibir a produção de IL-12 e TNF pelos macrófagos ativados, inibir a expressão de co-estimuladores e estimular a proliferação de células B humanas em cultura

(ABBAS & LICHTMAN, 2004; ROITT & DELVES, 2001; ZULIANI et al., 2005; CARNEIRO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2011).

Dentre as citocinas, as quimiocinas formam o maior grupo. São liberadas a partir de vários tipos de células, incluindo monócitos, fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos, em resposta a um estímulo inflamatório de forma constitutiva ou induzida (BAGGIOLINI, 2001). Consistem em um grande número de pequenas proteínas (8-10 kDa), secretadas com a capacidade de atuar como um recrutador de leucócitos. As quimiocinas são mediadores importantes da inflamação e são capazes de aumentar a migração seletivamente de tipos específicos de leucócitos, a partir de vasos sanguíneos no tecido danificado e / ou infectados, onde os leucócitos irão efetuar a eliminação do agente infeccioso (BHATTACHARYYA et al., 2010 a).

A interleucina 8 (IL-8), também conhecida como, fator de ativação de neutrófilos ou de proteína derivada de fatores quimiotáticos de neutrófilos e de células T, pertence ao grupo das quimiocinas. Foi inicialmente isolada como fator quimiotático de neutrófilos por Yoshimura et al. (1987) e é uma quimioquina CXC, que desempenha um papel importante na quimiotaxia e ativação de neutrófilos. CXCL-8 é produzida por uma variedade de células, incluindo os leucócitos, células endoteliais e fibroblastos. É uma proteína dimérica composta por duas subunidades idênticas, cada uma com massa molecular de 8 kDa. A CXCL-8 tem sido especialmente estudada devido à sua eficácia no sentido de facilitar a migração de neutrófilos para locais inflamatórios (BHATTACHARYYA et al., 2010 b). Uma gama de ensaios *in vitro* e *in vivo* mostrou que, a IL-8 possui duas atividades principais. A primeira é a capacidade seletiva para atrair os neutrófilos, basófilos e células T, mas não monócitos. A segunda envolve a ativação de neutrófilos. A IL-8 pertence a uma superfamília de proteínas envolvidas na quimiotaxia, na mediação do crescimento celular, e na resposta inflamatória (HORUK, 1994; STRIETER et al., 1996; MUKAIDA et al., 1998).

O fator de necrose tumoral (TNF) foi originalmente descrito como uma molécula com propriedades antitumorais liberados por macrófagos estimulados com produtos bacterianos e vários estudos demonstraram o seu papel como uma citocina pró-inflamatória. É uma citocina pró-inflamatória potente, com papéis importantes na imunidade, inflamação, diferenciação e apoptose (BAUD; KARIN, 2001). O TNF- α é

envolvido na patogênese de doenças inflamatórias, tais como doença de Crohn, colite ulcerativa e artrite reumatóide (PODOLSKY, 2002; BEHM; BICKSTON, 2008). O TNF- α exerce os seus efeitos através de dois receptores distintos, TNFR1 e TNFR2 e diferenças na eficácia terapêutica e em efeitos celulares pode ser atribuível, em parte, à heterogeneidade das respostas a estes receptores (KOLLIAS; KONTOYIANNIS, 2001, McFARLANE et al., 2002). A ligação do TNF- α com o receptor induz ao recrutamento de várias proteínas de sinalização para os domínios citoplasmáticos. A variação no recrutamento de proteínas específicas para os receptores afeta a resposta celular ao TNF- α , levando ao aumento de NF- κ B e inflamação ou ativação da caspase-8 e apoptose (MOHAMED et al., 2002; KARIN; GALLAGHER, 2009). A superfamília de receptores de TNF contém uma subfamília de receptores de morte (DR), incluindo TNFR1, TNFR2, Fas (CD95 / APO-1), DR3, DR4, DR5, e DR6, cada qual com um longo domínio de morte de 80 aminoácidos (DR), necessário para a apoptose (WEINLICH et al., 2010). Os domínios de morte nos receptores de TNF são compostos de seis α -Hélices, podem formar oligômeros, auto associações, combinações com as proteínas das caspases, domínios efetores de morte ou outras interações. TRADD (TNFR1 proteína associada ao domínio de morte) é recrutado para TNFR1 e pode servir como uma plataforma para recrutar outros mediadores, incluindo FADD (FASL associado proteína domínio de morte), levando ao processo de morte celular programada (apoptose) (WEBER; VINCENZ, 2001).

Estudos têm sido realizados com o intuito de entender a correlação entre a atividade das PLA₂ e sua expressão durante a inflamação (MURAKAMI et al., 1997). Inicialmente foi encontrado que o aumento de quantidades de prostaglandinas, leucotrienos e lisofosfolídeos também chamados de citocinas inflamatórias, pode levar ao desenvolvimento e progressão de doenças inflamatórias e, em muitos casos, ao desenvolvimento de câncer (DENNIS, 2000; CORDA et al., 2002).

Certo número de PLA₂s de peçonhas de serpentes induzem edema (VISHWANATH et al., 1987; LOMONTE et al., 1993; LLORET; MORENO, 1993) e promovem a infiltração de células inflamatórias (ZHANG; GOPALAKRISHNAKONE, 1999; DE CASTRO et al., 2000), embora estudos exaustivos sobre as ações de PLA₂s de peçonhas de serpentes sobre os vários eventos da inflamação são

escassos. Assim, as miotoxinas PLA₂s homólogas, exercem as suas atividades de forma independente da degradação enzimática de fosfolípídeo (LOMONTE et al., 1994; LANDUCCI et al. (1998) avaliaram a atividade de indução de edema (*in vivo*) e degranulação de mastócito (*in vitro*) da BthTX-I (miotoxina Lys 49) e BthTX-II (PLA₂ Asp49) demonstrando que ambas induzem edema e degranulação de mastócitos e que estes efeitos são inibidos quando as toxinas são tratadas com heparina e apresentam pouco efeito quando são tratadas com Brometo p-bromofenacil (BPB), indicando que ambas atividades dependem de um mecanismo mediado por cargas catiônicas e não da atividade catalítica destas moléculas.

CASTRO et al. (2000) estudaram a atividade de recrutamento de células da cavidade pleural de ratos causados por estas toxinas demonstrando que ambas induzem a migração de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares) e quando tratadas com o inibidor de PLA₂ (BPB) não alterou o efeito sob a contagem total ou diferencial de leucócitos induzidos por estas toxinas.

Os mastócitos são residentes nos tecidos ao longo do corpo e apresentam um papel importante na patogênese de varias doenças inflamatórias uma vez que eles produzem mediadores associados a grânulos, substâncias derivados de lipídeos, citocinas e quimiocinas (METCALFE et al.,1997) e são ativados por esta miotoxina (LANDUCCI et al., 1998, 2000).

No presente projeto foram avaliadas as alterações das citocinas inflamatórias IL-8 e TNF- α em linhagens celulares HL-60 e HepG2, quando submetidas ao tratamento com a miotoxina BthTX-I, visando avaliar os níveis dessas citocinas e uma melhor compreensão dessa toxina frente ao processo de quimiotaxia e morte celular.

Objetivos

2.1 Objetivo geral

O presente projeto teve por objetivo avaliar as vias de sinalização de danos celulares e indução de citocinas inflamatórias, *in vivo*, na presença da toxina BthTX-I, isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Isolar a toxina BthTX-I, segundo Cintra et al. (1993).

2.2.2 Avaliar a citotoxicidade da toxina BthTX-I nas linhagens HL-60, HepG2, PC-12 e B16F10 pelo método espectrofotométrico de MTT;

2.2.3 Avaliar a cinética do ciclo celular nas linhagens HL-60, HepG2, PC-12 e B16F10 por citometria de fluxo;

2.2.4 Avaliar o potencial apoptótico e/ou necrótico da BthTX-I sobre as linhagens HL-60, HepG2, PC-12 e B16F10, por citometria de fluxo e fragmentação de DNA em gel de agarose;

2.2.5 Determinar os níveis de citocinas inflamatórias IL-8 e TNF- α em células HL-60 e HepG2;

2.2.6 Avaliar a expressão dos genes Bcl-2, Bax e p53, por PCR em tempo real.

Materiais e métodos

3.1 Material

3.1.1 Toxina

BthTX-I, uma miotoxina de *Bothrops jararacussu* isolada e purificada no Laboratório de Toxinologia da FCFRP-USP, segundo CINTRA et al. (1993), com modificações.

3.1.2 Linhagens Celulares

Foram utilizadas as linhagens tumorais HL-60 (CCL-240, leucemia promielocítica aguda humana), HepG2 (HB-8065, hepatocarcinoma humano), PC-12 (CRL-1721, feocromocitoma de ratos) e B16F10 (CRL-6475, melanoma murino) obtidas da ATCC (Coleção Americana de Cultura de Células).

3.1.3 Outros reagentes

Foram utilizados outros reagentes de grau analítico.

3.2 Métodos

3.2.1 Purificação da BthTX-I

3.2.1.1. Cromatografia de exclusão molecular da peçonha de *B. jararacussu*

O primeiro passo consiste em cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl S-200 (100 cm x 2,6 cm). 300 mg de peçonha bruta dessecada de *Bothrops jararacussu*, foram suspensas em 5mL de bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05M, pH 8,0 e centrifugados por 10 minutos a 10.000 x g.

O sobrenadante obtido foi aplicado à coluna previamente equilibrada com bicarbonato de amônio 0,05M, pH 8, com fluxo de 22,8mL/hora, coletando 3mL/tubo, utilizando coletor de frações PharmaciaBiotech. As absorbâncias das frações foram detectadas em espectrofotômetro Beckman DU® 640 em comprimento de onda de 280nm.

Em seguida o gráfico foi traçado, usando o programa Excell, sendo as amostras delimitadas, reunidas em “pools,” liofilizadas e armazenadas a -20° C, até o momento do uso. A fração contendo a proteína em estudo foi monitorada por SDS-PAGE.

3.2.1.2.Cromatografia de troca iônica em coluna Resource Q da fração BjPIV

Cerca de 10 mg da fração BjPIV da cromatografia de exclusão molecular foi ressuspensa em tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 8, centrifugadas a 10 000 x g por 10 min e aplicados a uma coluna de troca aniônica Resource Q (6.4 mm i.d. x 30 mm – 5 mL) utilizando um sistema FPLC (ACTA purifier, Pharmacia).

As frações foram eluídas inicialmente com o mesmo tampão (A- bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 8,0) e a seguir iniciou-se um gradiente linear de concentração de 0 a 100% B (tampão bicarbonato de amônio 0,5 M, pH 8,0), num período de 20 minutos. Foram coletados 2 mL/tubo em um fluxo de 0,5 mL/min. A absorbância das frações foi monitorada em 280 nm, reunidas e liofilizadas. A fração contendo a proteína em estudo foi monitorada por SDS-PAGE.

3.2.1.3.Cromatografia de fase reversa em coluna C18-ODS

Para confirmar o grau de pureza da BthTX-I, após o processo de purificação, esta foi submetida à cromatografia de fase reversa em coluna C18-ODS (25cm x 4,6 mm), previamente equilibrada com TFA 0,1% (solvente A), com fluxo de 1mL/min. A proteína foi eluída utilizando um gradiente linear, iniciando com TFA 0,1%(solvente A) por 5 minutos, que vai de 0 a 100% de acetonitrila (solvente B) em 70 minutos, permanecendo neste por 10 minutos e então regressando ao solvente A em 10 minutos. O pico foi reunido, liofilizado e submetido a SDS-PAGE.

3.2.1.4.Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise do grau de pureza da BthTX-I isolada foi realizada em SDS-PAGE em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β -mercaptoetanol segundo técnica descrita por Laemmli (1970). Na preparação do gel foi utilizado acrilamida/bis-acrilamida 30:8, preparando o gel de empilhamento a 5,15% pH 6,8, contendo 0,5M de Tris-HCl pH 6,8 e 0,1% de SDS, e um gel de separação a 13% pH 8,8 contendo 2M de Tris-HCl e 0,1% de SDS. As amostras foram dissolvidas no tampão de amostra contendo SDS (0,2g), azul de bromofenol (0,0001g), Tris- HCl (pH 6,8 0,0625M), glicerol (1,0 mL) e água, q.s.p 10mL, sendo que a redução foi realizada com o acréscimo de β -mercaptoetanol (5%). As amostras foram levadas ao banho-maria (100°C) por 5 minutos. O tempo de corrida foi de aproximadamente 3 horas ou até que as amostras alcançaram 1,5cm do final do gel em 10mA e 100V para cada gel (Electroforesis Power Supply EPS 601 – AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH).

O gel foi retirado e corado com *Coomassie Brilliant Blue G 250* 0,2% em água/metanol 1:1 (v/v) por 30 minutos e descorados com trocas sucessivas de ácido acético glacial a 7% (v/v). Foi utilizado como padrão de peso molecular Pharmacia®, os seguintes padrões: fosforilase b (97), soroalbumina bovina (66), ovoalbumina (45), anidrase carbônica (30), inibidor de tripsina (21,1) e lactoalbumina (14,4), sendo os valores expressos em kDa.

3.2.1.5 Determinação quantitativa de proteínas

Para quantificar proteínas presentes nas amostras utilizadas, soluções contendo de 0,1 a 2,0 mg de proteínas foram submetidas à dosagem pelo método do microbiureto, conforme descrito por Itzhaki e Gill (1964). A curva padrão foi construída utilizando-se soroalbumina bovina em diferentes concentrações.

3.2.2 Manutenção da linhagem de células em suspensão e semi-aderentes (HL-60 e PC-12)

As linhagens celulares foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido (-195°C) em alíquotas de 1×10^6 células/mL em solução de congelamento (10% de DMSO (dimetilsulfóxido) e 90% de soro bovino fetal). Para a realização dos experimentos, as linhagens foram descongeladas e cultivadas em monocamada, em frascos de 25 cm³ com 5 mL de meio de cultura RPMI, suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF) para a linhagem de HL-60. Para a linhagem PC-12 utilizou-se o meio RPMI, suplementado com 15% de soro equino fetal (SEF) e 5% de soro bovino fetal. As células foram incubadas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C, até atingirem o estado de confluência ($\sim 5 \times 10^6$ células), quando necessitam de subcultivo.

3.2.2.1 Subcultivo da linhagem de células em suspensão e semi-aderentes

As linhagens celulares HL-60 e PC-12 ao chegarem ao seu ponto de confluência ($\sim 5 \times 10^6$ células) necessitam de um subcultivo. No caso da linhagem HL-60, transferiu-se todo o líquido da garrafa de cultura um tubo de 15 mL. Após essa etapa, o material foi centrifugado 900g por 5 min, em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células foi ressuspensionado. A este material, adicionou-se 1 mL de meio RPMI suplementado com SBF 10% e o conteúdo dividiu-se em mais outros 2 frascos de 25cm³ com 5 mL de meio RPMI, suplementado com SBF 10%. A

linhagem PC-12 tem seu procedimento de subcultivo diferente, por se tratar de células que aderem ao fundo do frasco, nesse caso foi necessário o auxílio de um “scraper” para a “raspagem” do fundo da garrafa de cultura para que suas ligações célula-matriz se desfizessem. Uma vez desfeitas essas ligações, o conteúdo do frasco foi recolhido e levado à centrifugação por 5 min por 900g. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuspendido. Acrescentou-se 1 mL de meio RPMI suplementado com 15% de SEF e 5% de SBF e o conteúdo dividido em mais 2 garrafas de cultura de 25 cm³ com 5 mL de meio RPMI suplementado com 15% de SEF e 5% de SBF.

3.2.3 Manutenção das linhagens de células aderentes (HepG2 e B16F10)

As linhagens celulares foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido (-195°C) em alíquotas de 1x10⁶ células/mL em solução de congelamento (10% de DMSO e 90% de soro bovino fetal). Para a realização dos experimentos, as linhagens foram descongeladas e cultivadas em monocamada, em frascos de 25 cm³ com 5 mL de meio de cultura DMEM (que possui alta concentração de glicose, L-glutamina e ausência de piruvato de sódio) suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF). A seguir, foram incubadas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37 °C, até atingirem o estado de confluência (~ 5x10⁶ células) quando necessitam de subcultivo.

3.2.3.1 Subcultivo das linhagens de células aderentes

As linhagens aderentes necessitaram de um procedimento diferente da linhagem em suspensão e semi-aderente.

Todo o conteúdo do frasco foi desprezado, permanecendo assim, somente as células aderidas ao fundo do frasco. O frasco foi lavado com aproximadamente 2 mL de tampão PBS estéril pH 7,4 que posteriormente foi descartado. Em seguida, adicionou-se 2 mL de tripsina à garrafa de cultura. O período de ação da tripsina é de aproximadamente 5 minutos e após este período, a mesma foi neutralizada com meio DMEM completo, de modo que o volume de meio fosse o dobro do volume usado de tripsina. Realizada essa etapa, transferiu-se todo o conteúdo para um tubo (falcon) de 15 mL e centrifugou-se por 5 min a 900g. Em seguida desprezou-se todo o sobrenadante, sendo o *pellet* celular ressuspenso em aproximadamente 2 mL de

meio DMEM suplementado com 10% de SBF e o conteúdo dividido em mais 2 garrafas de culturas de 25 cm³ com 5 mL de meio DMEM, suplementado com 10% de SBF.

3.2.4 Tratamento com a toxina BthTX-I

A toxina BthTX-I (bothropstoxina I) foi diluída em tampão PBS estéril pH 7,4 nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL e testada nas culturas das linhagens tumorais HL-60, HepG2, PC-12 e B16F10. As amostras foram filtradas em membranas de 0,22 µm, e colocadas nas culturas e assim permaneceram, por um período de 24 horas.

3.2.4.1 Viabilidade celular

Antes da realização de qualquer experimento foi realizado o teste de viabilidade das células a serem usadas, visando garantir a veracidade dos resultados.

O teste foi realizado por dois corantes, azul de Tripán e iodeto de propídeo. Ambos corantes são incorporados por células com membranas fragilizadas, indicando que as células já possuem um estágio de morte avançado. O corante azul de Tripán é usado na proporção de 1:2, pipetando 20µL de corante para 10µL de suspensão de células e esperado 15 minutos para a leitura no microscópio. As células viáveis não são coradas pelo azul de Tripán e aparecem incolores, ao passo que as células mortas apresentam coloração azul. O resultado é expresso pela equação:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{Células viáveis}}{\text{Total de células (viáveis e não viáveis)}} \times 100$$

Depois de realizado o teste pelo azul de Tripán, a viabilidade celular foi mensurada por iodeto de propídeo (PI). Aproximadamente 200µL (volume final) da suspensão celular foram selecionados, incubados em gelo e adicionado 1µL de PI no momento da leitura. Para a realização dos experimentos, foram utilizadas as

culturas com viabilidade por azul de Tripan igual ou superior a 98% e a marcação por PI de no máximo 10%.

3.2.4.2 Ensaios de citotoxicidade (MTT)

Para o teste de citotoxicidade foram utilizadas placas de 96 poços, de modo que os 3 primeiros poços foram utilizados para a leitura do branco e portanto, não receberam células e tratamento. O restante dos poços recebeu 5×10^4 células/poço, com um volume final de 100 μ L e foram incubados por 24 horas à 37°C com 5% de CO₂. Após 24 horas os poços receberam os tratamentos, sendo utilizados 3 poços para cada tratamento e assim administrou-se 50 μ L por poço nas seguintes concentrações de BthTX-I: 5, 10, 25, 50 e 100 μ g/mL. O controle positivo recebeu 50 μ L de Cisplatina 1mg/mL e o controle negativo não recebeu nenhum tratamento. A placa foi incubada por 24 horas à 37°C com 5% de CO₂. No fim deste período, os poços receberam 10 μ L de reagente de MTT (com exceção dos poços do branco) e foram incubados por 3 horas à 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 900g x 5min e posteriormente invertidas para o descarte do sobrenadante e administrados 100 μ L HCl-isopropanol 0,04 N ou DMSO e levados a agitação até a total dissolução dos cristais (aproximadamente 20 minutos) (MOSMANN,1983). Em seguida foi determinada a absorbância em 570 nm em espectrofotômetro Beckman DU 640. Os resultados obtidos foram coletados e transferidos para o software GraphPad Prism 5, para a obtenção dos dados estatísticos.

3.2.4.3 Análise de apoptose/necrose

3.2.4.3.1 Citometria de fluxo

Foram utilizadas 5×10^5 células as quais, foram adicionadas em placa de 24 poços, com volume final de 3 mL e incubadas por 24 horas a 37°C em 5% de CO₂. Ao término desse período, as células foram tratadas com BthTX-I, nas concentrações de 25, 50 e 100 μ g/mL e incubadas por 24 horas a 37°C em 5% de CO₂. No fim desse período, as células foram recolhidas dos poços e centrifugadas a 900g x 5 min, sendo o sobrenadante desprezado, o *pellet* ressuspensionado e adicionado 1 mL de PBS. Em seguida, foram centrifugadas a 900g x 5 min, o sobrenadante desprezado, o *pellet* ressuspensionado e adicionados 100 μ L de tampão

1X de anexina V. Após esse procedimento as células foram centrifugadas novamente a 900g x 5 min, em seguida, as células foram ressuspensas e adicionados 5µL de anexina V FITC. As amostras foram incubadas por 15 minutos em banho de gelo e logo após a incubação, adicionou-se 400µL de tampão 1X de anexina V. As amostras foram transferidas para tubos de citometria e foi adicionado 1µL de iodeto de propídeo no momento da leitura. Foram analisados 10000 eventos no equipamento FACSCanto (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Em seguida os dados foram transferidos para o software GraphPad Prism 5, onde se gerou gráficos e realizou-se a análise estatística para melhor interpretação dos dados.

3.2.4.3.2 Fragmentação de DNA

Foram utilizadas 5×10^5 células em placa de 24 poços, com volume final de 3 mL e incubadas por 24 horas à 37°C e 5% de CO₂. Ao término desse período, as células foram tratadas com BthTX-I, nas concentrações de 25, 50 e 100µg/mL e incubadas por 24 horas à 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram recolhidas dos poços e centrifugadas a 900g x 5 min., sendo o sobrenadante desprezado, o *pellet* ressuspensado e adicionado 1mL de PBS. Em seguida, foram centrifugadas a 900g x 5min, o sobrenadante desprezado, o *pellet* ressuspensado e adicionados 80µL de tampão de lise e 10 µL de RNase A (5 mg/mL). Após esse procedimento as células foram incubadas à 37°C por 1 hora. Em seguida, foram adicionados às células 10 µL de proteinase K e incubados por 2 horas à 50°C. Em seguida foram adicionadas às células 100 µL de fenol, agitadas vigorosamente e centrifugadas a 1.170g x 2 min. Após a centrifugação a fase superior foi coletada, foram adicionados 50 µL de fenol e 50 µL de clorofórmio, agitadas vigorosamente e centrifugadas a 1.170g x 2 min. Ao término da centrifugação a fase superior foi coletada, adicionados 100 µL de clorofórmio, agitadas vigorosamente e centrifugadas a 1.170 g x 2 min.. Em seguida a fase superior foi coletada, adicionados 10 µL de acetato de sódio 3M e 250 µL de etanol 95%, misturados por inversão e incubados por 30 minutos à -20°C. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 1.170g x 5 min. e o sobrenadante descartado. Em seguida foram adicionados 500 µL de etanol 70%, centrifugadas por 1.170g x 5 min. e descartado o sobrenadante. O líquido restante foi invertido sobre papel absorvente por 15-30 min.

e deixados secar por cerca de 30 min.. Após, às amostras secas, foram adicionados 40 µL de tampão TE, para que as mesmas fossem aplicadas ao gel ou armazenadas a -20°C.

O gel foi preparado com 1,5 g de agarose diluídas em 100 mL de tampão TBE 1X (gel 1,5%), e aquecidas até a completa fusão da agarose com o tampão. Em seguida o gel foi levemente resfriado e adicionados 3 µL de brometo de etídio e homogeneizado. O gel foi colocado no suporte para a solidificação e após, foi imerso na cuba com tampão TBE 1X. Foram aplicados em cada poço utilizado do gel, um volume final de 10 µL (10 µL de amostras + 5 µL de tampão TBE 1X e 3 µL de *loading*) e submetidos às condições de corrida de 80 v, 110 mA por aproximadamente 2 horas (cerca de 2/3 do gel). No final da corrida o gel foi fotodocumentado.

Como controle foi utilizado *DNA Ladder 100bp (Invitrogen)*, um padrão com fragmentos entre 100 e 1500 pares de bases em múltiplos de 100 com fragmento adicional de 2072 e faixa mais luminosa nos pares de base de 600.

3.2.4.4 Análise do ciclo celular

Para os ensaios de ciclo celular foram utilizadas 1×10^6 células em placas de 6 poços, com 3 mL de meio de cultura e deixadas em incubação de 24 horas à 37°C e 5% de CO₂. Após esse período as células foram tratadas com BthTX-I, nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL. O controle negativo (células + meio) foi também preparado e ambos incubados por 24 horas à 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, essas células foram recolhidas dos poços e centrifugadas; o sobrenadante foi desprezado; o *pellet* ressuspensionado e adicionado 1 mL de PBS gelado. Em seguida, foram centrifugados por 900g x 5 min, o sobrenadante foi desprezado, o *pellet* ressuspensionado e foram adicionados 100 µL de PBS gelado mais 2 mL de etanol 70% gelado e armazenadas a -20°C por 24 horas. Ao término desse período, as células foram retiradas da temperatura de -20°C e mantidas em gelo, depois foram centrifugadas por 900g x 3 min e o sobrenadante desprezado.

Em seguida, o *pellet* foi ressuspensionado com 333 µL de PBS gelado + 1 µL de RNase A 10mg/mL e incubado por 30 minutos a 37°C. Logo após a incubação, as amostras foram transferidas para tubos de citômetro, colocadas em banho de gelo com 164 µL de HFS (reagente que mensura a quantidade de DNA da célula) e

incubadas em gelo por 1 hora. Foram analisados 10.000 eventos no equipamento FACSCanto (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

O arquivos gerados pelo FACSCanto, foram lidos no software FlowJo 7.6.1 para a análise das fases da divisão celular: G0/G1, S e G2. As porcentagem das fases do ciclo foram transferidas para o GraphPad Prism 5, transformadas em gráficos e a análise estatística foi realizada para melhor visualização.

3.2.4.5 Dosagem de citocinas inflamatórias por ELISA

O ensaio foi dividido em dois dias, sendo o primeiro dia utilizado para a sensibilização da placa e o segundo para colocação da amostra. No primeiro dia os anticorpos primários foram diluídos no tampão de ligação, adicionados 100 µL/poço de anticorpo na placa e espalhados uniformemente. A placa foi vedada e incubada a 4°C *overnight*. No dia seguinte a placa foi lavada três vezes com PBS Tween 20 e feito o bloqueio da placa.

O bloqueio foi realizado utilizando-se 200 µL /poço de solução de leite em pó em PBS a 5% e incubação por 1 hora a temperatura ambiente em câmara úmida. Após foram adicionados 100 µL de citocinas (recombinante) e incubadas por 3 horas. Em seguida, a placa foi lavada por 3 vezes com PBS Tween 20 e aplicado o anticorpo biotinilado (secundário).

Para a aplicação do anticorpo secundário, o mesmo foi diluído em PBS 10% SBF e adicionados 100 µL/poço. Juntamente com o anticorpo foram aplicados 100 µL/poço do sobrenadante das células tratadas com a toxina BthTX-I e incubadas a temperatura ambiente por 2 horas. Na sequência, a placa foi lavada 6 vezes com PBS Tween 20. Em seguida foi adicionado o substrato (cromóforo) mais água oxigenada (100µL/poço) e deixada a placa ao abrigo da luz, cerca de 40 minutos. Logo após, foi bloqueada a reação com 100µL /poço de H₂SO₄ 4N, todo o material foi desprezado e efetuou-se a leitura em 492 nm (BD Aplayed OpTEIA).

3.2.4.6 Expressão dos genes pró e anti-apoptótico Bax, Bcl-2 e p53

O processo de expressão gênica foi realizado pelo método de RT-PCR (*PCR Real-Time*), onde a partir de uma fita molde de RNA foi confeccionado o cDNA (DNA complementar) e através do cDNA foi realizada a amplificação dos genes.

O RNA total foi purificado por fenol e isotiocionato de guanidina (Trizol), no qual células tratadas com diferentes concentrações de BthTX-I, foram submetidas a extração de ácido nucléico, de acordo com o protocolo do fabricante. Foram adicionados 1 mL de TRIZOL[®] (Invitrogen, Life Technologies), incubados por 7 minutos em gelo, agitados e em seguida adicionados 200 µL de clorofórmio para separação de ácidos nucléicos e proteínas, do material de interesse (RNA), e centrifugadas a 12.000g x 15min. Após a centrifugação o sobrenadante foi recolhido e colocado em um novo tubo. O sobrenadante recebeu 500 µL de álcool isopropílico, que foram agitados vigorosamente e centrifugados a 12.000g x 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 1 mL de álcool etílico 75%. A amostra foi centrifugada a 7500g x 5 min, o sobrenadante descartado, o excesso de líquido removido e adicionadas 40 µL de tampão TE para ser estocado a -80°C ou utilizado. A pureza do RNA total foi mensurada por meio da equação:

$$\text{Abs 260} \times \text{fator de diluição} /$$

O processo da síntese de cDNA foi realizado com o *Kit High Capacity CDNA Archive* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), contendo *randoms primers*, transcriptase reversa e desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP), no qual 1 µg de RNA foi incubado com o kit. Essa mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos e sequencialmente por mais 2 horas na temperatura de 37°C, temperatura necessária para que ocorra a polimerização das fitas de cDNA. Ao findar a reação as fitas foram desnaturadas à temperatura de 85°C por 5 minutos e o RNA restante degradado pela RNase H.

A amplificação dos genes *p53*, *Bax* e *Bcl-2*, foi realizada no equipamento Illumina[®], (Uniscience), de acordo com a bateria de ciclos e temperaturas abaixo (Tabela 2).

Tabela 2: Condições de tempo, temperatura e ciclos, para a amplificação de genes pelo método de PCR em tempo real (RT-PCR).

	55 ciclos			
Temperatura	50°	95°	95°	60°
Tempo	2 min	10 min	15 seg	1 min
Volume	10 µL			

3.3 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo método ANOVA “one-way”, onde todos os tratamentos são comparados ao controle negativo, controle positivo e entre os tratamentos, por meio do software Graph Pad Prism 5[®].

Resultados

4.1 Purificação da BthTX-I da peçonha de *B. jararacussu*.

A BthTX-I foi purificada através de dois novos passos cromatográficos: sendo que o primeiro consistiu em uma cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200 (Figura 6A), sendo obtido seis frações denominadas de BjPI, BjPII, BjPIII, BjPIV, BjPV e BjPVI. A proteína em estudo foi identificada por SDS-PAGE na fração BjPIV (Figura 6B, poço 4) quando comparada com a migração da BthTX-I (Figura 6B, poço 5) e foi submetida à cromatografia de troca aniônica em coluna Resource Q obtendo-se três frações BjPIV-I, BjPIV-II e BjPIV-III (Figura 6C). A fração BjPIV-III foi identificada como sendo a BthTX-I através de SDS-PAGE (Figura 6D, poço 3). Para confirmar o grau de pureza da proteína obtida, esta foi submetida à cromatografia de fase reversa utilizando coluna C18-ODS, apresentando um pico único (Figura 6E), que foi monitorado por SDS-PAGE, o qual apresenta duas bandas: uma de menor intensidade que corresponde ao dímero da BthTX-I (~ 30kDa) e o monômero, banda de maior intensidade (~17kDa), (Figura 6F, poço 2).

4.2 Avaliação da citotoxicidade induzida pela BthTX-I

A atividade citotóxica da BthTX-I, em diferentes concentrações (5; 10; 25; 50 e 100 µg/mL), foi avaliada nas seguintes linhagens celulares, HL-60, HepG2, PC-12 e B16F10. Os controles negativos foram considerados células sem tratamento com a proteína e como controle positivo, foram utilizadas culturas tratadas com Cisplatina 1mg/mL (Darrow®).

A viabilidade celular das células HepG2, submetidas ao tratamento com 5 µg/mL de BthTX-I foi 42,76±7,04%. Já nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 µg/mL de BthTX-I foi possível observar a viabilidade celular de 39,71±4,19; 37,85±3,48; 35,77±3,96 e 30,46±1,9%, respectivamente, evidenciando que nas concentrações elevadas a BthTX-I foi mais efetiva (Figura7).

Os resultados obtidos após o tratamento com a BthTX-I apresentaram valores estatisticamente significativos quando comparados ao controle positivo ($p < 0,05$) e ao controle negativo ($p < 0,05$). A cisplatina (1mg/mL) apresentou 15,36±2,53% de viabilidade celular, tornando assim, inviáveis 84,64% das células HepG2. Enquanto que a BthTX-I apresentou 69,54% de células inviáveis e 30,46±1,9% de células viáveis na concentração mais citotóxica (100 µg/mL) sendo portanto, muito potente

Figura 6: Purificação da BthTX-I da peçonha de *B. jararacussu*. **(A)** Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200 da peçonha de *Bothrops jararacussu*. A peçonha de *Bothrops jararacussu* (300mg), foi suspensa em 5 mL de NH_4HCO_3 0,05M pH 8 e aplicada à coluna (100 cm x 2,6 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão, com fluxo de 22,8 mL/hora, sendo coletado 3 mL/tubo e determinada a absorbância em 280nm. Obtenção dos picos BjPI, BjPII, BjPIII, BjPIV, BjPV e BjPVI. **(B)** Eletroforese em gel de poliácridamida das frações obtidas da cromatografia de exclusão molecular. 1. Peçonha bruta de *B. jararacussu* 2.BjPII, 3.BjPIII, 4.BjPIV e 5. BthTX-I. **(C)** Cromatografia de troca iônica da fração BjPIV. 10mg da fração BjPIV foram aplicadas a uma coluna de troca aniônica Resource Q (6,4mm x30 mm) equilibrada e eluída inicialmente com tampão bicarbonato de amônio 0,05 M pH 8, num fluxo de 0,5 mL/min. Em seguida iniciou-se um gradiente linear de concentração de 0 a 100% de B (bicarbonato de amônio 0,5 M, pH 8) num período de 20min. Foram coletados 2mL/tubo e a absorbância monitorada em 280 nm. **(D)** Eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) das frações obtidas da cromatografia de troca aniônica. 1.BjPIV-I, 2. BjPIV-II, BjPIV-III e 4. padrão de peso molecular (Pharmacia®): fosforilase b (97.000), BSA (67.000), ovalbumina (43.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina de soja (20.100), e α -lactalbumina (14.400). **(E)** Cromatografia de fase reversa da fração BjPIV-III (BthTX-I). Foi utilizada coluna C-18-ODS previamente equilibrada em TFA 0,1% (solvente A), eluída na forma de gradiente linear com o solvente A e Acetonitrila 70% (solvente B). Início com 100% de A e permanência deste por 5 minutos, com a introdução de B (0-100%) em 70 minutos, permanecendo por 10 minutos em 100% e retornando a 100% de A. **(F)** SDS-PAGE do pico obtido da cromatografia de fase reversa. 1. Padrão de peso molecular e 2. BthTX-I com β -mercaptanol.

Figura 7: Viabilidade celular da linhagem HepG2 após tratamento com BthTX-I: A citotoxicidade foi avaliada por MTT. Os tratamentos realizados com a BthTX-I apresentaram valores estatisticamente significativos quando comparados ao controle negativo e controle positivo ($p < 0,05$). A concentração de 100 µg/mL apresenta valor estatisticamente significativo comparado às concentrações de 5 e 10 µg/mL ($p < 0,05$). Letras iguais representam valores sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$); letras diferentes representam valores com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). CN (controle negativo); CP (controle positivo, Cisplatina 1mg/mL). Os resultados representam o valor da média $\pm$ desvio padrão para três experimentos independentes.

quando comparada à cisplatina. É importante salientar, que a concentração de cisplatina utilizada (1 mg/ml) é 10 vezes maior que a de BthTX-I.

Comparando os resultados da viabilidade celular das diferentes concentrações de BthTX-I com o controle positivo observa-se diferenças estatisticamente significativas em todas as concentrações ($p < 0,05$).

A análise comparativa da viabilidade das diferentes concentrações de BthTX-I, sobre as células HepG2, mostra que a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ possui diferença estatisticamente significativa comparada às concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) e não possui significância estatística para a demais concentrações ($p > 0,05$) (Figura 7).

A ação da BthTX-I sobre as células de leucemia pró-mielocítica, HL-60, foi mais efetiva nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, uma vez que a viabilidade celular apresentada na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ foi de $76,07 \pm 1,34\%$, enquanto que para as demais concentrações a viabilidade celular ficou em torno de 40%. Foi possível observar, que mesmo na menor concentração (5 $\mu\text{g/mL}$), houve uma diferença estatística significativa quando comparado aos valores apresentados pelo CN (controle negativo) e CP (controle positivo), ($p < 0,05$). Nas maiores concentrações (10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) foi possível observar a viabilidade de $46,27 \pm 3,07$; $35,96 \pm 0,08$; $39,22 \pm 0,58$ e $38,31 \pm 0,82\%$, respectivamente (Figura 8). O controle positivo (Cisplatina 1 mg/mL), mostrou viabilidade celular de $16,06 \pm 0,25\%$, tornando assim inviáveis 83,94% das células HL-60. Os resultados das concentrações de BthTX-I comparados ao controle positivo, apresentaram diferenças estatisticamente significativas em todas as concentrações ($p < 0,05$). A análise da viabilidade das diferentes concentrações de BthTX-I mostra que todas as concentrações apresentaram diferença estatisticamente significativa entre elas ($p < 0,05$), porém a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ não apresentou diferença estatística comparada às concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ ($p > 0,05$), (Figura 8).

A Figura 9 mostra o perfil de viabilidade da linhagem PC-12 após tratamento com a BthTX-I. Nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ é possível observar viabilidade celular de $48,18 \pm 6,33\%$; $37,83 \pm 3,96\%$; $45,6 \pm 2,57\%$ e $47,1 \pm 8,9\%$, respectivamente, sendo que a média de células inviáveis para essas concentrações foi de 53,3% (Figura 9). Valores esses, estatisticamente significativos quando

Figura 8: Viabilidade celular da linhagem HL-60 após tratamento com BthTX-I: A citotoxicidade foi avaliada por MTT. Os tratamentos realizados com a BthTX-I apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao controle negativo e controle positivo ($p < 0,05$). Todas as concentrações apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A concentração de 100 µg/mL, não apresentou diferença estatística significativa comparada com as concentrações de 25 e 50 µg/mL ($p > 0,05$). Letras iguais representam valores sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$); letras diferentes representam valores com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). CN (controle negativo); CP (controle positivo, Cisplatina 1mg/mL). Os resultados representam o valor da média $\pm$ desvio padrão para três experimentos independentes.

Figura 9: Viabilidade celular da linhagem PC-12 após tratamento com BthTX-I. A citotoxicidade foi avaliada por MTT. Todos os tratamentos realizados com a BthTX-I apresentaram valores estatisticamente significativos quando comparados ao controle negativo ($p < 0,001$). As concentrações de 10, 25, 50 e 100 µg/mL não apresentaram diferença estatística significativa quando comparadas entre elas ($p > 0,05$). A concentração de 5 µg/mL, apresentou valor estatisticamente significativo quando comparada às demais concentrações. Todas as concentrações apresentaram diferenças estatisticamente significativas comparadas ao CP ($p < 0,001$). Letras iguais representam valores sem diferença estatística significativa ($p > 0,001$); letras diferentes representam valores com diferença estatística significativa ($p < 0,001$). CN (controle negativo); CP (controle positivo, Cisplatina 1 mg/mL). Os resultados representam o valor da média $\pm$ desvio padrão para três experimentos independentes.

comparados ao controle negativo, controle positivo ($p < 0,001$), mas quando comparados entre eles não apresentaram valores estatisticamente significativos ($p > 0,05$). Essas concentrações foram mais efetivas para essa linhagem celular. Na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$, foi possível observar uma baixa toxicidade da BthTX-I sobre as células tumorais PC-12, (41,82%), quando comparada às demais concentrações, apresentando valores com diferença estatística significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao controle negativo e positivo do experimento e apresentaram valores estatisticamente significativos comparados às demais concentrações ($p < 0,05$), (Figura 9).

Os ensaios realizados com a BthTX-I em linhagens B16F10 sugerem que a BthTX-I tem ação citotóxica ampla, uma vez que apresentou valores expressivos para as linhagens HL-60, HepG2 e PC-12. As células B16F10 quando submetidas ao tratamento com BthTX-I mostraram redução da viabilidade em todas as concentrações testadas (cerca de 37% de viabilidade), sendo mais citotóxicas que o controle positivo de Cisplatina ($48,57 \pm 3,85\%$ de viabilidade). Nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de BthTX-I foi possível observar a viabilidade celular de $37,52 \pm 0,36\%$; $38,37 \pm 1,53\%$; $36,62 \pm 0,36\%$; $36,14 \pm 0,58\%$ e $38,64 \pm 1,24\%$ respectivamente, sendo que todas as concentrações apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparadas ao controle negativo ($^a < 0,001$) e controle positivo ($^b < 0,001$) e não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre elas (Figura 10).

4.3 Análise da cinética do ciclo celular

4.3.1. Células HepG2

Após a realização dos ensaios de viabilidade celular pela metodologia do MTT, foram realizados experimentos para análise do ciclo celular.

A análise do ciclo celular tem por objetivo localizar a atuação dessa proteína (BthTX-I) no processo apoptótico.

A análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo revelou um acúmulo de células HepG2 na fase S após o tratamento com a BthTX-I. Quando as células foram tratadas com BthTX-I, nas concentrações de 5, 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$ por 24 horas, a porcentagem de células na fase G0/G1 foi de $68,99 \pm 12,88\%$; $67,43 \pm 7,23\%$

Figura 10: Viabilidade celular da linhagem B16F10 após tratamento com BthTX-I. A citotoxicidade foi avaliada por MTT. Os tratamentos realizados com a BthTX-I, em todas as concentrações, apresentaram valores estatisticamente significativos quando comparados ao controle negativo ($p < 0,001$) e ao controle positivo ($p < 0,001$) e não apresentaram valores estatisticamente significativos entre as concentrações ($p > 0,05$). Letras iguais representam valores sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$); letras diferentes representam valores com diferença estatística significativa ($p < 0,001$). CN (controle negativo); CP (controle positivo, Cisplatina 1mg/mL). Os resultados representam o valor da média $\pm$ desvio padrão para dois experimentos independentes.

e $68,03 \pm 11,62\%$, respectivamente, não apresentando no entanto, diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao valor do controle negativo ($65,20 \pm 9,64\%$). Nas maiores concentrações, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, foi observada uma redução de células na fase G0/G1 do ciclo celular ($62,45 \pm 5,27\%$ e $57,42 \pm 22,69\%$, respectivamente), revelando valores estatisticamente significativos em relação ao controle negativo do experimento.

A redução das células em G1 parece estar associada com o aumento concomitante da porcentagem de células em S, que aumentou de $14,58 \pm 3,35\%$ (CN) para $23,38 \pm 4,84\%$ e $19,73 \pm 9,71\%$ nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Esses valores apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparados aos valores de células na fase S do controle negativo ($14,58 \pm 3,35\%$).

A fase G2/M obteve valores estatisticamente menores, em relação a G0/G1 e S, na maioria das concentrações testadas. O acúmulo de células na fase S foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) em relação a G0/G1 nas concentrações mais elevadas (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$), quando comparadas aos valores do controle negativo (Figura 11).

Nos ensaios realizados, foi possível observar que em concentrações maiores (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), há maior porcentagem de células em S em relação à fase G0/G1 e G2/M. Nas concentrações intermediárias, é possível observar uma leve diminuição de células em G0/G1 e leve aumento de células em S (Figura 11).

4.3.2. Células HL-60

O perfil de distribuição das células HL-60 no ciclo celular, após o tratamento com a BthTX-I, revelou diferenças quando comparado ao perfil encontrado nas células HepG2.

A análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo revelou um acúmulo de células HL-60 na fase G2 após o tratamento com a BthTX-I (Fig. 12). Quando as células foram tratadas com BthTX-I nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ por 24 horas, a porcentagem de células na fase G0/G1 foi de $66,28 \pm 1,32\%$, $73,57 \pm 2,41\%$, $70,07 \pm 9,42\%$, $66,45 \pm 3,46\%$ e $70,13 \pm 13,01\%$, respectivamente, não apresentando no entanto, valores com diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) quando comparados ao valor do controle

Figura 11. Inibição da progressão do ciclo celular em células HepG2 após o tratamento com BthTX-I. Atraso na fase **S** após o tratamento com BthTX-I (50 e 100 µg/mL). Controle: G0/G1 65,20%, S 14,58%, G2/M 20,20%. 5 µg/mL BthTX-I: G0/G1 68,99%, S 16,93%, G2/M 10,35%. 10 µg/mL BthTX-I: G0/G1 67,43%, S 23,02%, G2/M 9,53%. 25 µg/mL BthTX-I: G0/G1 68,03%, S 18,22%, G2/M 13,75%. 50 µg/mL BthTX-I: G0/G1 62,45%, S 23,38%, G2/M 15,16%. 100 µg/mL BthTX-I: G0/G1 57,42%, S 19,73%, G2/M 22,84%. As células foram fixadas com etanol e coradas com iodeto de Propídeo, e analisada a distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo. ^{a,d} $p < 0,05$ revelando uma diminuição das células em G0/G1 após o tratamento com 50 e 100 µg/mL de BthTX-I. ^{b,e} $p < 0,05$ revelando aumento das células em S após o tratamento com 50 e 100 µg/mL de BthTX-I. Letras iguais referem-se a valores estatisticamente iguais ($p > 0,05$); letras diferentes referem-se a valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Os valores estatísticos estão separados de acordo com as fases do ciclo celular (G0/G1; S e G2/M) e concentração da proteína BthTX-I.

Figura 12. Inibição da progressão do ciclo celular em células HL-60 após o tratamento com BthTX-I. Atraso na fase **G2/M** após o tratamento com BthTX-I (25, 50 e 100 µg/mL). Controle: G0/G1 72,91%, S 18,0%, G2/M 9,08%. 5 µg/mL BthTX-I: G0/G1 66,28%, S 19,87%, G2/M 13,92%. 10 µg/mL BthTX-I: G0/G1 73,57%, S 22,89%, G2/M 3,53%. 25 µg/mL BthTX-I: G0/G1 70,07%, S 13,66%, G2/M 16,26%. 50 µg/mL BthTX-I: G0/G1 66,45%, S 13,28%, G2/M 20,25%. 100 µg/mL BthTX-I: G0/G1 70,13%, S 11,12%, G2/M 18,74%. As células foram fixadas com etanol e coradas com iodeto de Propídeo, e analisadas a distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo. ^a $p > 0,05$ não apresentando diferença estatística significativa entre os valores de células na fase G0/G1 do ciclo celular. ^b $p > 0,05$ revelando valores sem diferença estatística na fase S do ciclo celular nas diferentes concentrações de BthTX-I. ^{d,e} $p < 0,05$ revelando diferença estatística na fase G2 do ciclo celular nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL de BthTX-I, com aumento das células em G2. Valores estatísticos comparados aos valores do controle negativo do experimento. Letras iguais referem-se a valores estatisticamente iguais ($p > 0,05$); letras diferentes referem-se a valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Os valores estatísticos estão separados de acordo com as fases do ciclo celular (G0/G1; S e G2/M) e concentrações da proteína.

negativo $72,91 \pm 4,75$. A fase S apresentou leve aumento de células nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de BthTX-I e, nas maiores concentrações (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), foi observado uma redução de células em relação ao controle negativo.

A redução das células em S parece estar associada com o aumento concomitante da porcentagem de células em G2, que aumentou para $16,26 \pm 11,82\%$; $20,25 \pm 14,58\%$ e $18,74 \pm 4,33\%$ nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Esses valores apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparados aos valores de células na fase G2 do controle negativo ($9,08 \pm 7,67\%$) (Figura 12). O acúmulo de células na fase G2 foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) em relação a S nas concentrações mais altas (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$), quando comparados aos valores do controle negativo (Figura 12).

Nos ensaios realizados, foi possível observar que em concentrações maiores (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), há maior porcentagem de células em G2 em relação à fase G0/G1 e S, (Figura 12).

4.3.3 Células B16F10

As células B16F10 submetidas ao tratamento com a toxina BthTX-I, nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, mostrou o perfil de distribuição das células nas fases do ciclo celular conforme mostrado na Figura 13.

Foi possível observar que, todas as concentrações apresentaram aumento na fase G0/G1 quando comparadas ao controle negativo do experimento ($66,83 \pm 0,54\%$), onde os valores obtidos com os tratamentos de 5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, foram respectivamente $89,64 \pm 1,71$; $88,66 \pm 2,54$; $82,57 \pm 3,52$; $91,23 \pm 1,58$ e $88,08 \pm 0,34\%$. Todas as concentrações apresentaram valores com diferença estatisticamente significativa comparados ao controle negativo ($p < 0,05$). As concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ também apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). As demais concentrações não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas entre si, ($p > 0,05$).

O tratamento da linhagem B16F10 com BthTX-I, não mostrou atraso na fase S, apresentando valores de $12,38 \pm 1,16\%$; $11,34 \pm 2,53\%$; $17,44 \pm 3,48\%$; $8,82 \pm 1,67\%$ e $11,90 \pm 0,3\%$, respectivamente para as concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 13).

Esses valores não são expressivos e quando comparados ao controle

Figura 13: Inibição da progressão do ciclo celular em células B16F10 após o tratamento com BthTX-I: Atraso na fase **G0/G1** após o tratamento com BthTX-I : (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL). Controle: G0/G1 66,83%, S 12,37%, G2/M 20,94%. 5 µg/mL BthTX-I: 89,64%, S 12,38%, G2/M 0%. 10 µg/mL BthTX-I: G0/G1 88,66%, S 11,34%, G2/M 0%. 25 µg/mL BthTX-I: G0/G1 82,57%, S 17,44%, G2/M 0%. 50 µg/mL BthTX-I: G0/G1 91,23%, S 8,82%, G2/M 0%. 100 µg/mL BthTX-I: G0/G1 88,08%, S 11,90%, G2/M 0%. As células foram fixadas com etanol e coradas com iodeto de Propídeo, e analisadas a distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo. ^{a,e}p<0,05 revelando valores com diferença estatística na fase G0/G1 do ciclo celular das diferentes concentrações de BthTX-I, comparadas ao controle negativo. ^{f,g}p<0,05 revelando diferença estatística entre as concentrações de 25 e 50 µg/mL, na fase G0/G1. ^bp>0,05 revelando valores sem diferença estatística das concentrações da BthTX-I comparadas ao controle negativo na fase S. ^{c,d}p<0,05 revelando diferença estatística das concentrações da BthTX-I comparadas ao controle negativo da fase G2/M. Letras iguais referem-se a valores estatisticamente iguais (p>0,05); letras diferentes referem-se a valores estatisticamente diferentes (p<0,05). Os valores estatísticos estão separados de acordo com as fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) e concentrações da proteína.

negativo ($12,37 \pm 4,40\%$), não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Esse atraso em G0/G1 é concomitante com o “desaparecimento” da fase G2/M. São vistas, somente células na fase G2/M, no controle negativo, $20,94 \pm 3,65\%$, já nas concentrações da toxina, mesmo na menor ($5 \mu\text{g/mL}$), não se observa células na fase G2/M (Figura 13).

4.3.4 Células PC-12

O perfil do ciclo celular da linhagem PC-12 tratada com as concentrações de 5, 10, 25, 50 e $100 \mu\text{g/mL}$ de BthTX-I, apresentou, comparadas ao controle negativo ($67,06 \pm 1,31\%$), atraso na fase G0/G1 nas concentrações de 10, 25, 50 e $100 \mu\text{g/mL}$ com $83,93 \pm 3,87\%$; $83,54 \pm 0,49\%$; $83,64 \pm 3,34\%$ e $93,54 \pm 3,74\%$ respectivamente, valores com diferença estatisticamente significativa comparados ao controle negativo ($p < 0,05$).

Na concentração de $5 \mu\text{g/mL}$ foi observado o valor de $70,97 \pm 5,95\%$ na fase G0/G1, porém, sem diferença estatisticamente significativa comparada ao controle negativo.

Na fase S, não foi visto o atraso na fase nas as concentrações de 5, 10, 25, 50 e $100 \mu\text{g/mL}$ com valores de, $27,53 \pm 1,07\%$, $16,07 \pm 2,87\%$, $16,45 \pm 0,5\%$, $16,35 \pm 3,36\%$ e $6,38 \pm 3,84$, respectivamente. Esses valores comparados ao controle negativo ($17,84 \pm 1,26\%$), não se mostraram maiores, apesar da concentração de $5 \mu\text{g/mL}$ apresentar valor acima do controle, os dados não apresentam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle ($p > 0,05$) (Figura 13), mas apresentam diferença estatisticamente significativa quando as concentrações são comparadas entre si ($p < 0,05$).

É possível ver que o atraso da fase G0/G1, culmina em menor percentual de células em S e conseqüentemente menor percentual na fase G2/M, que é observado ao comparar as concentrações de 10, 25, 50 e $100 \mu\text{g/mL}$, onde o aumento de células na fase G0/G1 $83,93\%$ ($10 \mu\text{g/mL}$) à $93,54\%$ ($100 \mu\text{g/mL}$), culmina no decréscimo de células em S, indo de $16,97\%$ ($10 \mu\text{g/mL}$) para $6,38\%$ ($100 \mu\text{g/mL}$) e na total ausência de células em G2/M nas concentrações de 10, 25, 50 e $100 \mu\text{g/mL}$. Valores com diferenças estatisticamente significativas comparados ao controle negativo ($p < 0,05$), (Figura 14).

Figura 14: Inibição da progressão do ciclo celular em células PC-12 após o tratamento com BthTX-I: Atraso na fase **G0/G1** após o tratamento com BthTX-I : (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL). Controle: G0/G1 67,06%, S 17,84%, G2/M 15,10%. 5 µg/mL BthTX-I: 70,97%, S 27,53%, G2/M 1,5%. 10 µg/mL BthTX-I: G0/G1 83,93%, S 16,07%, G2/M 0%. 25 µg/mL BthTX-I: G0/G1 83,54%, S 16,45%, G2/M 0%. 50 µg/mL BthTX-I: G0/G1 83,64%, S 16,35%, G2/M 0%. 100 µg/mL BthTX-I: G0/G1 93,54%, S 6,38%, G2/M 0%. As células foram fixadas com etanol e coradas com iodeto de Propídeo, e analisadas a distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo.^{d,e}p<0,05 revelando valores com diferença estatística das concentrações da BthTX-I comparadas ao controle negativo na fase G0/G1. ^{f,g,h}p<0,05 revelando valores com diferença estatisticamente significativa comparadas ao controle negativo na fase S. ^{c,i}p<0,05 revelando valores com diferenças estatisticamente significativas comparadas ao controle negativo da fase G2/M. Letras iguais referem-se a valores estatisticamente iguais (p>0,05); letras diferentes referem-se a valores estatisticamente diferentes (p<0,05). Os valores estatísticos estão separados de acordo com as fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) e concentrações da proteína.

4.4 Análise do potencial apoptótico/necrótico da BthTX-I

A BthTX-I mostrou baixo potencial apoptótico na linhagem HL-60, com os seguintes valores $3,76 \pm 12,88\%$; $2,23 \pm 0,57\%$ e $2,03 \pm 2,13\%$, respectivamente para as concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, valores esses sem diferença estatística significativa, ($p > 0,05$), ao serem comparados ao controle negativo ($0,0\%$). Também apresentou baixo percentual de necrose $1,46 \pm 0,75\%$ para 25 $\mu\text{g/mL}$; $3,53 \pm 0,23\%$ para 50 $\mu\text{g/mL}$ e $5,0 \pm 1,73\%$ para 100 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ não apresentou diferença estatística significativa ($p > 0,05$), comparada ao controle negativo ($2,2 \pm 0,69\%$) e positivo ($0,66 \pm 0,11\%$), enquanto que as concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ por sua vez, apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparadas aos controles ($p < 0,05$). Células PI+/AV+ (células que expõe fosfatidilserina e incorporam iodeto de propídeo simultaneamente) apresentaram os seguintes valores para as concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$: $10,7 \pm 3,27\%$; $19,16 \pm 0,57\%$ e $20,83 \pm 2,13\%$, respectivamente. Todas as concentrações apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparadas ao controle negativo ($2,13 \pm 0,57\%$), porém a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ não apresentou diferença estatística significativa ($p > 0,05$), comparada ao controle positivo ($9,93 \pm 0,58\%$). Conforme exemplificado na figura 15, o tipo de morte celular predominantemente induzida pela BthTX-I em células HL-60 é tipo PI+/AV+, ou seja, células que entram em apoptose, mas que em algum momento da morte apoptótica, entram em necrose, expondo fosfatidilserina e incorporando ao mesmo tempo o iodeto de propídeo, sendo que a fosfatidilserina caracteriza apoptose e iodeto de propídeo, necrose.

Células HepG2 tratadas com a toxina apresentaram maior perfil de células apoptóticas, sendo decrescente o valor com o aumento da concentração, no qual foram observados os seguintes valores para as concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$: $44,53 \pm 2,19\%$; $34,46 \pm 2,65\%$ e $27,9 \pm 2,99\%$, respectivamente. As concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparadas ao controle negativo ($0,3 \pm 0,17\%$) e controle positivo ($52,2 \pm 1,58\%$).

As células PI+/AV+, apresentaram perfil inverso às células apoptóticas, com os valores de $24,16 \pm 0,63\%$, $24,03 \pm 0,05\%$ e $39,06 \pm 3,22\%$, respectivamente para as

Figura 15: Perfil apoptótico/necrótico da linhagem HL-60 tratada com BthTX-I. Avaliação realizada por citometria de fluxo em diferentes concentrações de BthTX-I, (25, 50 e 100 µg/mL). O controle positivo (CP) usado foi Cisplatina (10µg/mL) e o negativo foram células sem qualquer tratamento. *, valores sem diferença estatisticamente significativa, quando comparados ao controle negativo (CN), ($p > 0,05$). **, valores sem diferença estatisticamente significativa, quando comparados ao controle positivo, ($p > 0,05$). ***, diferença estatisticamente significativa quando comparados aos controles, ($p < 0,05$).

concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL. Valores esses estatisticamente significativos, ($p < 0,05$), comparados com controle positivo ($4,76 \pm 3,75\%$) e controle negativo ($1,66 \pm 0,28\%$). O perfil necrótico também se elevou, à medida que a concentração aumentou, $6,13 \pm 5,13\%$ na concentração de 25 µg/mL, $12,56 \pm 5,94\%$ na concentração de 50 µg/mL e $15,86 \pm 1,96\%$ para a concentração de 100 µg/mL. A concentração de 25 µg/mL não apresentou diferença estatisticamente significativa, ($p > 0,05$), quando comparada ao controle positivo ($0,4 \pm 0,11\%$) e negativo ($2,2 \pm 1,38\%$), ao passo que as concentrações de 50 e 100 µg/mL apresentaram diferença estatisticamente significativa comparadas aos controles. Assim o tipo de morte celular que predomina na menor concentração (25 µg/mL) é apoptótica, ao passo que na maior concentração (100 µg/mL) há predominância da morte celular PI+/AV+ (Figura 16).

O perfil apoptótico da linhagem PC-12 frente às concentrações utilizadas mostrou ser dose-dependente, com os valores de $14,75 \pm 2,59\%$ na concentração de 25 µg/mL, $17,65 \pm 3,16\%$, concentração de 50 µg/mL e $21,40 \pm 1,67\%$ para concentração de 100 µg/mL. Todas as concentrações mostraram valores com diferença estatística significativa, ($p < 0,05$) ao serem comparadas ao controle positivo ($87,2 \pm 0,14\%$) e somente a concentração de 25 µg/mL não apresentou diferença estatística significativa ($p > 0,05$) quando comparada ao controle negativo ($8,4 \pm 2,66\%$). O tratamento mostrou baixo índice de necrose, $6,1 \pm 3,67\%$; $1,5 \pm 0,42\%$ e $0,5 \pm 0,14\%$ para as respectivas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL. As concentrações de 50 e 100 µg/mL apresentaram diferença estatisticamente significativas comparadas ($p < 0,05$) ao controle positivo ($8,85 \pm 1,06\%$) e nenhuma apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), comparadas ao controle negativo ($0,65 \pm 0,21\%$). O perfil PI+/AV+ também se mostrou inversamente proporcional ao aumento da concentração, com os índices de, $12,0 \pm 1,6\%$; $8,9 \pm 1,04\%$ e $2,7 \pm 2,68\%$ para 25, 50 e 100 µg/mL, respectivamente. As concentrações de 25 e 50 µg/mL apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), comparadas ao controle positivo ($3,9 \pm 0,98\%$) e negativo ($3,8 \pm 0,21\%$), ao passo que a concentração de 100 µg/mL não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), comparada aos controles. Diante do exposto, a menor concentração (25 µg/mL), mostra morte por necrose (6,1%), apoptose

Figura 16: Perfil apoptótico/necrótico da linhagem HepG2 tratada com BthTX-I. Avaliada realizada por citometria de fluxo em diferentes concentrações de BthTX-I, (25, 50 e 100 µg/mL). O controle positivo (CP) usado foi Cisplatina (10µg/mL) e o negativo foram células sem qualquer tratamento. *, valores sem diferença estatisticamente significativa, quando comparados ao controle negativo (CN), ($p>0,05$). **, valores sem diferença estatisticamente significativa, quando comparados ao controle positivo, ($p>0,05$). ***, diferença estatisticamente significativa quando comparados aos controles, ($p<0,05$).

(14,75%) e PI+/AV+ (12,0%), predominando apoptose. À medida que a concentração foi elevada, os níveis de necrose (1,5%) e PI+/AV+ (8,9%) diminuíram, até que na maior concentração avaliada (100 µg/mL), foram observados valores mínimos de necrose (0,5%) e PI+/AV+ (2,7%), predominando morte celular por apoptose (21,4%), (Figura 17).

A linhagem B16F10, quando tratada com diferentes concentrações de BthTX-I, apresentou índices apoptóticos maiores que PI+/AV+ e necrose, na qual as concentrações de 50 µg/mL ($31,45 \pm 1,16\%$) e 100 µg/mL ($35,03 \pm 1,56\%$) mostraram valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$), em relação ao controle positivo ($40,40 \pm 2,86\%$) e negativo ($0,0 \pm 0,01\%$). A concentração de 25 µg/mL ($40,92 \pm 2,71\%$) possui diferença estatisticamente significativa somente quando comparada ao controle negativo ($p < 0,05$) e apresentou índice apoptótico semelhante ao controle positivo. Ao passo que o perfil PI+/AV+ apresentou para as concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL os respectivos valores, $5,75 \pm 3,9\%$; $6,54 \pm 0,6\%$; $4,53 \pm 0,01\%$, os quais foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$), quando comparados ao controle positivo ($19,42 \pm 2,42\%$) e controle negativo ($0,04 \pm 0,02\%$).

Células com caráter necrótico se mantiveram em valores abaixo de 10% sendo que, na concentração de 25 µg/mL apresentou $3,26 \pm 0,48\%$ de células necróticas; 50 µg/mL apresentou índice necrótico de $8,28 \pm 0,47\%$ e de 100 µg/mL apresentou $4,41 \pm 0,07\%$ de células em necrose. Somente a concentração de 100 µg/mL apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o controle positivo ($10,36 \pm 2,87\%$) e negativo ($1,08 \pm 1,12\%$), enquanto que as concentrações de 25 e 50 µg/mL, apresentaram diferença estatística significativa somente para o controle negativo. Os dados refletem que o tratamento da linhagem B16F10 com BthTX-I, induz morte celular por apoptose independentemente da concentração de toxina administrada (Figura 18).

A fragmentação de DNA foi realizada em gel de agarose 1,5% e a presença destes fragmentos demonstraram que ocorreu um processo apoptótico (ELMORE, 2007).

Na linhagem HL-60 a BthTX-I promoveu fragmentação do DNA nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL, concentrações essas, que se apresentaram mais citotóxicas para as linhagens estudadas. A eletroforese em agarose revelou

Figura 17: Perfil apoptótico/necrótico da linhagem PC-12 tratada com BthTX-I. Avaliação realizada por citometria de fluxo em diferentes concentrações de BthTX-I, (25, 50 e 100 µg/mL). O controle positivo (CP) usado foi Cisplatina (10µg/mL) e o negativo foram células sem qualquer tratamento. *, valores sem diferença estatisticamente significativa, quando comparados ao controle negativo (CN), ($p > 0,05$). **, valores sem diferença estatisticamente significativa, quando comparados ao controle positivo, ($p > 0,05$). ***, diferença estatisticamente significativa quando comparados aos controles ($p < 0,05$).

Figura 18: Perfil apoptótico/necrótico da linhagem B16F10 tratada com BthTX-I. Avaliação realizada por citometria de fluxo em diferentes concentrações de BthTX-I, (25, 50 e 100 µg/mL). O controle positivo (CP) usado foi Cisplatina (10µg/mL) e o negativo foram células sem qualquer tratamento. *, valores sem diferença estatisticamente significativa, quando comparados ao controle negativo (CN), ($p > 0,05$). **, valores sem diferença estatisticamente significativa, quando comparados ao controle positivo, ($p > 0,05$). ***, diferença estatisticamente significativa quando comparados aos controles, ($p < 0,05$).

mais citotóxicas para as linhagens estudadas. A eletroforese em agarose revelou que o conteúdo de DNA se fragmentou nas concentrações avaliadas, assim todas as amostras apresentaram processo apoptótico ou um processo apoptótico juntamente com necrose.

A linhagem HL-60 apresentou bandas de fragmentação de DNA visíveis na faixa de 2072 bp e entre 600 e 100 bp (Figura 19), nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL.

Na linhagem HepG2, na presença de 25 µg/mL de BthTX-I, não foi possível observar se ocorreu ou não fragmentação do DNA. Ao passo que nas concentrações de 50 e 100 µg/mL foram observados fragmentos visíveis nas faixas de 700, 500 e 300 bp, os quais sugerem apoptose (Figura 20).

Células B16F10, quando submetidas ao tratamento com a BthTX-I, mostraram fragmentos de DNA nas faixas de 700, 500, 400 e 300 bp, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Na concentração de 25 µg/mL, observa-se no ponto de origem uma banda única e não foi observado fragmentos de degradação (Figura 21).

O perfil eletroforético da linhagem PC-12 frente ao tratamento com a toxina BthTX-I apresentou baixa resolução na concentração de 25 µg/mL, não sendo possível visualizar os fragmentos de DNA. Na concentração de 50 µg/mL é possível observar a fragmentação nas faixas de 700, 500, 400 e entre 300 e 200 bp. Já na concentração de 100 µg/mL são visíveis fragmentos de 700, 500 e 400 bp e, abaixo do fragmento de 400 bp, observa-se um “arraste” de fragmentos, tornando-se difícil constatar com certeza se há ou não algum fragmento remanescente (Figura 22).

4.5 Expressão dos genes pró e anti-apoptóticos: *Bax*, *Bcl-2* e *p53*

A expressão gênica da linhagem HL-60, apresentou aumento na expressão de *Bax*, na maior concentração avaliada, 100µg/mL ($1,17 \pm 0,007$) diferente estatisticamente das demais concentrações e do controle negativo ($0,84 \pm 0,002$), ($p < 0,05$). As demais concentrações de 25 µg/mL ($0,81 \pm 0,08$) e 50 µg/mL ($0,75 \pm 0,001$), não apresentaram valores estatisticamente significativos quando comparadas entre si e entre o controle negativo ($p > 0,05$). Ao passo que o gene *Bcl-2* foi igualmente expresso, nas concentrações de 25 µg/mL ($0,70 \pm 0,03$), 50 µg/mL

Figura 19: Fragmentação de DNA em gel de agarose 1,5%. Células HL-60 submetidas ao tratamento com BthTX-I, onde 1, 2 e 3 representam respectivamente, as concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL e controle de fragmentação DNA Ladder 100bp *Invitrogen*[®].

Figura 20: Fragmentação de DNA em gel de agarose a 1,5%: Células HepG2 submetidas ao tratamento com BthTX-I, onde 1, 2 e 3 representam respectivamente as concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL e controle de fragmentação DNA Ladder 100bp *Invitrogen*[®]. Bandas de fragmentação nítidas nas concentrações de 50 e 100 µg/mL.

Figura 21: Fragmentação de DNA em gel de agarose a 1,5%: Células B16F10 submetidas ao tratamento com BthTX-I, onde 1, 2 e 3 representam respectivamente, as concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL e controle de fragmentação DNA Ladder 100bp. *Invitrogen*[®].

Figura 22: Fragmentação de DNA em gel de agarose a 1,5%: Células PC-12 submetidas ao tratamento com BthTX-I, onde 1, 2 e 3 representam respectivamente as concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL e controle de fragmentação DNA Ladder 100bp *Invitrogen*[®].

($0,64 \pm 0,03$) e $100 \mu\text{g/mL}$ ($0,65 \pm 0,001$), pois os valores encontrados não apresentaram diferença estatística significativa, comparados ao controle negativo ($0,76 \pm 0,06$) e entre si, ($p > 0,5$), (Figura 23).

O gene *p53* na presença de BthTX-I manteve os níveis de expressão semelhantes aos níveis apresentados pelo controle negativo do experimento ($1,33 \pm 0,07$). Os valores observados foram de $1,30 \pm 0,001$, na concentração de $25 \mu\text{g/mL}$; $1,36 \pm 0,04$ para $50 \mu\text{g/mL}$ e $1,45 \pm 0,08$ na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$, valores sem diferença estatística significativa quando comparados entre si e ao controle negativo ($p > 0,05$), (Figura 23).

Nas concentrações de 25 , 50 e $100 \mu\text{g/mL}$ de BthTX-I, a linhagem HepG2, apresentou uma baixa expressão do gene *Bax* com os respectivos valores de $0,95 \pm 0,01$; $1,0 \pm 0,3$ e $0,95 \pm 0,001$. A concentração de $25 \mu\text{g/mL}$ apresentou valores estatisticamente significativos quando comparada ao controle negativo ($1,06 \pm 0,03$), ($p < 0,05$). Por outro lado às concentrações de 50 e $100 \mu\text{g/mL}$ não apresentaram diferença estatística significativa quando comparadas entre si e, entre $25 \mu\text{g/mL}$ e o controle negativo ($p > 0,05$). O gene *Bcl-2* foi pouco expresso nas concentrações avaliadas, tendo os valores de $0,71 \pm 0,01$; $0,75 \pm 0,003$ e $0,76 \pm 0,006$ respectivamente, nas concentrações de 25 , 50 e $100 \mu\text{g/mL}$. As concentrações de 50 e $100 \mu\text{g/mL}$ apresentaram diferenças estatísticas significativas entre o controle negativo ($0,92 \pm 0,01$) e a concentração de $25 \mu\text{g/mL}$ e a mesma apresenta valor estatisticamente significativo comparada ao controle negativo e as demais concentrações (Figura 24). O gene *p53* mostrou nas concentrações de $25 \mu\text{g/mL}$ ($0,63 \pm 0,004$), $50 \mu\text{g/mL}$ ($0,64 \pm 0,003$) e $100 \mu\text{g/mL}$ ($0,83 \pm 0,001$), ser mais expresso que o controle negativo ($0,60 \pm 0,009$). Todas as concentrações apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparadas ao controle negativo ($p < 0,05$). As concentrações de 50 e $100 \mu\text{g/mL}$ não apresentaram valores estatisticamente significativos comparados entre si, ($p > 0,05$), e a concentração de $25 \mu\text{g/mL}$ apresentou diferença estatística quando comparada com as demais concentrações ($p < 0,05$), (Figura 24).

Células PC-12 mostraram aumento nos níveis de *Bax* e *Bcl-2*. Todas as concentrações para o gene *Bax* apresentaram valores estatisticamente significativos comparados ao controle negativo ($0,48 \pm 0,03$), ($p < 0,5$). Os valores obtidos foram:

Figura 23: Genes *Bax*, *Bcl-2* e *p53* expressos na linhagem HL-60. Os gráficos representam valores da densidade relativa dos genes alvos amplificados em relação ao gene constitutivo. Letras iguais correspondem a valores sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Letras diferentes correspondem a valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Os resultados representam o valor da média $\pm$ desvio padrão para três experimentos independentes.

Figura 24: Genes *Bax*, *Bcl-2* e *p53* expressos na linhagem HepG2. Os gráficos representam valores da densidade relativa dos genes alvos amplificados em relação ao gene constitutivo. Letras iguais correspondem a valores sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Letras diferentes correspondem a valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Os resultados representam o valor da média $\pm$ desvio padrão para três experimentos independentes.

0,57±0,005 para 25 µg/mL; 0,66±0,001 para 50 µg/mL e 0,71±0,004 para a concentração de 100 µg/mL cujos valores, possuem diferenças estatisticamente significativas quando comparados entre si ($p<0,05$), (Figura 25).

A expressão do gene *Bcl-2* nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL, geraram os respectivos valores: 0,55±0,001; 0,63±0,003 e 0,68±0,001, que são estatisticamente significativos quando comparados entre si e ao controle negativo (0,40±0,01), ($p<0,05$).

Foi observado que os níveis dos genes *Bax* e *Bcl-2*, parecem ser expressos em quantidades semelhantes, (0,71 *Bax* e 0,68% *Bcl-2*), mas prevalecendo o gene próapoptótico *Bax*. Devido à semelhança nos valores de expressão dos genes antiapoptótico (*Bcl-2*) e próapoptótico (*Bax*), observou-se a baixa indução de apoptose (21,4%), pois ao mesmo tempo em que foi aumentada a expressão *Bax*, também foi aumentada a expressão de *Bcl-2*.

A figura 25 demonstra que os resultados de *p53* não apresentaram acréscimo ou decréscimo significativo na expressão desse gene. As concentrações de 25 µg/mL (0,79±0,06), 50 µg/mL (0,84±0,008) e 100 µg/mL (0,88±0,005) não possuem diferenças estatísticas significativas quando comparadas entre si e ao controle negativo (0,76±0,08).

Os valores expressos de *Bax* na linhagem B16F10 apresentaram aumento significativo na concentração de 100 µg/mL (1,04±0,001) e diferente estatisticamente do controle positivo (0,96±0,02) e das demais concentrações avaliadas ($p<0,05$). As concentrações de 25 e 50 µg/mL, com os respectivos valores de 0,95±0,01 e 0,94±0,03, não apresentaram diferenças estatísticas entre si e quando comparadas ao controle negativo ($p>0,05$), (Figura 26).

Houve menor expressão de *Bcl-2* nas amostras tratadas em relação ao controle negativo (0,91±0,007). Os valores das concentrações de 25 µg/mL (0,85±0,005), 50 µg/mL (0,82±0,001) e 100 µg/mL (0,78±0,006), possuem diferenças estatisticamente significativas quando comparadas entre si e ao controle negativo ($p<0,05$), (Figura 26). O gene *p53* não mostrou alteração expressiva, apenas valores aumentados, porém sem diferença estatística significativa comparada ao controle negativo ($p>0,05$). Os valores expressos nas concentrações de 25 µg/mL (1,4±0,06), 50 µg/mL (1,46±0,008) e 100 µg/mL (1,5±0,08), não

Figura 25: Genes *Bax*, *Bcl-2* e *p53* expressos na linhagem PC-12. Os gráficos representam valores da densidade relativa dos genes alvos amplificados em relação ao gene constitutivo. Letras iguais correspondem a valores sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Letras diferentes correspondem a valores estatisticamente significativos quando comparados entre si e ao controle negativo ($0,40 \pm 0,01$), ($p < 0,05$).

Figura 26: Genes Bax, Bcl-2 e p53 expressos na linhagem B16F10. Os gráficos representam valores da densidade relativa dos genes alvos amplificados em relação ao gene constitutivo. Letras iguais correspondem a valores sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Letras diferentes correspondem a valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Os resultados representam o valor da média $\pm$ desvio padrão para três experimentos independentes.

apresentaram valores estatisticamente significativos comparados entre si ($p>0,05$), (Figura 26).

A alta expressão de *Bax* e a baixa expressão de *Bcl-2* ajudam a reforçar o caráter apoptótico da miotoxina frente à linhagem B16F10, linhagem que resultou em melhores dados apoptóticos com o tratamento da toxina. Novamente o gene *p53* não foi alterado pela ação da toxina (Figura 26).

4.6 Análise das citocinas inflamatórias IL-8 e TNF- α

A indução da citocina inflamatória IL-8, apresentou resultados expressivos nas linhagens HepG2 (Fig. 27) e HL-60 (Fig. 28).

Na linhagem HepG2 a indução de IL-8 para as concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de BthTX-I, foram respectivamente, $47,87\pm2,68\%$; $81,15\pm1,16\%$; $158,22\pm56,94\%$; $436,33\pm25,38\%$ e $483,42\pm12,17\%$, ao passo que o controle negativo do experimento resultou em indução de $34,54\pm10,8\%$. Isto demonstra que as concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ tiveram valores estatisticamente significativos comparados ao controle negativo ($p<0,05$), enquanto que, as concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram valores estatisticamente significativos comparados ao controle ($p>0,05$). Também não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$; a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ apresentou diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre todas as concentrações avaliadas e 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ não possuem valores com diferença estatística significativa ($p>0,05$), como ilustrado na figura 27.

A linhagem HL-60 quando submetida ao tratamento com a toxina BthTX-I, apresentou indução de IL-8, nos seguintes valores: $367,46\pm2,92\%$; $421,62\pm6,16\%$; $440,98\pm11,24\%$; $452,5\pm28,72\%$ e $461,18\pm9,01\%$, para as respectivas concentrações 5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Todas as concentrações mostraram valores estatisticamente significativos ($p<0,05$), comparadas ao controle negativo do experimento ($216,34\pm2,92\%$), porém quando comparadas entre elas, não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$), conforme ilustrado na figura 28.

Os ensaios de indução de TNF- α , mostraram os seguintes valores para as concentrações avaliadas de BthTX-I, em células HepG2: $6,28\pm6,63\%$; $14,34\pm17,5\%$; $21,89\pm17,9\%$; $30,63\pm32,74\%$; $31,06\pm28,26\%$ e $162,24\pm2,92\%$, para respectivamente

Figura 27: Indução de citocina IL-8 em linhagem HepG2 na presença de BthTX-I. As concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL tiveram valores estatisticamente significativos comparados ao controle negativo ($p < 0,05$). As concentrações de 5 e 10 µg/mL não apresentaram valores estatisticamente significativos comparados ao controle ($p > 0,05$). Valores sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre 5 e 10 µg/mL. A concentração de 25 µg/mL apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre todas as concentrações avaliadas. As concentrações de 50 e 100 µg/mL não possuem valores com diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Letras iguais correspondem a valores sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Letras diferentes correspondem a valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Os resultados representam a média de 3 experimentos $\pm$ desvio padrão.

Figura 28: Indução de citocina IL-8 em linhagem HL-60 na presença de BthTX-I. Todas as concentrações tiveram valores estatisticamente significativos comparados ao controle negativo ($p < 0,05$) e não apresentaram valores estatisticamente significativos comparados entre si ($p > 0,05$). Letras iguais correspondem a valores sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Letras diferentes correspondem a valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Os resultados representam a média de 3 experimentos $\pm$ desvio padrão.

5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL de toxina. Somente a concentração de 100 µg/mL apresentou valores estatisticamente significativos, comparados ao controle negativo ($6,28 \pm 6,63\%$) e às demais concentrações. As demais concentrações não apresentaram valores estatisticamente significativos quando comparadas ao controle negativo e entre si (Figura 29).

A indução de TNF- α , pela linhagem HL-60 na presença de BthTX-I, mostrou um leve efeito dose-dependente, com o valor máximo de indução de $15,36 \pm 6,05\%$, na concentração de 100 µg/mL, enquanto que as concentrações de 25 e 50 µg/mL apresentaram $9,11 \pm 3,72\%$ e $8,61 \pm 4,31\%$, respectivamente. As concentrações de 5 e 10 µg/mL promoveram indução de $6,55 \pm 2,12\%$ e $7,13 \pm 6,72\%$ e o controle negativo do experimento apresentou indução de $3,34 \pm 3,08\%$. Os resultados não apresentaram valores estatisticamente significativos quando comparados ao controle negativo e entre as concentrações ($p > 0,05$), (Figura 30).

Figura 29: Indução de TNF- α em linhagem HepG2 após tratamento com BthTX-I. A concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ mostrou valores estatisticamente significativos comparados ao controle negativo e entre as demais concentrações ($p < 0,05$). As demais concentrações (5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$) não apresentaram valores estatisticamente significativos, quando comparados ao controle negativo e entre si. Letras iguais correspondem a valores sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Letras diferentes correspondem a valores estatisticamente $\mu\text{g/mL}$ significativos ($p < 0,05$). Os resultados representam a média de 3 experimentos $\pm$ desvio padrão.

Figura 30: Indução de TNF- α em linhagem HL-60 após tratamento com BthTX-I. Todas as concentrações apresentaram valores não estatisticamente significativos comparados entre si e ao controle negativo, ($p>0,05$).

Discussão

As PLA₂s de peçonhas de serpentes tem sido extensivamente estudadas por serem relativamente abundantes e em adição à sua atividade enzimática, apresentam uma ampla variedade de efeitos farmacológicos (SOARES et al., 2004a; TEIXEIRA et al., 2009; GALLACCI; CAVALCANTE, 2010).

A combinação de cromatografia de exclusão molecular e troca iônica mostraram-se eficientes para o isolamento e purificação de miotoxinas e PLA₂s da peçonha de *Bothrops jararacussu* (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; CINTRA et al., 1993).

No presente trabalho, para a obtenção da BthTX-I foi utilizada a metodologia descrita por Cintra et al. (1993) com a introdução de pequenas modificações. Uma destas modificações foi a substituição da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75 por Sephacryl S-200 (Fig. 6A), que permite uma melhor separação dos constituintes proteicos e menor interação destes com a resina. A segunda modificação foi a utilização de cromatografia de troca iônica em Resource Q em substituição à SP-Sephadex C-25, que é uma troca aniônica forte necessitando da utilização de tampão com alta força iônica, dificultando assim a retirada deste da proteína. Na cromatografia com Resource Q (Fig. 6C) utilizamos tampão bicarbonato de amônio, o mesmo utilizado na cromatografia de exclusão molecular, que por ser volátil é retirado com o processo de liofilização, não sendo necessário o uso de diálise ou filtração em *amicon* (*desalting*).

Segundo Harvey (1984), os tampões utilizados nas cromatografias líquidas têm por função prevenir a adsorção eletrostática ao gel de exclusão molecular e manter a integridade das proteínas. Portanto, é comum a utilização de tampões de 0,05 a 0,1M, que permitem a separação das toxinas por adsorção das cargas de uma ou mais proteínas na troca iônica, além de manter a estabilidade, conservar a atividade e estrutura das proteínas, não permitindo associações e/ou dissociações quando não forem necessárias, facilitando o próximo passo cromatográfico.

A cromatografia de fase reversa CLAE resultou na obtenção de uma proteína altamente pura, confirmando o grau de pureza desta enzima e sua identificação com a BthTX-I, o que foi confirmado também, pela SDS-PAGE (Fig. 6E).

O teste de citotoxicidade, consiste em quantificar as células viáveis, de modo a obter uma porcentagem das células que são fragilizadas com o tratamento da

proteína por meio do reagente de MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolio brometo), que reage com a mitocôndria da célula, formando um cristal de formazan, cristal esse solúvel em HCl-isopropanol 0,04N ou DMSO, de forma que uma vez solúvel é possível captar sua absorbância no espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm.

Os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade com linhagens celulares tumorais mostraram-se promissores quanto à atividade citotóxica frente às linhagens HL-60, HepG2, PC-12 e B16F10.

Nos ensaios a toxina BthTX-I, inibiu a viabilidade das células HL-60 em torno de 60% nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 µg/mL. Para a linhagem HepG2 a toxina reduziu a viabilidade em torno de 65% nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 µg/mL. Na linhagem PC-12, foi visível a redução da viabilidade celular (~45%), nas maiores concentrações (10, 25, 50 e 100 µg/mL) da toxina. As células B16F10 apresentaram um perfil interessante, uma vez que todas as concentrações se apresentaram mais citotóxicas que o controle positivo (Cisplatina), inviabilizando cerca de 70% das células.

Ao analisar somente a maior concentração administrada (100 µg/mL), a toxina mostrou-se ainda mais promissora, pois nessa concentração as porcentagens de viabilidade são baixas, na ordem de, 30,46%; 38,31%; 38,64% e 47,1%, valores respectivos para as linhagens HepG2, HL-60, B16F10 e PC-12. Os dados indicam que a BthTX-I, mostrou atividade ligeiramente preferencial para as células de origem tumoral humana em relação às murinas. A toxina agiu de forma menos efetiva frente à linhagem murina PC-12, atuando mais intensamente nas demais linhagens, demonstrando uma leve preferência para a linhagem HepG2, seguida de HL-60 e B16F10. Deve-se considerar ainda, que a concentração de Cisplatina[®] usada foi de 1mg/mL, portanto 10 vezes superior a maior concentração da toxina.

Corroborando com a atividade tóxica e eficiência da proteína BthTX-I, os estudos realizados por GEBRIM et al.(2009), mostraram que a miotoxina BthTX-I possui ação frente às linhagens B16F10, S180 e Jurkat, com potencial citotóxico em torno de 75-95%, demonstrando que a miotoxina, apesar de não possuir resíduos catalíticos em sua composição, tem ação citotóxica visível.

Essa diferença de ação da BthTX-I também foi demonstrada por GEBRIM e

colaboradores (2009) em linhagens SKBR-3 que apresentou uma citotoxicidade de aproximadamente 45% e, em torno de 85% em linhagens B16F10, Jurkat e S180, demonstrando que a toxina se apresenta mais efetiva para determinadas linhagens tumorais.

Os dados do presente projeto comparados aos dados apresentados pela miotoxina MjTX-II de *Bothrops moojeni*, nas maiores concentrações (50-100 µg/mL), apresentaram viabilidade celular de ~60% em linhagem Jurkat; ~35% em SKBR-3 e ~80% em EAT (tumor ascítico de Elrich), (STÁBELI et al., 2006), que confirma os dados de seletividade e especificidade para determinadas linhagens tumorais, variando de tumores sólidos e não sólidos. A toxina clonada de *Bothrops jararacussu*, uma fosfolipase sítio catalítica, BthA-I-PLA2, possui atividade citotóxica elevada em linhagens EAT e fraco potencial em linhagens Jurkat e SKBR-3 (ROBERTO et al., 2004). A SVT (snake venom toxin) isolada da *Vipera lebetina turanica*, demonstra a ação da toxina por linhagens diferentes, com ação citotóxica elevada em linhagens de câncer de próstata PC-3 e DU 145 e menos citotóxicas em neuroblastomas (SON et al., 2006).

Por outro lado, quando comparados com outras toxinas em relação à dose, é possível observar que algumas toxinas apresentam potencial citotóxico mais efetivo, como nos casos da LAAO de *Bothrops atrox* (BatroxLAAO) que apresenta citotoxicidade elevada em concentração de 50 µg/mL em HL-60, PC-12, B16F10 e Jurkat (ALVES et al., 2008), de drTX-I atividade com 6-15 µg/mL em U937 e K562 (GOMES et al., 2008) e de ACTX-6 que reduz a viabilidade da linhagem A549 de forma dose-dependente (10, 20, 30 e 40 µg/mL), (ZHANG; CUI, 2007). Citotoxinas 1 e 2 de *Naja oxiana* (CT1 e CT2), citotoxina de *Naja kaouthia* (CT3) e citotoxina *Naja haje* (CT1), exibem atividade citotóxica em linhagens A549 e HL-60 (FEOFANOV et al., 2005).

A fosfolipase ácida de *Macrovipera lebetina transmediterranea*, (MVL-PLA2) apresentou ação inibidora de adesão das linhagens IGR39 (melanoma humano) e HT1080 (fibrosarcoma humano) (BAZAA et al., 2009). As frações F3 e F4 de *Cerastes cerastes cerastes* mostraram ação citotóxica em linhagens tumorais EAT(tumor ascítico de Elrich) (ABU-SINNA et al., 2003).

Uma toxina homóloga da CX3 de *Naja kaouthia*, a RVV-7 isolada de *Daboia*

russelli russelli, também apresentou atividade tóxica sobre linhagens de melanoma murino B16F10 (~80%), como apresentado pela BthTX-I (MAITY et al., 2007).

Estudos sugerem que o mecanismo de ação das miotoxinas ocorre pela interação da região C-terminal da proteína com a membrana celular. A região C-terminal, é capaz de desorganizar a matriz polar (hidrofílica) da membrana, abrindo poros e permitindo a invasão da toxina para o meio intracelular. Há o fato de a BthTX-I ser uma miotoxina dimérica aumentando sua atuação danosa à membrana, pela afinidade das ligações divalentes, propondo a exposição da junção hidrofóbica da membrana celular (MONTECUCCO et al., 2008).

GEBRIM et al. (2009), mostraram a ação de um peptídeo sintetizado da região C-terminal da BthTX-I, denominado pep-BthTX-I, que promove citotoxicidade por volta de 50% nas linhagens SKBR-3, S180 e Jurkat confirmando que a região C-terminal atua na membrana da célula e que o potencial antitumoral da BthTX-I não é gerado somente pela sua região C-terminal, mas com ação conjunta entre a região C-terminal e o restante dos aminoácidos existentes na sua estrutura, assim sua ação citotóxica total é visível pela toxina completa.

Uma vez avaliado o nível de citotoxicidade, torna-se fundamental analisar o tipo de morte celular, e caso o processo seja apoptótico, as chances de a toxina ser um possível fármaco tende a aumentar.

Para avaliar a presença ou não de morte por apoptose primeiro foi realizado um teste qualitativo, pelo perfil eletroforético do DNA, no qual a presença de fragmentos (bandas) de DNA indica processo apoptótico, pois no final da via apoptótica (intrínseca ou extrínseca), ocorre ação das enzimas AIF (fator indutor de apoptose), CAD (DNase Capase-Ativado) e endonuclease G, que clivam o DNA cromossomal e devido à clivagem do DNA ocorre a presença dos fragmentos (ELMORE, 2007).

As linhagens HepG2, B16F10 e PC-12, tratadas com BthTX-I, posteriormente submetidas à eletroforese, mostraram que na menor concentração (25 µg/mL), não foi possível observar fragmentação do conteúdo de DNA, ao passo que nas maiores concentrações (50 e 100 µg/mL) foram observadas bandas características de apoptose. A linhagem HL-60 apresentou fragmentação do DNA em todas as concentrações avaliadas. Esse método, no entanto, não revela qual linhagem dentre

as citadas acima, possui mais células em apoptose, apenas sugere que ocorreu o processo de apoptose quando tratadas com BthTX-I.

Outras toxinas de serpentes mostraram o mesmo perfil de fragmentação do DNA como no caso da LAAO, ACTX-8, toxina isolada de *Agkistrodon acutus*, em linhagens HeLa (adenocarcinoma cervical humano), (ZHANG; WEI, 2007). A LAAO de *Agkistrodon contortrix* promoveu fragmentação de DNA em linhagens tumorais HL-60 (SOUZA et al., 1999). A linhagem HeLa ao ser tratada com LAAO de *Vipera berus berus* observou-se fragmentação do DNA (SAMEL et al., 2006). YANG e colaboradores (2005) mostraram que a CTX-III gerou fragmentação do DNA, em linhagens leucêmicas K562, fragmentação essa sugestiva de processo apoptótico.

Uma vez feito o ensaio qualitativo de morte celular, o ensaio quantitativo foi o passo seguinte, a fim de mensurar a porcentagem de células que morrem por apoptose em cada linhagem.

Os resultados obtidos também se mostraram promissores, principalmente nas linhagens B16F10, HepG2 e PC-12. A linhagem B16F10 apresentou na concentração de 25 µg/mL (40,92%), porcentual apoptótico semelhante ao controle positivo (40,40%), indicando que a BthTX-I induz praticamente o mesmo porcentual de apoptose que o agente citotóxico comercial, Cisplatina®. Ao aumentar a concentração da toxina observou-se uma menor porcentagem de células em apoptose (35,03%).

Células HepG2 apresentaram o mesmo perfil de porcentual apoptótico que a linhagem B16F10, no qual a concentração de 25 µg/mL apresentou 44,53% de células em apoptose, valor esse próximo aos 52,2% de apoptose do controle positivo Cisplatina®. Nessa linhagem também foi observado que o aumento da concentração de toxina promoveu diminuição dos níveis de apoptose, (34,36%, 50 µg/mL e 27,9%, 100 µg/mL).

A linhagem de feocromocitoma, PC-12, apresentou perfil inverso às linhagens B16F10 e HepG2, pois na concentração de 25 µg/mL apresentou valor de 14,75% de apoptose e na concentração de 100 µg/mL, apresentou valor de 21,4%. Todavia os porcentuais apoptóticos foram muito baixos em relação ao controle positivo Cisplatina®, que apresentou 87,2% de apoptose. Como o porcentual de apoptose cresce à medida que a concentração aumenta, podemos inferir que se a

concentração aumentar os valores de apoptose também aumentarão.

As células leucêmicas, HL-60, apresentaram baixa apoptose, com o máximo de 2,03% na maior concentração (100 µg/mL). Neste experimento, prevaleceu a apoptose, seguida de necrose (PI+/AV+), que pode ter sido desencadeada por um estímulo muito severo, no qual a célula entrou em apoptose, mas devido ao estímulo excessivo resultou numa necrose. As concentrações avaliadas da BthTX-I frente a essa linhagem não promoveram valores satisfatórios de apoptose.

Diante do exposto a BthTX-I, mostrou-se efetiva frente às linhagens B16F10 e HepG2, ao passo que mostrou-se menos efetiva em relação ao porcentual de apoptose na linhagem PC-12 e por último em linhagem HL-60. A toxina não demonstrou nesse experimento, preferência por linhagens humanas ou murinas, uma vez que os melhores resultados foram em linhagens B16F10 e HepG2.

Diferentes toxinas exibem o comportamento de morte celular por apoptose, no qual temos, a SVT (*snake venom toxin*) isolada de *Vipera labetina turanica*, que promove apoptose em cerca de 100% em linhagem PC-3 (tumor prostático humano), (SON et al., 2007) e induz também, apoptose em linhagens de neuroblastoma, SK-N-MC (~20%) e SK-N-SH (~30%), (PARK et al., 2009).

CHEN e colaboradores apresentaram estudos com linhagem PC-3 tratadas com a CTX-III (cardiotoxina 3), isolada de *Naja naja atra* e demonstraram que mais de 60% das células sofrem o processo de apoptose (CHEN et al., 2007) e a CTX-III (citotoxina 3) induz apoptose em linhagem HepG2 (CHEN et al., 2009). A cardiotoxina-citotóxica, NK-CT1, isolada de *Naja kaouthia*, induz tanto apoptose (19,41% e 32,43%), quanto células PI+/AV+ (incorporação de anexina V e iodeto de propídeo), (25,72% e 21,56%), em linhagens U937 e K562, (DEBNATH et al., 2010). Gomes e colaboradores (2007) mostraram a ação indutora de apoptose da drCT-I, isolada de *Daboia russeli russeli*, em linhagens U937 (21,62%) e K562 (36,52%).

A ACTX-8, uma L-amino ácido oxidase, isolada da toxina de *Agkistrodon acutus*, induziu cerca de 60% de apoptose em linhagem HeLa (adenocarcinoma cervical humano), (ZHANG; WEI, 2007), outra LAAO, ACTX-6, isolada de *Agkistrodon acutus* induziu cerca de 26% de apoptose em células A549 (tumor pulmonar), (ZHANG; CUI, 2007).

O processo apoptótico está ligado à expressão de genes apoptóticos da

família *Bcl-2*, no qual os mais comumente conhecidos e analisados são os genes *Bax* e *Bcl-2* (ASHE; BARRY, 2003).

A toxina BthTX-I demonstrou alterar o equilíbrio na expressão desses genes, uma vez que o equilíbrio é quebrado, mais células sobrevivem ou morrem. Para as linhagens tumorais torna-se interessante, que toxinas induzam a maior expressão de genes próapoptóticos do que antiapoptóticos. A BthTX-I promoveu alterações observáveis no níveis de *Bax* e *Bcl-2* nas linhagens HL-60, HepG2, PC-12 e B16F10.

Ao comparar os resultados das diferentes linhagens observou-se que em relação ao gene *Bax*, as linhagens que apresentaram maior expressão foram HL-60, PC-12 e B16F10. Para o gene *Bcl-2* houve menor expressão na linhagem HepG2 e B16F10 enquanto que, a linhagem HL-60 não apresentou alteração.

Na linhagem PC-12 houve aumento na expressão de *Bcl-2*, com tudo a expressão de *Bax* (0,71) foi maior que a expressão de *Bcl-2* (0,68).

Os níveis de *p53* expressos apresentaram valores semelhantes ao controle negativo nas linhagens HL-60, PC-12 e B16F10, somente em HepG2 (0,83), esse valor foi maior que o controle (0,60).

Mesmo com a baixa expressão de *p53*, foi observado que as alterações na expressão dos genes *Bax* e *Bcl-2* ocorreram, sendo essas alterações resultantes do processo de morte celular das linhagens.

Alterações na expressão de genes apoptóticos são observadas em diversas toxinas como no caso da PLA₂ de *Taiwan cobra* que induz o aumento de *Bax* e o decréscimo de *Bcl-2* em leucemia K-562 (CHEN et al., 2010). A fosfolipase A₂ de *Naja nigricollis* promove apenas redução na expressão de *Bcl-2*, mantendo os níveis de *Bax* inalterados, na linhagem leucêmica K-562 (CHEN et al., 2010).

A CTX III, uma cardiotoxina isolada da peçonha de *Taiwan cobra*, também aumenta os níveis de *Bax* e reduz os níveis de *Bcl-2*, induzindo apoptose em células de sarcoma murino (Ca9-22), (CHIEN et al., 2010). A citotoxina III (CTX-III), isolada da peçonha de *Naja naja atra*, promove apoptose em células HepG2 pela maior expressão de *Bax* em relação a *Bcl-2* (CHEN et al., 2009). CTX-III (cardiotoxina III) isolada de *Naja naja atra*, através da expressão maior de *Bax* em relação a *Bcl-2* promoveu apoptose em células leucêmicas HL-60 (CHIEN et al., 2008).

A SVT (snake venom toxin) isolada da peçonha *Vipera labetina turanica*, apresentou balanço positivo para o gene *Bax*, proporcionalmente um balanço negativo para *Bcl-2*, culminado em apoptose em células tumorais de ovário PA-1 e SK-OV3 (SONG et al., 2012).

Com base nesses dados podemos sugerir que as toxinas promovem alterações na expressão de genes ligados a apoptose, alterando ambos os genes pró e antiapoptóticos ou alternando entre a expressão de somente um gene.

A análise da literatura demonstra que são escassos os estudos sobre miotoxinas envolvendo sua atuação na cinética do ciclo celular. No entanto, dentre as toxinas estudadas, algumas exibem atividade supressora do ciclo celular em determinadas fases, em linhagens celulares tumorais.

A BthTX-I mostrou perfis de atuação diferentes entre as linhagens estudadas no presente projeto. Os resultados mostram atividade supressora em diferentes fases do ciclo sendo que, na linhagem tumoral HL-60 exibiu atividade supressora do ciclo em G2/M. Na linhagem HepG2 exibiu atividade supressora na fase S e atraso na fase G0/G1 enquanto que, nas linhagens B16F10 e PC-12 exibiu ausência de células na fase G2/M, demonstrando assim, que a toxina impede a passagem de células com DNA lesado de uma fase a outra, ou diminui a quantidade de células de uma determinada fase.

O fato de a BthTX-I promover o atraso do ciclo, indica que ela interrompe a progressão da intérfase para mitose portanto, menor número de células serão duplicadas, o que significa que, em um novo ciclo as células restantes também ficarão “atrasadas”, menor número de células serão novamente duplicadas, permitindo assim, uma terapia mais efetiva por se ter menor número de células no organismo. O atraso do ciclo significa dano ao material genético (DNA), que por sua vez, será avaliado e entrará em processo de reparo. Caso não seja possível o reparo do material genético, as células serão então, enviadas ao processo de morte celular programada.

Alves-Paiva e colaboradores (2011) descreveram a ação supressora da BatroxLAAO no ciclo celular em linhagem HL-60, revelando ser supressora da fase G0/G1. O estudo da NK-CT1, cardiotoxina-citotóxica, isolada da peçonha de *Naja kaouthia*, apresenta atraso no ciclo celular na fase sub-G1 em linhagens U937 e

K562 (DEBNATH et al., 2010). A CTX-III (citotoxina de *Naja naja atra*) frente às linhagens tumorais HepG2 mostrou ação supressora na fase S, que coincide com os dados obtidos pela BthTX-I que levou ao atraso da mesma linhagem na fase S (CHEN et al., 2009).

A toxina de *Naja naja atra* denominada CTX III (cardiotoxina) apresenta ação supressora da fase S em células de sarcoma murina (Ca9-22)(CHIEN et al., 2010). Células U937 e K562 expressam o mesmo perfil de atraso em G1 e diminuição de células na fase G2/M quando tratadas com *dr*CT-I isolada da víbora indiana *Daboia russelli russelli* (GOMES et al., 2007).

Outro estudo demonstra que a fração SVT (snake venom toxin), isolada de *Vipera labetina turanica*, tem o perfil de suspender o ciclo na fase G0/G1 de células tumorais prostáticas PC-3 de forma dose-dependente (0,025-2µg/mL) e com diminuição de células nas fases S e G2/M (SON et al., 2007).

O gene *p53* analisado, tem relação com a cinética do ciclo celular e foi observado no estudo que pequenas variações no gene, mesmo que sutis, foram capazes de alterar a cinética celular das linhagens HepG2, HL-60, PC-12 e B16F10.

Com base na literatura pode-se sugerir que as toxinas animais atuam em diferentes fases do ciclo celular em linhagens celulares tumorais e promove atrasos em qualquer fase do ciclo, seja ela G0/G1, S e G2/M.

O acidente pelo gênero *Bothrops*, leva ao quadro de inflamação aguda, processo causado pelas frações proteolíticas e fosfolipases contidas no veneno e caracteriza-se clinicamente, por edema e dor na região da picada (LOMONTE et al., 1990; SELISTRE et al, 1990).

Além da miotoxicidade as fosfolipases Lys49, a exemplo da BthTX-I, mostraram provocar distintos eventos inflamatórios em modelos experimentais, sendo a inflamação local, uma característica proeminente dos envenenamentos ofídicos pela família Viperidae (TEIXEIRA et a., 2003).

Os resultados observados na indução de IL-8 foram promissores, uma vez que a IL-8 teve seus níveis aumentados na linhagem HepG2, (CN-34,54, 100 µg/mL-483,33%), e na linhagem HL-60 (CN-216,34%, 100 µg/mL-461,18%). Essa indução pode sugerir que a BthTX-I, estimule a quimiotaxia das células de defesa, para o local acometido, fazendo com que as células tumorais sejam fagocitadas depois da

morte.

A indução de TNF- α foi satisfatória somente na linhagem HepG2 (CN-6,28%, 100 μ g/mL-162,24%), indicando que as células liberaram essa citocina, porém os resultados obtidos com a linhagem HL-60, (CN-3,34%, 100 μ g/mL-15,36%), apesar da diferença aparente, a análise estatística mostrou que não houve diferença estatística. Porém os dados obtidos, são de grande valia, para a melhor compreensão do processo de morte celular e indução de citocinas pela BthTX-I.

Peçonhas de serpentes de modo geral atuam sobre agentes da inflamação como TNF- α , IL-8, IL-6, IL-12 entre outros, como a peçonha de *Bothrops asper* e *Bothrops jararaca*. As miotoxinas são frações com atividades ainda pouco estudadas, de modo que experimentos relacionados ao caráter inflamatório ainda necessitam de estudos. A BnSP-7, uma miotoxina isolada da peçonha de *Bothrops (neuwiedii) pauloensis*, quando administrada ao músculo gastrocnêmico, promoveu liberação de citocinas IL-8 (6000pg/mL), (OLIVEIRA et al., 2009).

Uma fosfolipase ácida de *Crotalus durissus terrificus* apresentou liberação de TNF- α no plasma (~4 pg/mL), o que sugere estar associada com a liberação de TNF- α por células de fibrosarcoma murino, L929 (CHISARI et al., 1998). A fosfolipase isolada de *Bothrops leucurus* (BI-PLA₂) apresentou liberação de IL-8 e TNF- α , ambas com valores próximos à 200pg/mL para 10 μ g/mL de toxina, em células mononucleares sanguíneas (NUNES et al., 2011).

É sabido também que algumas toxinas isoladas atuam no processo inflamatório, culminando em liberação de IL-8, recrutamento de células de defesa ou não. A Jararagina, uma metaloprotease de *Bothrops jararaca*, apresentou níveis altos de IL-8 e TNF- α (GALLAGHER et al., 2005; ARRUDA et al., 2003). Gallagher e colaboradores (2003) mostraram a ação da peçonha de *Crotalus atrox* e *Bothrops jararaca* na liberação de IL-8 e TNF- α .

Os estudos realizados por Coelho e colaboradores (2004) mostraram indução de IL-8 pela Jarastatina, uma desintegrina isolada de *Bothrops jararaca*, que promoveu quimiotaxia e migração de células polimorfonucleares (35 neutrófilos/campo).

Assim certos componentes das peçonhas de serpentes desempenham papel importante no aumento ou decréscimo nos níveis de uma ampla variedade de

fatores associados com o processo inflamatório incluindo IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-8, IL-12, IFN- γ , NO, TNF- α , dentre outros. Estes fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios podem contribuir para o recrutamento de leucócitos, quimiotaxia e indução de morte celular (CHISARI et al., 1998; ARRUDA et al., 2003; GALLAGHER et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2009).

O TNF- α , uma vez liberado, conduz ao processo de morte celular, atuando como iniciador de apoptose, disparando a cascata de apoptose que culmina com a ativação das caspases efetoras (SHRMA; ANKER, 2002).

A toxina BthTX-I mostrou ser uma possível candidata para a terapia antitumoral, com atividade citotóxica elevada para as linhagens avaliadas. A ação da toxina nas linhagens B16F10 e HepG2 mostrou valores promissores do ponto de vista de citotoxicidade e indução de morte, resultando em morte celular e promoção de apoptose elevada nas concentrações avaliadas. Em seguida as melhores candidatas são as linhagem PC-12 e a linhagem HL-60, sendo essa ultima mesmo com o perfil de morte celular elevado, o tipo de morte não foi satisfatório, com níveis altos de morte necrótica e/ou PI+/AV+.

A alta indução de citocina IL-8 nas linhagens HL-60 e HepG2 sugerem quimiotaxia ou migração celular. Para confirmar esta teoria será necessário a realização de ensaios de migração ou equivalente. Já a indução de TNF- α , revelou valores elevados na linhagem HepG2 (162,24 pg/mL), os quais sugerem maior porcentagem de morte celular nessa linhagem do que na linhagem HL60 (15,36 pg/mL).

É importante salientar que estudos relacionados ao caráter apoptótico, indução de citocinas, expressão de genes responsáveis pela morte celular e atuação na cinética celular envolvendo miotoxinas ainda são escassos, necessitando de experimentos mais direcionados ao mecanismo de ação dessa classe de toxinas. Esses resultados ajudarão a compreender a atuação da toxina frente à terapia antitumoral.

Conclusão

A toxina BthTX-I demonstrou potencial antitumoral apresentando média de citotoxicidade de: 52, 63, 62 e 53% para as linhagens HL-60, B16F10, HepG2 e PC-12, respectivamente.

Analisando a maior concentração avaliada (100 µg/mL), a BthTX-I apresentou alta citotoxicidade: 69,54% para a linhagem HepG2; 61,69% para a linhagem HL-60; 61,36% para a linhagem B16F10 e 52,9% em células PC-12. Estes valores são expressivos considerando que o controle positivo do experimento foi 1mg/mL de Cisplatina (10 vezes maior que a concentração máxima utilizada pela BthTX-I), no qual resultou nos seguintes valores de citotoxicidade: 84,64%; 83,94%; 51,43% e 79,81%, para HepG2, HL-60, B16F10 e PC-12, respectivamente.

A toxina não demonstrou preferência por linhagens tumorais humanas (HL-60 e HepG2) ou murinas (PC-12 e B16F10), pois apresentou valores de citotoxicidade acima de 50% para todas as linhagens do estudo. No entanto, é importante ressaltar que foi altamente citotóxica para a linhagem B16F10, sendo mais citotóxica (61,36%) que a Cisplatina (51,43%) mesmo numa concentração 10 vezes menor que o padrão.

O ensaio qualitativo de apoptose, por fragmentação do conteúdo de DNA, demonstrou presença de morte por apoptose em todas as linhagens, depois confirmada pelo ensaio quantitativo por citometria de fluxo.

A citometria de fluxo revelou que a linhagem HL-60 possui baixíssimo percentual de apoptose, (2,03%), com predominância de PI+/AV+, (20,83%), demonstrando que a linhagem foi muito sensível à toxina. As células HepG2, demonstraram resultados satisfatórios com 44,53% de apoptose. A linhagem PC-12 apresentou baixa apoptose, (21,40%), porém quando a concentração foi aumentada, observou-se redução de células em necrose e PI+/AV+. Células B16F10 apresentaram apoptose de 40,92% e com o aumento da concentração houve redução de cerca de 5% do percentual apoptótico e com percentual de necrose e PI+/AV+ sempre baixo, cerca de 7% de necrose e 8% de PI+/AV+.

A miotoxina apresentou ação direta na expressão dos genes *Bax* e *Bcl-2*, podendo alterar a expressão dos dois genes no caso das linhagens B16F10, (aumento de *Bax* e diminuição de *Bcl-2*) e PC-12 (aumento de *Bax* e *Bcl-2*, prevalecendo aumento de *Bax*) ou somente elevar ou reduzir a expressão de um

deles, como visto nas linhagens HL-60 (com os níveis elevados de *Bax* e inalterados de *Bcl-2*) e HepG2 (redução do gene *Bcl-2*). O gene *p53* demonstrou menor sensibilidade à ação da toxina, pois somente a linhagem HepG2 apresentou alteração significativa na expressão do gene *p53*, sendo que nas demais linhagens ocorreu aumento sem significância na expressão de *p53*.

Mesmo com valores baixos de expressão de *p53*, este atuou interferindo no ciclo, pois *p53* atua de forma crítica na cinética celular. Devido a essa atuação a BthTX-I apresentou ação moduladora do ciclo celular nas linhagens avaliadas: HL-60 (atraso em G2/M), HepG2 (atraso na fase S), B16F20 (atraso em G0/G1 e sem a presença de G2/M) e atraso em G0/G1 na linhagem PC-12 demonstrando portanto, ser um agente modulador da cinética do ciclo celular de linhagens tumorais.

Os dados de IL-8 e TNF- α , sugerem uma quimiotaxia por parte de IL-8, porém não se pode confirmar se há quimiotaxia ou migração sem a realização de um experimento específico para esta finalidade. Por outro lado, os valores de TNF- α , corroboram com a morte celular uma vez que, esta citocina quando liberada torna-se responsável pelo processo de morte celular.

Os resultados mostram que a BthTX-I, miotoxina isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*, possui ação citotóxica frente a diferentes tipos de linhagens tumorais, induz apoptose e liberação de citocinas IL-8 e TNF- α ; altera a expressão de genes responsáveis pela morte celular e modulação da cinética celular.

Diante dos dados obtidos ficou evidenciado o potencial antitumoral da BThTX-I levando a busca de outros mecanismos de atuação da toxina, abrindo perspectivas de sua aplicação biotecnológica para a produção de novo fármaco anticancerígeno e tornando-se uma terapia alternativa a essa enfermidade.

*Referências
Bibliográficas*

- ABBAS, A. K., LICHTMAM, A. H. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. *Saunders*, Second Edition, pg97-225, 2004.
- ABE, A., SHAYMAN, J. A. Purification and characterization of 1-Oacylceramide synthase, a novel phospholipase A2 with transacylase activity, *J. Biol. Chem.* 273: 8467–8474, 1998.
- ABREU, V. A., DAL BELO, C. A., HERNANDES-OLIVEIRA, S. S., BORJA-OLIVEIRA, C. R., HYSLOP, S., FURTADO, M. DE F., RODRIGUES-SIMIONI, L. Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. diporus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 148(1):142-9, 2007.
- ABU-SINNA G, ESMAT AY, AL-ZAHABY AA, SOLIMAN NA, IBRAHIM TM. Fractionation and characterization of *Cerastes cerastes cerastes* snake venom and the antitumor action of its lethal and non-lethal fractions. *Toxicon*. 42(2):207-15, 2003.
- AHN, M. Y., LEE, B. M., KIM, Y. S. Characterization and Cytotoxicity of L-Amino Acid Oxidase from the Venom of King Cobra (*Ophiopkagus hannah*). *Int. J. Biochem. Cell Bid.* 29(6): 911-919, 1997.
- ALVES, R. M., ANTONUCCI, G. A., PAIVA, H. H., CINTRA, A. C., FRANCO, J. J., MENDONÇA-FRANQUEIRO, E. P., DORTA D. J., GIGLIO, J. R., ROSA, J. C., FULY, A. L., DIAS-BARUFFI, M., SOARES, A. M., SAMPAIO, S. V. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 151(4):542-50, 2008.
- ALVES-PAIVA, R. M., de FREITAS FIGUEIREDO, R., ANTONUCCI, G.A., PAIVA, H. H., DE LOURDES PIRES BIANCHI, M., RODRIGUES, K.C., LUCARINI, R., CAETANO, R. C., LINHARI RODRIGUES PIETRO, R. C., GOMES MARTINS, C. H., DE ALBUQUERQUE, S., SAMPAIO, S. V. Cell cycle arrest evidence,

parasitocidal and bactericidal properties induced by l-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. *Biochimie*. 93(5):941-7, 2011.

- AMARAL, C. F., DA SILVA, O. A., GOODY, P., MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. *Toxicon*, 23(6):877-85, 1985.
- AMININASAB, M., ELMI, M. M., ENDLICH, N., ENDLICH, K., PAREKH, N., NADERI-MANESH, H., SCHALLER, J., MOSTAFAVI, H., SATTLER, M., SARBOLOUKI, M. N., MUHLE-GOLL, C. Functional and structural characterization of a novel member of the natriuretic family of peptides from the venom of *Pseudocerastes persicus*. *FEBS Lett*, 16;557(1-3):104-8, 2004.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H., SOARES, A. M., RODRIGUES, V. M., ÂNGULO, Y., DÍAZ, C., LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J. M., GIGLIO, J. R. Cytotoxic phospholipases A(2) in bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie*, 82(8):755-63, 2000.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H., SOARES, A. M., FONTES, M. R., FULY, A. L., CORRÊA, F. M., ROSA, J. C., GREENE, L. J., GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A(2) from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochem Pharmacol*, 15;64(4):723-32, 2002.
- AOKI, J., NAGAI, Y., HOSONO, H., INOUE, K., ARAI, H. Structure and function of phosphatidylserine-specific phospholipase A₁. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1582: 26-32, 2002.
- ARNI, R.K., WARD, R.J. Phospholipase A2 - An estructural review. *Toxicon* 34: 827-841, 1996. ASHKENAZI, A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer*, 2(6): 420-430, 2002.

- BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. *J. Intern. Med.* 250(2):91-104, 2002.
- BALDUINO, K. N., SPENCER, P. J., MALAVASI, N. V., CHURA-CHAMBI, R. M., LEMKE, L. S., MORGANTI, L. Refolding by high pressure of a toxin containing seven disulfide bonds: bothropstoxin-1 from *Bothrops jararacussu*. *Mol Biotechnol.* 48(3):228-34, 2011.
- BARRAVIERA, B. Venenos Animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro: EPUB, cap.63, p.205-223, 1994.
- BARRAVIERA B. Ofídios: estudos clínicos dos acidentes. EPUB, Petrópolis. 411p, 1999.
- BAUD, V., KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 11: 372–377, 2001.
- BAZAA. A., LUIS J., SRAIRI-ABID, N., KALLECH-ZIRI, O., KESSENTINI-ZOUARI, R., DEFILLES, C., LISSITZKY, J. C., EL AYEB, M., MARRAKCHI, N. MVL-PLA2, a phospholipase A2 from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits tumor cells adhesion and migration. *Matrix Biol.* 28(4):188-93, 2009.
- BEHM, B. W., BICKSTON, S. J. Tumor necrosis factor-alpha antibody for maintenance of remission in Crohn's disease. *Tumor Necrosis Factor-Alpha Antibody for Maintenance of Remission in Crohn's Disease, Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 1, 2008.
- BÉRNILS, R. S. Brazilian reptiles – List of species. Disponível em <<http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/repteis.htm>>. Acessado em 03/07/2011.
- BHATTACHARYYA, S., DUDEJA, P. K., AND JOANNE K. TOBACMAN. Tumor Necrosis Factor alpha, induced Inflammation Is Increased but Apoptosis Is

Inhibited by Common Food Additive Carrageenan Received for publication, *J. Biol. Chem.* 285(50):39511-22, 2010,a .

- BHATTACHARYYA, S., LIU, H., ZHANG, Z., JAM, M., DUDEJA, P. K., MICHEL, G., LINHARDT, R. J., TOBACMAN, J. K. Carrageenan-induced innate immune response is modified by enzymes that hydrolyze distinct galactosidic bonds. *J. Nutr. Biochem.* 21: 906–913, 2010,b.
- BONFIM, V. L., CARVALHO, D. D., PONCE-SOTO L. A., KASSAB, B. H., MARANGONI, S. Toxicity of phospholipases A2 D49 (6-1 and 6-2) and K49v(Bj-VII) from *Bothrops jararacussu* venom. *Cell Biol Toxicol*, 25:523–532, 2009.
- BRANZEI, D., FOIANI, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9. 297 – 308, 2008.
- BURKE, J. E., DENNIS, E. A., (2009) Phospholipase A2 Biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther*, 23: 49-59, 2009.
- CALVETE, J. J., SANZ, L., ÂNGULO, Y., LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J. M. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Lett*, 583:1736-43, 2009.
- CARDOSO, J. L. C. Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes, São Paulo: SARVIER, 2003.
- CARNEIRO A. S., RIBEIRO, O. G., CABRERA, W. H., VORRARO, F., DE FRANCO, M., IBAÑEZ, O. M., STAROBINAS, N. *Bothrops jararaca* venom (BjV) induces differential leukocyte accumulation in mice genetically selected for acute inflammatory reaction: the role of host genetic background on expression of adhesion molecules and release of endogenous mediators. *Toxicon*. 52(5):619-27, 2008.
- CARNEIRO, A. S., RIBEIRO, O. G., DE FRANCO, M., CABRERA, W. H., VORRARO, F., SIQUEIRA, M., IBAÑEZ, O. M., STAROBINAS, N. Local

inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxicon*. 40(11):1571-9, 2002.

- CAVALCANTE WL, SILVA MD, GALLACCI M. Influence of temperature upon paralyzing and myotoxic effects of bothropstoxin-I on mouse neuromuscular preparations. *Chem Biol Interact*. 15;151(2):95-100, 2005.
- CHEN, K. C., CHIOU, Y. L., KAO, P. H., LIN, S. R., CHANG, L. S. Taiwan cobra cardiotoxins induce apoptotic death of humanneuroblastoma SK-N-SH cells mediated by reactive oxygen species generation and mitochondrial depolarization. *Toxicon*. 51(4):624-34, 2008
- CHEN, K. C., KAO, P. H., LIN, S. R., CHANG, L. S. The mechanism of cytotoxicity by *Naja naja atra* cardiotoxin 3 is physically distant from its membrane-damaging effect. *Toxicon*. 50(6): 816-824, 2007.
- CHEN, S. C. A., WRIGHT, L. C., GOLDIND, J. C., SORREL, T. C. Purification and characterization of secretory phospholipase B, lysophospholipase and lysophospholipase/transacylase from a virulent strain of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *The Biochemical journal*, 347: 431-439, 2000
- CHEN, X., LV, P., LIU, J., XU, K. Apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell (HepG2) induced by cardiotoxin III through S-phase arrest. *Exp. Toxicol. Pathol*. 61(4):307-15, 2009.
- CHIEN, C. M., CHANG S. Y., LIN K. L., CHIU C. C., CHANG L. S., LIN S. R. *Taiwan cobra* cardiotoxin III inhibits Src kinase leading to apoptosis and cell cycle arrest of oral squamous cell carcinoma Ca9-22 cells. *Toxicon*, 56(4):508-20, 2010.
- CHIPPAUX, J-P., WILLIAMS, V., WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 29:1279-303, 1991.
- CHIOATO, L., ARAGÃO, E. A., LOPES FERREIRA, T., MEDEIROS, A. I., FACCIOLI, L. H., WARD, R. J. Mapping of the structural determinants of artificial

and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A2 by scanning alanine mutagenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1768(5): 1247-1257, 2007.

- CINTRA A. C., MARANGONI S., OLIVEIRA B., GIGLIO J.R. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. *J Protein Chem.* Feb;12(1):57-64, 1993.
- CINTRA-FRANCISCHINELLI, M., PIZZO, P., ANGULO, Y., GUTIÉRREZ, J. M., MONTECUCCO, C., LOMONTE, B. The C-terminal region of a Lys49 myotoxin mediates Ca²⁺ influx in C2C12 myotubes. *Toxicon.* 55(2-3):590-6, 2010.
- COGO, J. C., LILLA, S., SOUZA, G. H., HYSLOP, S., DE NUCCI, G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A2 from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). *Biochimie*, 88(12):1947-59, 2006.
- CORREA, M. C. Jr., MARIA, D. A., MOURA-DA-SILVA, A. M., PIZZOCARO, K. F., RUIZ I. R. Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. *Toxicon.* 40(6):739-48, 2002.
- DE OLIVEIRA, A. H., FERREIRA, T. L., WARD, R. J. Reduced pH induces an inactive non-native conformation of the monomeric bothropstoxin-I (Lys49-PLA2). *Toxicon.* 1;54(3):373-8, 2009.
- DE PASQUALE, A. Pharmacognosy: The oldest modern science. *Journal of Ethnopharmacology*, 11: 1- 16, 1984.
- DEBNATH, A., SAHA, A., GOMES, A., BISWAS, S., CHAKRABARTI, .P, GIRI, B., BISWAS, A. K., GUPTA, S. D., GOMES, A. A lethal cardiotoxic-cytotoxic protein from the Indian monocellate cobra (*Naja kaouthia*) venom. *Toxicon.* 56(4):569-79, 2010.
- da SILVA GIOTTO, M. T., GARRATT, R. C., OLIVA, G. , MASCARENHAS, Y. P., GIGLIO, J. R., CINTRA, A. C., DE AZEVEDO, W. F. JR., ARNI, R. K., WARD, R. J. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge:

conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A2 homologue. *Proteins*. 1;30(4):442-54, 1998.

- DOS SANTOS, J. I., TAKEDA, A. A., MARCHI-SALVADOR, D. P., SOARES, A. M., FONTES, M. R. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of two myotoxic Lys49-phospholipases A2 complexed with alpha-tocopherol. *Protein Pept Lett*. 12(8):819-22, 2005.
- DOUGLAS, R. M., HADDAD, G. G. Invited Review: Effect of oxygen deprivation on cell cycle activity: a profile of delay and arrest. *J. Appl Physiol*, 94: 2086-2083, 2003.
- ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35:495–516, 2007
- FEGHALI, C. A., WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front. Biosci*. 1;2:d12-26, 1997.
- FEOFANOV, A. V., SHARONOV, G. V., ASTAPOVA, M. V., RODIONOV, D. I., UTKIN, Y. N., ARSENIIEV, A. S. Cancer cell injury by cytotoxins from cobra venom is mediated through lysosomal damage. *Biochem J*. 15;390(Pt 1):11-8, 2005.
- FERREIRA, A. B. H. Novo Dicionário da Língua Portuguesa. Segunda edição. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, p.1 634, 1986.
- FERREIRA, T. L., WARD, R. J. The interaction of bothropstoxin-I (Lys49-PLA(2)) with liposome membranes. *Toxicon*. 15;54(4):525-30, 2009.
- FLETCHER, J. E., JIANG, M. S. LYS49 phospholipase A2 myotoxins lyse cell cultures by two distinct mechanisms. *Toxicon*, 36(11):1549-55, 1998.
- FULY, A. L., DE MIRANDA, A. L., ZINGALI, R. B., GUIMARÃES, J. A. Purification and characterization of a phospholipase A2 isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. *Biochem Pharmacol*, 1;63(9):1589-97, 2002.

- FRANCIS, B., GUTIERREZ, J. M., LOMONTE, B., KAISER, I. I. Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A2. *Arch Biochem Biophys.* 1;284(2):352-9, 1991.
- GALLAGHER, P. G., BAO, Y., SERRANO, S. M., KAMIGUTI, A. S., THEAKSTON, R. D., FOX, J. W. Use of microarrays for investigating the subtoxic effects of snake venoms: insights into venom-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Toxicon.* 41(4):429-40, 2003.
- GEBRIM, L. C., MARCUSSI, S., MENALDO, D. L., MENEZES, C. S. R., NOMIZO, A., HAMAGUCHI, A., SILVEIRA-LACERDA, E. P., HOMSI-BRANDEBURGO M. I., SAMPAIO, S. V., SOARES, A. M., RODRIGUES, V. M. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. *Biologicals,* 37(4):222-9, 2009.
- GOMES, A., CHOUDHURY, S. R., SAHA, A., MISHRA, R., GIRI, B., BISWAS, A.K., DEBNATH, A., GOMES, A. A heat stable protein toxin (*drCT-I*) from the Indian Viper (*Daboia russelli russelli*) venom having antiproliferative, cytotoxic and apoptotic activities. *Toxicon.* 49(1):46-56, 2007.
- GREENE, H. W. Dietary correlates of the origin and radiation of snakes. *Am. Zool,* 23:431-41, 1983.
- GRIVICICH, I., REGNER, A., ROCHA, A. B. Morte por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia,* 53(3): 335-343, 2007.
- GUTIÉRREZ, J. M., LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon,* 33(11):1405-24, 1995.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: KINI, R. M. (Ed.). **Venom A2 Enzymes Structure, Function and Mechanism.** Wiley: United Kindgom, p. 321-352, 1997.

- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, v. 42(8), p. 915-31, 2003.
- HAMZA, L., GIRARDI, T., CASTELLI, S., GARGIOLI, C., CANNATA, S., PATAMIA, M., LULY, P., LARABA-DJEBARI, F., PETRUZZELLI, R., RUFINI, S. Isolation and characterization of a myotoxin from the venom of *Macrovipera lebetina transmediterranea*. *Toxicon*. 56(3): 381-90, 2010.
- HARDEN, T. K., SONDEK, J. Regulation of phospholipase C isozymes by ras superfamily GTPases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46: 355-379, 2006.
- HARVEY, A. Snake Toxins, 3a ed, *Pergamon press*, 1984.
- HIRAOKA, M., ABE, A., SHAYMAN, J. A. Cloning and characterization of a lysosomal phospholipase A₂, 1-O-acylceramide synthase, *J. Biol. Chem.* 277: 10090–10099, 2002.
- HOMSI-BRADENBURGO, QUEIROZ L.S., SANTO-NETO H., RODRIGUESSIMIONI L., GIGLIO J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon*; 26(7): 615-27, 1988.
- HORUK, R. Molecular properties of the chemokine receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 159–165, 1994.
- KARIN, M., AND GALLAGHER, E. TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF₆ signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes. *Immunol. Rev.* 228, 225–240, 2009.
- KINI, R. M. Phospholipase A₂ – A complex multifunctional protein puzzle. In: Kini, R.M. Venom Phospholipase A₂ Enzymes. *John Wiley & Sons England*, Cap 1, p. 1-28, 1997.

- KINI, R.M., EVANS H. J. Structure-function relationships of phospholipases: the anticoagulant region of phospholipases A₂. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(30): 14402-14407, 1987.
- KLIONSKY, D. J., EMR, S. D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290:1717-21, 2000.
- KOLLIAS, G., KONTOYIANNIS, D. Role of TNF/TNFR in autoimmunity: specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 315–321, 2002.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L., VANDENABEELE, P., ABRAMS, J., ALNEMRI, ES., BAEHRECKE, E. H., BLAGOSKLONNY, M. V., EL-DEIRY, W. S., GOLSTEIN, P., GREEN, D. R., HENGARTNER, M., KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LIPTON, S. A., MALORNI, W., NUÑEZ, G., PETER, M. E., TSCHOPP, J., YUAN, J., PIACENTINI, M., ZHIVOTOVSKY, B., MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16(1):3-11, 2009.
- KUDO, I. Diversity of phospholipase A₂ enzymes: foreword. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27(8): 1157, 2004.
- LEWIN, B. Ciclo celular e regulação do crescimento. *Genes VII*, Porto Alegre, Artes Médicas, v 412, p96-99, 2000.
- LIZANO, S., DOMONT, G., PERALES, J. Natural phospholipase A(2) myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. *Toxicon*, 15;42(8):963-77, 2003.
- LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J. M., FURTADO, M. F. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon*, 28:1137-1146, 1990.

- LOPES, D. S., BALDO, C., OLIVEIRA, C. DE F., DE ALCÂNTARA, T. M., OLIVEIRA, J. D., GOURLART, L. R., HAMAGUCHI, A., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I., MOURA-DA-SILVA, A. M., CLISSA, P. B., RODRIGUES, V. DE M. Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom. *Toxicon*. 54(1):42-9, 2009.
- MAGALHÃES, A., SANTOS G. B., VERDAM, M. C., FRAPORTI, L., MALHEIRO, A., LIMA, E. S., DOS-SANTOS, M. C. Inhibition of the inflammatory and coagulant action of *Bothrops atrox* venom by the plant species *Marsypianthes chamaedrys*. *J Ethnopharmacol*. 8;134(1):82-8, 2011.
- MARCHI-SALVADOR, D. P., FERNANDES, C. A., AMUI, S. F., SOARES, A. M., FONTES, M. R. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a myotoxic Lys49-PLA2 from *Bothrops jararacussu* venom complexed with p-bromophenacyl bromide. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 1;62(Pt 6):600-3, 2006.
- MARCHI-SALVADOR, D. P., CORRÊA, L. C., MAGRO, A. J., OLIVEIRA, C. Z., SOARES, A. M., FONTES, M. R. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Proteins*, 15;72(3):883-91, 2008
- McFARLANE, S. M., PASHMI, G., CONNELL, M. C., LITTLEJOHN, A. F., TUCKER, S. J., VANDENABEELE, P., MACEWAN, D. J. Differential activation of nuclear factor-kappaB by tumour necrosis factor receptor subtypes. TNFR1 predominates whereas TNFR2 activates transcription poorly. *FEBS Lett*. 515, 119–126, 2002.
- McHUGH, P., TURINA, M. Apoptosis and Necrosis: A Review for Surgeons. *Surgical Infections (Larchmt)*, 7(1): 53-68, 2006.

- MEBS, D. Scorpions and snakes, such as cobras, mambas and vipers made the African continent famous for venomous animals. *Bull Soc Pathol Exot.* 95(3):131, 2002.
- MICHALIDES, R. J., VAN DE BREKEL, M., BALM, F. Defects in G1-S cell cycle control in head and neck cancer: a review. *Head Neck.* 24(7): 694-704, 2002.
- MILANI, Jr. R., JORGE, M. T., DE CAMPOS, F. P., MARTINIS, F. P., BOUSSO, A., CARDOSO, J. L., RIBEIRO, L. A., FAN, H. W., FRANCA, F. O., SANO-MARTINS, I. S., CARDOSO, D., DE FERNANDEZ, C., FERNANDEZ, J. C., ALDRED, V. L., SANDOVAL, M. P., PUERTO, G., THEAKSTON, R. D., WARRELL, D. A. Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in Sao Paulo State, Brazil. *Q.J.M.* 90: 323-334, 1997.
- MOHAMED, A. A., JUPP, O. J., ANDERSON, H. M., LITTLEJOHN, A. F., VANDENABEELE, P., MACEWAN, D. J. Tumour necrosis factor-induced activation of c-Jun N-terminal kinase is sensitive to caspase-dependent modulation while activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) or p38 MAPK is not. *Biochem. J.* 366: 145–155, 2002.
- MONTECUCCO, C., GUTIÉRREZ, J. M., LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 65(18):2897 – 2912, 2008.
- MORA, R., VALVERDE, B., CECILIA DÍAZ, C., LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J. M. A Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. *Toxicon*, 45:651-660, 2005.
- MORRISON, R. S., WENZEL, H. J., KINOSHITA, Y., ROBBINS, C. A., DONEHOWER, L. A., SCHWARTZKROIN, P. A. Loss of the p53 tumor

- suppressor gene protects neurons from kainate-induced cell death. *J. Neuroscience*. 16, 1337– 1345, 1996.
- MUKAIDA, N., HARADA, A., MATSUSHIMA, K. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9, 9–23, 1998.
 - OLIVEIRA, C. de F., LOPES D. da S., MENDES, M. M., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I., HAMAGUCHI, A., DE ALCÂNTARA, T. M., CLISSA, P. B., RODRIGUES, V. de M. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedii) pauloensis* snake venom. *Toxicon*, 53(5):560-9, 2009.
 - OLIVEIRA, T. C. Mudanças conformacionais envolvidas na ativação interfacial de fosfolipases A_2 – Uma análise computacional. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
 - OWNBY, C. L., SELISTRE DE ARAUJO, H. S., WHITE, S. P., FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A_2 proteins. *Toxicon*. 37(3):411-45, 1999.
 - PARK, M. H., SON, D. J., KWAK, D. H., SONG, H. S., OH, K. W., YOO, H. S., LEE, Y. M., SONG, M. J., HONG, J. T. Snake venom toxin inhibits cell growth through induction of apoptosis in neuroblastoma cells. *Arch Pharm Res.* 32(11):1545-54, 2009.
 - PINHO, F. M., PEREIRA, I. D. Snake bites. *Rev Assoc Med Bras*, 47(1):24-9. 2001.
 - PODOLSKY, D. K. The current future understanding of inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 347: 417–429, 2002.
 - PONCE-SOTO, L. A., BONFIM, V. L., RODRIGUES-SIMIONI, L., NOVELLO, J. C., MARANGONI, S. Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-

- 2 PLA2 D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using in vitro neuromuscular preparation. *Protein J.* 25(2):147-55, 2006.
- QUEIROZ, L. S., SANTO NETO, H., RODRIGUES-SIMIONI, L., PRADO-FRANCESCHI, J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*, 22(3):339-46, 1984.
 - REBECCHI, M. J., PENTYALA, S. N. Structure, Function and Control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiological Reviews*, 80(4): 1291-1335, 2000.
 - ROBERTO, P. G., KASHIMA, S., MARCUSSI, S., PEREIRA, J. O., ASTOLFI-FILHO, S., NOMIZO, A., GIGLIO, J. R., FONTES, M. R., SOARES, A. M., FRANÇA, S. C. Cloning and Identification of a Complete cDNA Coding for a Bactericidal and Antitumoral Acidic Phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* Venom. *Protein J.* 23(4):273-85, 2004.
 - RODRIGUES, R. S., IZIDORO, L. F., TEIXEIRA, S. S., SILVEIRA, L. B., HAMAGUCHI, A., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S., GIGLIO, J. R., FULY, A. L., SOARES, A. M., RODRIGUES, V. M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A(2) from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon*, 50(1):153-65, 2007
 - RODRIGUES, R. S., BOLDRINI-FRANÇA, J., FONSECA, F. P. P., de la TORRE, P., HENRIQUE-SILVA, F., SANZ, L., CALVETE, J. J., RODRIGUES, V. M. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. *J. Proteomics*. 75(9): 2707-20, 2012.
 - RODRIGUES-SIMIONI, L., BORGESE, N., CECCARELLI, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. *Neuroscience*. 10(2):475-89, 1983.

- ROITT, I. M., DELVES, P. J. Essential Immunology, *Blackwell*, Tenth Edition, 18:374-396, 2004.
- ROSTELATO-FERREIRA S, LEITE GB, CINTRA AC, DA CRUZ-HÖFLING MA, RODRIGUES-SIMIONI L, OSHIMA-FRANCO Y. Heparin at low concentration acts as antivenom against Bothrops jararacussu venom and bothropstoxin-I neurotoxic and myotoxic actions. *J Venom Res.* 15;1:54-60, 2010.
- SÁ, J. M., CHIOATO, L., FERREIRA, T. L., DE OLIVEIRA, A. H., RULLER, R., ROSA, J. C., GREENE, L. J., WARD, R. J. Topology of the substrate-binding site of a Lys49-phospholipase A2 influences Ca^{2+} -independent membrane-damaging activity. *Biochem J.* 15;382(Pt 1):191-8, 2004.
- SAKHI, S., BRUCE, A., SUN, N., TOCCO, G., BAUDRY, M., SCHREIBER, S. p53 induction is associated with neuronal damage in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7525– 7529, 1994.
- SAMEL, M., VIJA, H., RONNHOLM, G., SIIGUR, J., KALKKINEN, N., SIIGUR, E. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. *Biochim Biophys Acta.* 1764(4): 707-714, 2006.
- SCHAFER. K. A. (1998) The Cell Cycle (Review). *Vet Pathol.* 35(6): 461-78, 1998.
- SCHALOSKE, R. H., DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering sytem. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761: 1246-1259, 2006.
- SCHULTZ, D. R., HARRINGTON W. J. JR. Apoptosis: Programmed Cell Death at a Molecular Level. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 32(6): 345-369, 2003.
- SELISTRE, H.S.; QUEIROZ, L.S.; CUNHA, A.B. et al. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (Jararaca Ilhoa) snake venom. *Toxicon*, 28: 261-273, 1990.

- SERRANO, S. M., REICHL, A. P., MENTELE, R., AUERSWALD, E. A., SANTORO, M. L., SAMPAIO, C. A., CAMARGO, A. C., ASSAKURA, M. T. A novel phospholipase A2, BJ-PLA2, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. *Arch Biochem Biophys*, 1;367(1):26-32, 1999.
- SHARMA, R., ANKER, S. D. Cytokines, apoptosis and cachexia: the potential for TNF antagonism. *Int J Cardiol*. 85(1):161-71, 2002.
- SHEN, D., NOODEH, A. D., KAZEMI A., GRILLOT, R., ROBSON, G., BRUGÈRE, J. Characterization and expression of phospholipases B from opportunistic fungus *Aspergillus fumigates*. *FEMS Microbiology Letters*, 229: 87-93, 2004.
- SHROFF, E. H., SNYDER, C., CHANDEL, N. S. Role of Bcl-2 Family Members in Anoxia Induced Cell Death. *Cell Cycle*, 6(7):807-9, 2007.
- SINAM – Sistema Nacional de Atendimento Médico, www.amp.org.br/2011/sinam/index.php. Acessado em 03/04/2012.
- SINITOX, SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO FARMACOLÓGICAS. Animais Peçonhentos. Disponível em <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/animais_peconhento_1.pdf>. Acessado em 03/07/2011.
- SIX, D. A., DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization of its pharmacological sites. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488: 1-19, 2000.
- SOARES, A. M., GUERRA-SÁ, R., BORJA-OLIVEIRA, C. R., RODRIGUES, V. M., RODRIGUES-SIMIONI, L., RODRIGUES, V., FONTES, M. R., LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J. M., GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A(2) homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. *Arch Biochem Biophys*. 15;378(2):201-9, 2000a.

- SOARES, A. M., ANDRIÃO-ESCARSO, S. H., ANGULO, Y., LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J.M., MARANGONI, S., TOYAMA, M. H., ARNI, R. K., GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. *Arch Biochem Biophys.* 373(1):7-15, 2000b.
- SBH, SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. Brazilian reptiles - List of species. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br>>. Acesso em 18.08.2012.
- SON, D. J., PARK, M. H., CHAE, S. J., MOON, S. O., LEE, J. W., SONG, H. S., MOON, D. C., KANG, S. S., KWON, Y. E., HONG, J. T. Inhibitory effect of snake venom toxin from *Vipera lebetina turanica* on hormone-refractory human prostate cancer cell growth: induction of apoptosis through inactivation of nuclear factor kappaB. *Mol Cancer Ther.* 6(2):675-83, 2007.
- SONG, J. K., RHEE J. S. Enhancement of stability and activity of phospholipase A1 in organic solvents by directed evolution. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1547: 370-378, 2000.
- SORAGNI E., BOLCHI, A., BALESTRINI, R., GAMBARETTO, C., PERCUDANI, R., BONFANTE, P., OTTONELO, S. A nutrient-regulated, dual localization phospholipase a2 um the symbiotic fungus *Tuber borchii*. *The EMBO Journal*, 20(18): 5079-5090, 2001.
- SOUZA, D. H., EUGENIO, L. M., FLETCHER, J. E., JIANG, M. S., GARRATT, R. C., OLIVA, G. SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Isolation and Structural Characterization of a Cytotoxic L-Amino Acid Oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* Snake Venom: Preliminary Crystallographic Data. *Arch Biochem Biophys.* 386(2): 285-290, 1999.
- STÁBELI, R. G., AMUI S. F., SANT'ANA, C. D., PIRE, M. G., NOMIZO, A., MONTEIRO, M. C., ROMÃO, P. R., GUERRA-SÁ, R., VIEIRA, C. A., GIGLIO, J. R., FONTES, M. R., SOARES, A. M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-

phospholipase A2 homologue: An example of function versatility of snake venom protein. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 142(3-4):371-381, 2006.

- STRIETER, R. M., STANDIFORD, T. J., HUFFNAGLE, G. B., COLLETTI, L. M., LUKACS, N. W., KUNKEL, S. L. "The good, the bad, and the ugly." The role of chemokines in models of human disease. *J. Immunol.* 156, 3583–3586, 1996.
- TEIXEIRA, C. F. P., LANDUCCI, E. C. T., ANTUNESB, E., CHACURC, M., CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. *Toxicon.* 15;42(8):947-62, 2003.
- TORRES, A.M.; WONG, H.Y.; DESAI, M.; MOOCHHALA, S.; KUCHEWL, P.W.; KINI, R.M. Identification of a novel family of proteins in snake venoms. Purification and structural characterization of nawaprin from *Naja nigricollis* snake venom. **J.Biol. Chem.**; v 278, p 40097 – 40104; 2003.
- TOYAMA, M. H., SOARES, A. M., VIEIRA, C. A., NOVELLO, J. C., OLIVEIRA, B., GIGLIO, J. R., MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin from *Bothrops pirajai* snake venom, and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide. *J Protein Chem.* 17(7):713-8, 1998.
- TOYAMA, M. H., SOARES, A. M., VIEIRA, C. A., NOVELLO, J. C., OLIVEIRA, B., GIGLIO, J. R., MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-II, a myotoxic lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops pirajai* venom. *Biochimie.* 82(3):245-50, 2000.
- ULBRICH-HOFMANN, R., LERCHNER, A., OBLOZINSKY, M., BEZAKOVA, L. Phospholipase D and its application in biocatalysis. *Biotechnology Letters*, 27: 535-543, 2005.
- VERMEULEN, K., VAN BOCKSTAELE D. R., BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36(3): 131–149, 2003.

- VIDAL, J. C., STOPPANI, A. O. Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venoms. *Arch Biochem Biophys.* 145(2):543-56, 1971.
- VILLALOBOS, J. C., MORA, R., LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J. M., ÂNGULO, Y. Cytotoxicity induced in myotubes by a Lys49 phospholipase A2 homologue from the venom of the snake *Bothrops asper*. Evidence of rapid plasma membrane damage and a dual role for extracellular calcium. *Toxicology in Vitro*, 21:1382–1389, 2007.
- WEBER, C. H., VINCENZ, C. The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends Biochem. Sci.* 26, 475–481, 2001.
- WEINLICH, R., BRUNNER, T., AMARANTE-MENDES, G. P. Control of death receptor ligand activity by posttranslational modifications. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 1631–1642, 2010.
- WOOD, K. A., YOULE, R. J., (1995). The role of free radicals and p53 in neuron apoptosis in vivo. *J. Neurosci.* 15, 5851– 5857, 1995.
- WU, Z., ZHENG, S., YU, Q. The E2F family and the role of E2F1 in apoptosis. *Int. J. of Biochemistry & Cell Biol.* 41(12): 2389–2397, 2009.
- YAKOVLEV, A. G., FADEN, A. I. Mechanism of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies, *NeuroRx*, 1:5-16, 2004.
- YAN, C. H., LIANG, Z. Q., GU, Z.L., YANG, Y. P., REID, P., QIN, Z. H. Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX-induced death of K562 cells. *Toxicon.* 47(5):521-30, 2007.
- YANG, S. H., CHIEN, C. M., CHANG, L. S., LIN, S. R. Involvement of c-jun N terminal kinase in G2/M arrest and caspase-mediated apoptosis induced by cardiotoxin III (*Naja naja atra*) in K562 leukemia cells. *Toxicon*, 49(7):966-974, 2007.

- YANG, S. H., CHIEN, C. M., LU, M. C., LU, Y. J., WU, Z. Z., LIN, S. R. Cardiotoxin III induces apoptosis in K562 cells through a mitochondrial-mediated pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 32(7): 515-520, 2005
- YOSHIMURA, T., MATSUSHIMA, K., OPPENHEIM, J. J., LEONARD, E. J. Neutrophil chemotactic factor produced by lip polysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1). *J Immunol* 139: 788-793, 1987
- ZHANG, L., CUI, L. A cytotoxin isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom induces apoptosis via Fas pathway in A549 cells. *Toxicol In Vitro.* 21(6):1095-1103, 2007.
- ZHANG, L., WEI, L. J. ACTX-8, a cytotoxic L-amino acid oxidase isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom, induces apoptosis in HeLa cervical cancer cells. *Life Sci.* 80(13): 1189-1197, 2007.
- ZULIANI, J. P., FERNANDES, C. M., ZAMUNER, S. R., GUTIÉRREZ, J. M., TEIXEIRA, C. F. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. *Toxicon.* 1;45(3):335-46, 2005.