UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo das atividades antineoplásicas, citotóxicas e genotóxicas
de toxinas isoladas do veneno de *Rhinella schneideri***

Elisa Corrêa Fornari Baldo

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo das atividades antineoplásicas, citotóxicas e genotóxicas
de toxinas isoladas do veneno de *Rhinella schneideri***

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Elisa Corrêa Fornari Baldo

Orientadora: Eliane Candiani Arantes

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 09/09/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Fornari-Baldo, Elisa Corrêa

Estudo das atividades antineoplásicas, citotóxicas e genotóxicas de toxinas isoladas do veneno de *Rhinella schneideri*. Ribeirão Preto, 2016.

142 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Arantes, Eliane Candiani

1. *Rhinella schneideri*. 2. Citotoxicidade. 3. Atividade antineoplásica. 4. Apoptose

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Elisa Corrêa Fornari Baldo

Título do trabalho: Estudo das atividades antineoplásicas, citotóxicas e genotóxicas de toxinas isoladas do veneno de *Rhinella schneideri*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador(a): Eliane Candiani Arantes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho à memória do meu pai Felisberto, meu anjo da guarda que ilumina sempre meus caminhos; à minha mãe Delma por ser o meu exemplo de força, coragem e dedicação, que sempre esteve ao meu lado e apoiou todas as minhas decisões, hoje a minha vitória é especial para você; ao meu marido Mateus por todo o incentivo e apoio, e por toda a contribuição intelectual; à minha filha Letícia por ser o meu refúgio nas horas difíceis, me alegrando com o seu sorriso sempre; às minhas irmãs Carol e Tatá por admirarem o meu trabalho; à toda a minha família por sempre torcer por mim; a todos os meus amigos por estarem ao meu lado nesta caminhada; e dedico à minha orientadora Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes, pessoa incrível com quem aprendi muito durante esses anos.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por sempre me iluminar e me ajudar a seguir nos melhores caminhos, me dando força para nunca desistir e sempre persistir.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes, por todo o aprendizado, paciência e principalmente por ser um exemplo de profissional, além de ser uma mãezona para todos do laboratório. Obrigada de coração!!!

Agradeço ao Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta, que me acolheu em seu laboratório e com o qual aprendi muito durante esta caminhada.

Agradeço ao meu marido Mateus, que foi quem me incentivou a trilhar por este caminho, pessoa que está sempre ao meu lado, me ajudando a enfrentar os obstáculos da vida e me aconselhando nas minhas decisões, além de me dar todo o carinho do mundo.

Agradeço à minha filha Letícia, a luz da minha vida, meu maior motivo de alegria, a quem sou eternamente grata por este amor incondicional.

Agradeço à minha mãe Delma, por estar comigo em todas as minhas conquistas, e por me ajudar e aconselhar nos momentos difíceis. Se consegui chegar até aqui é por sua causa, seu amor, sua força e sua luta.

Agradeço ao meu pai Felisberto, que mesmo estando lá no céu, ilumina meus caminhos, e foi com os seus incentivos quando criança que me ensinou a querer sempre ser e fazer o melhor.

Agradeço às minhas irmãs, Carol e Tatá, que estão sempre torcendo por mim, e por toda a alegria que elas me proporcionam.

À minha sogra Márcia, que está sempre quebrando nosso galho quando a gente precisa, família que conquistei durante a vida, e da qual me orgulho muito.

A toda a minha família, que caminha comigo durante todo o percurso da minha vida.

A todos os meus amigos, que estão ao meu lado sempre quando preciso e também nas horas de diversão.

Agradeço às professoras Dra. Lusânia Maria Gregg, Dra. Suely Vilela, Dra. Maria Regina Torqueti e Dra. Luciane Carla Alberici pela colaboração, e por abrirem as portas de seus laboratórios e contribuírem para a realização deste trabalho.

Agradeço aos colegas e amigos do LTA, pelas contribuições intelectuais e pela companhia, e agradeço principalmente à Karlinha e a Iara por me ajudarem sempre que precisei.

Agradeço aos colegas e amigos do laboratório de química, que sempre me ajudaram nos experimentos e me ensinaram muito.

A todos os professores que ministraram as aulas durante o curso de doutorado, por todo o aprendizado, por me ajudarem a vencer mais uma etapa.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação, em especial à Rosemary, por toda a paciência comigo.

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, por toda a estrutura e por me proporcionar momentos maravilhosos.

À FAPESP, CNPQ e CAPES por todo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a conquistar mais esta vitória!!!

Epígrafe

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

Fernando Pessoa

“Ao infinito... e além!”

Buzz Lightyear

RESUMO

FORNARI-BALDO, E. C. **Estudo das atividades antineoplásicas, citotóxicas e genotóxicas de toxinas isoladas do veneno de *Rhinella schneideri***. 2016. 142 folhas. Tese Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Toxinas animais podem ser moléculas aplicáveis na geração de agentes terapêuticos e/ou de ferramentas para a pesquisa básica e aplicada. Recentemente, tem sido provado que medicamentos tradicionais chineses (TCM) compostos por substâncias extraídas de venenos de sapos são efetivos no tratamento de hepatocarcinoma e outros tipos de câncer. Desta forma, os objetivos deste estudo foram isolar toxinas do veneno do sapo *Rhinella schneideri* e avaliar suas ações antineoplásicas em diferentes linhagens celulares tumorais, além de avaliar a capacidade das toxinas em induzir instabilidade genômica (genotoxicidade e mutagenicidade). O veneno de *Rhinella schneideri* foi inicialmente submetido à diálise resultando na fração de baixa massa molecular (VRs), a qual foi submetida a uma cromatografia de fase reversa em coluna C18 em um sistema FPLC. Avaliou-se a citotoxicidade do VRs em linhagens celulares HL-60, HepG2, PC-12, B16F10, MCF-7, SKBr-3, L292 e em hepatócitos primários isolados de ratos Wistar, através do ensaio do MTT. Analisou-se também a influência do VRs em diversos parâmetros mitocondriais, através de experimentos realizados com mitocôndrias isoladas de fígados de rato. Adicionalmente, foram isoladas três toxinas do VRs, denominadas Rs1, Rs2 e Rs3, com as quais foram realizados ensaios de citotoxicidade com células tumorais HepG2 e hepatócitos primários, análise da dissipação do potencial de membrana mitocondrial, avaliação de indução de fragmentação nuclear, análise da distribuição do ciclo celular, ensaios de avaliação de apoptose/necrose utilizando anexina V (AV) e iodeto de propídeo (PI) e ativação das caspases 3, 8 e 9 por western blot. O VRs (0,01 – 1000 µg/mL) foi citotóxico para quatro das seis linhagens tumorais estudadas (B16F10, HepG2, HL-60 e Skbr-3), demonstrou interferir pouco na viabilidade de células não tumorais L929, e citotóxico para hepatócitos. O VRs não induz efeitos significativos nos parâmetros bioenergéticos e oxidativos das mitocôndrias isoladas de fígado de ratos saudáveis, o que é um indicativo que o VRs não induz efeito citotóxico a estas células através da via mitocondrial. Além disto, o VRs diminuiu o acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Através da cromatografia de fase reversa foram isoladas três toxinas do VRs, dentre as quais duas (Rs1 e Rs3 [1-1000 nM]) demonstraram ser mais citotóxicas às células tumorais HepG2. Estas toxinas pouco ou nada interferiram na viabilidade celular de hepatócitos primários, característica extremamente importante para uma possível aplicação como agente antitumoral. Nos experimentos de dissipação do potencial de membrana mitocondrial

e de fragmentação nuclear (características de células em apoptose) em células HepG2 ambas as toxinas se mostraram capazes de induzir a dissipação do potencial de membrana (de maneira concentração-dependente) e também causaram a condensação da cromatina e fragmentação nuclear. A análise da distribuição do ciclo celular em células HepG2 após o tratamento com Rs1 e Rs3 demonstrou que as toxinas induziram aumento da fase G2/M em menores concentrações (10- 50 nM), seguido de uma diminuição de células nesta fase e aumento em fase G0/G1 em maiores concentrações (100 – 1000 nM). A quantidade de células apoptóticas foi maior em concentrações maiores, porém não estabeleceu relação concentração-resposta. Os ensaios realizados com anexina V e PI, demonstram que ambas as toxinas são capazes de induzir as células HepG2 à morte, principalmente pelo processo de apoptose. Os ensaios de caspases 3, 8 e 9 confirmaram a ativação da apoptose tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca. Os ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade revelaram que ambas as toxinas não causaram danos ao DNA das células HepG2. Desta forma, os resultados obtidos neste estudo indicam a seletividade dos efeitos citotóxicos das toxinas Rs1 e Rs3 pelas células tumorais HepG2, induzindo estas células à morte principalmente por apoptose, justificando o potencial uso destas duas toxinas em terapias antitumorais.

Palavras-chave: *Rhinella schneideri*; citotoxicidade; atividade antineoplásica; apoptose.

ABSTRACT

FORNARI-BALDO, E. C. **Study of antineoplastic, cytotoxic and genotoxic activities of toxins isolated from *Rhinella schneideri* poison**. 2016. 142 folhas. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Animal toxins can be applicable in generating therapeutic agents and/or tools for basic and applied research. Recently, it has been proved that traditional Chinese medicines (TCM) consisting of substances extracted from toad poisons have marked effect in the treatment of hepatocellular carcinoma and other cancers. Thus, the objectives of this study were to isolate toxins from *Rhinella schneideri* toad poison and evaluate their antineoplastic effects in different tumor cell lines, and to evaluate the ability of toxins to induce genomic instability (genotoxicity and mutagenicity). The poison from *Rhinella schneideri* was initially submitted to dialysis resulting in the fraction of low molecular weight (VRs), which was subjected to reverse phase chromatography on C18 column in a FPLC system. The cytotoxicity of VRs was assessed in cell lines HL-60, HepG2, PC-12, B16F10, MCF-7, SKBR-3, L292 and primary hepatocytes isolated from Wistar rats through MTT assay. The influence of VRs in various mitochondrial parameters was also evaluated through experiments with mitochondrias isolated from rat liver. Additionally, three toxins were isolated from VRs, named Rs1, Rs2 and Rs3, and cytotoxicity assays with tumor cells HepG2 and primary hepatocytes were performed with them. The analysis of mitochondrial membrane potential dissipation, nuclear fragmentation-inducing, evaluation of the cell cycle distribution, analysis of apoptosis/necrosis using annexin V (AV) and propidium iodide (PI) and activation of caspase 3, 8 and 9 by western blot were also performed. The VRs (0,01 – 1000 µg/mL) showed to be cytotoxic to four of the six tumor cell lines studied (B16F10, HepG2, HL-60 and SKBR-3), showed little interference with the viability of non-tumor cells L929, and showed to be cytotoxic to primary hepatocytes. It was also observed that the VRs did not induce significant effects on bioenergetic and oxidative parameters of isolated mitochondria, which is an indication that the VRs did not induce cytotoxic effect on these cells via mitochondrial pathway. In addition, the VRs have showed to reduce the accumulation of reactive oxygen species. Three toxins were isolated from VRs by reverse phase chromatography and two of them (Rs1 and Rs3 [1-1000 nM]) have shown to be more cytotoxic to tumor cells HepG2. These toxins cause only a small decrease in cell viability of primary hepatocytes, an extremely important feature for a possible antitumor action. The experiments of mitochondrial membrane potential dissipation and nuclear fragmentation (apoptosis characteristics) in HepG2 cells showed that both toxins were able to induce dissipation of the membrane potential (dose-dependent manner) and also caused chromatin condensation and nuclear fragmentation. Cell cycle distribution analysis in HepG2 cells after treatment with Rs1 and Rs3 showed increase in G2/M phase at lower concentrations (10 – 50 nM), followed by a reduction of cells in this phase and increase in the G0/G1 phase at

higher concentrations (100 – 1000 nM). The amount of apoptotic cells was greater at higher concentrations but did not establish dose-response relation. Assays performed with annexin V and PI showed that both toxins are able to induce HepG2 cell death mainly by apoptosis. The assays of caspases 3, 8 and 9 confirmed the activation of apoptosis by both the intrinsic and extrinsic pathways. Mutagenicity and genotoxicity tests revealed that both toxins caused no damage to the DNA of HepG2 cells. Thus, the results of this study indicate the selective cytotoxic effect of toxins Rs1 and Rs3 by tumor cells HepG2, inducing these cells to death mainly by apoptosis, justifying the potential use of these two toxins in antitumor therapies.

Keywords: *Rhinella schneideri*; cytotoxicity; antitumoral activity; apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Rhinella schneideri</i> .	3
Figura 2. Glândulas de sapo do gênero <i>Bufo</i> (<i>Rhinella schneideri</i>): mucosa (A); granular ou serosa (B).	4
Figura 3. Compostos biologicamente ativos encontrados nos venenos de sapos.	5
Figura 4. Vias de ativação da apoptose.	20
Figura 5. Fluxograma dos ensaios realizados neste trabalho com a fração de baixa massa molecular do veneno de <i>Rhinella schneideri</i> (VRs) e com as toxinas isoladas Rs1, Rs2 e Rs3.	26
Figura 6. Extração do veneno de <i>Rhinella schneideri</i> através da compressão de suas glândulas parotóides.	27
Figura 7. Esquema representando a estrutura química dos heterosídeos cardiotônicos.	50
Figura 8. Perfil cromatográfico da amostra de baixa massa molecular do veneno de <i>Rhinella schneideri</i> (VRs) em coluna de fase reversa C-18.	51
Figura 9. Perfis obtidos da cromatografia de fase reversa em sistema HPLC do veneno de diferentes espécies de sapos encontrados na fauna brasileira, <i>R. crucifer</i> , <i>R. marina</i> , <i>R. granulosa</i> e <i>Rhinella schneideri</i> .	53
Figura 10. Estruturas dos heterosídeos cardiotônicos Marinobufagina, Telocinobufagina e Bufalina.	54
Figura 11. Viabilidade celular avaliada por MTT em linhagens celulares (A) PC-12, (B) B16F10, (C) HepG2 e (D) HL-60, após tratamento com o VRs.	55
Figura 12. Viabilidade celular avaliada por MTT em linhagem HL-60 após tratamento com o VRs.	56
Figura 13. Viabilidade celular avaliada por MTT em linhagens (A) MCF-7 e (B) SKBr-3 após tratamento com o VRs.	57
Figura 14. Viabilidade celular avaliada por MTT em (A) células L929 e (B) hepatócitos primários após tratamento com o VRs.	58
Figura 15. Efeito do VRs (0,001 a 100 µg/mL) sobre a respiração de estado III em mitocôndrias (1mg de proteína/mL) isoladas de fígado de rato.	61
Figura 16. Efeitos do VRs em diferentes concentrações sobre o nível de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.	63
Figura 17. Efeitos do VRs em diferentes concentrações sobre o potencial de membrana mitocondrial, avaliados com safranina-o e CCCP 2 µM como controle positivo.	64

Figura 18. Produção/acumulação de EROs na presença de diferentes concentrações do VRs.	65
Figura 19. Produção/acumulação de EROs na presença de diferentes concentrações do VRs e do <i>t</i> -BOOH.	65
Figura 20. Efeitos de diferentes concentrações do VRs na oxidação do NAD(P)H em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos.	66
Figura 21. Efeitos de diferentes concentrações do VRs na oxidação do NAD(P)H induzida por <i>t</i> -BOOH em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos.	67
Figura 22. Razão entre GSH e GSSG em mitocôndrias (1mg de proteína/mL) isoladas de fígado de rato na presença de diferentes concentrações do VRs.	68
Figura 23. Razão entre GSH/GSSG na presença das amostras do VRs em diferentes concentrações.	68
Figura 24. Efeito do VRs em diferentes concentrações sobre a indução do inchamento mitocondrial.	69
Figura 25: Efeitos do VRs sobre o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial, avaliados usando Calcium Green.	70
Figura 26. Viabilidade celular avaliada por MTT de HepG2 após tratamento com as subfrações (A) Rs1, (B) Rs2 e (C) Rs3 por 24 e 48 horas.	72
Figura 27. Viabilidade celular avaliada por MTT de hepatócitos após tratamento com as subfrações (A) Rs1 e (B) Rs3.	74
Figura 28. Análise do potencial de membrana mitocondrial em células HepG2 após tratamento com as subfrações (A) Rs1 e (B) Rs3 por 24 e 48 horas.	75
Figura 29. Análise da condensação e fragmentação nuclear em células HepG2 após tratamento com as subfrações (A) Rs1 e (B) Rs3 por 24 e 48 horas.	76
Figura 30. Imagens representativas da condensação e fragmentação nuclear em células HepG2 após tratamento com a subfração Rs1 por (A-H) 24 e (I-P) 48 horas.	77
Figura 31. Imagens representativas da condensação e fragmentação nuclear em células HepG2 após tratamento com a subfração Rs3 por (A-H) 24 e (I-P) 48 horas.	78
Figura 32. Distribuição do ciclo celular de células HepG2 após tratamento com a subfração Rs1 por (A) 24 e (B) 48 horas.	80
Figura 33. Distribuição do ciclo celular de células HepG2 após tratamento com a subfração Rs3 por (A) 24 e (B) 48 horas.	81
Figura 34. Efeito da Rs1 sobre a ativação da caspase 3 em células HepG2, após incubação por (A) 24 e (B) 48 horas.	88
Figura 35. Efeito da Rs3 sobre a ativação da caspase 3 em células	89

HepG2, após incubação por **(A)** 24 e **(B)** 48 horas.

Figura 36. Efeito da Rs1 sobre a ativação da caspase 8 em células HepG2, após incubação por **(A)** 24 e **(B)** 48 horas 90

Figura 37: Efeito da Rs3 sobre a ativação da caspase 8 em células HepG2, após incubação por **(A)** 24 e **(B)** 48 horas. 91

Figura 38: Efeito da Rs1 sobre a ativação da caspase 9 em células HepG2, após incubação por **(A)** 24 e **(B)** 48 horas. 92

Figura 39: Efeito da Rs3 sobre a ativação da caspase 9 em células HepG2, após incubação por **(A)** 24 e **(B)** 48 horas. 93

Figura 40: Imagem representativa dos nucleóides formando cometas com diferentes graus de dano ao DNA. 95

Figura 41: **(A)** Imagem de uma célula binucleada e **(B)** uma célula binucleada apresentando micronúcleo. 97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Toxinas extraídas de glândulas da pele de sapos da família Bufonidae.	8
Tabela 2. Razão de controle respiratório (RCR) e razão ADP/O utilizando glutamato e malato como substratos oxidáveis em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.	62
Tabela 3. Percentual de células HepG2 marcadas com anexina V-FITC e/ou PI. As células foram tratadas com Rs1 por 24 h.	84
Tabela 4. Percentual de células HepG2 marcadas com anexina V-FITC e/ou PI. As células foram tratadas com Rs1 por 48 h.	84
Tabela 5. Percentual de células HepG2 marcadas com anexina V-FITC e/ou PI. As células foram tratadas com Rs3 por 24 h.	85
Tabela 6. Percentual de células HepG2 marcadas com anexina V-FITC e/ou PI. As células foram tratadas com Rs3 por 48 h.	86
Tabela 7. Porcentagem de DNA na cauda dos nucleóides de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações da toxina Rs1.	96
Tabela 8. Porcentagem de DNA na cauda dos nucleóides de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações da toxina Rs3.	96
Tabela 9. Distribuição de células de acordo com o número de núcleos, porcentagem de células binucleadas e IDN em culturas de células HepG2 tratadas com Rs1 em diferentes concentrações.	98
Tabela 10. Frequência de micronúcleos em células HepG2 binucleadas tratadas com diferentes concentrações de Rs1.	98
Tabela 11. Distribuição de células de acordo com o número de núcleos, porcentagem de células binucleadas e IDN em culturas de células HepG2 tratadas com Rs3 em diferentes concentrações.	99
Tabela 12. Frequência de micronúcleos em células HepG2 binucleadas tratadas com diferentes concentrações de Rs3.	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ADP	Difosfato de adenosina
ADP/O	Razão de ADP por Oxigênio
AESBF	Fluoreto de 4-(2-aminoetil)-benzenossulfonil
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina do soro bovino
CCCP	Carbonilcianeto-m-clorofenil-hidrazona
CG-EM	Cromatografia gasosa seguida de espectrometria de massas
cis	Cisplatina
CM-H ₂ DCFDA	5,6-clorometil-2',7'-diclorodi-hidrofluoresceína diacetato acetil-éster
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DXR	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido etilenoglicol bis (-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético
EROS	Espécies reativas de oxigênio

FITC	Ficoeritrina
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FS	Fosfatidilserina
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
HCC	Carcinoma hepatocelular
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-piperazinil-(1)]-etanossulfônico
HFS	Solução de alta fluorescência
Hoechst 33342	2'-(4-Etoxi-fenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-tri-hidrocloreto de 2,5'-bi-1H-benzimidazol
IDN	Índice de Divisão Nuclear
MEM	Meio Mínimo Essencial
MMS	Metil metano sulfonato
MN	Micronúcleo
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NEM	N-etil-maleimina
OPT	o-ftalaldeído
PBS	Solução de tampão fosfato / solução salina tamponada

PI	Iodeto de propídeo
RCR	Razão de Controle Respiratório
RIPA	Ensaio de rádio-imunoprecipitação
RNase	Ribonuclease A
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecilsulfato de sódio
T-BOOH	Terc-butil hidroperóxido
TBS-T	Tampão salino de Tris com Tween 20
TCM	Medicina tradicional Chinesa
TFA	Ácido trifluoracético
TMRM	Tetrametilrodamina metil éster
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
VRs	Fração de baixa massa molecular do veneno de <i>Rhinella schneideri</i>
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Composição dos venenos de anfíbios.....	2
1.2. Fisiopatologia do Câncer.....	11
1.3. Carcinoma Hepatocelular.....	13
1.4. Ciclo Celular.....	14
1.5. Mecanismos de morte celular: Necrose e Apoptose.....	16
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. MATERIAIS	27
3.1.1. Veneno de <i>Rhinella schneideri</i>	27
3.1.2. Linhagens celulares.....	27
3.1.3. Animais experimentais.....	28
3.1.4. Reagentes.....	28
3.1.5. Equipamentos e acessórios.....	28
3.2. MÉTODOS	29
3.2.1. Filtração do veneno de <i>Rhinella schneideri</i> por diálise.....	29
3.2.2. Liofilização da água de diálise.....	30
3.2.3. Cromatografia de fase reversa em sistema FPLC.....	30
3.2.4. Isolamento de hepatócitos primários.....	30
3.2.5. Isolamento mitocondrial.....	31
3.2.6. Experimentos mitocondriais realizados com o VRs.....	32
3.2.6.1. Respiração mitocondrial.....	32

3.2.6.2. Níveis de ATP mitocondrial	33
3.2.6.3. Potencial de membrana mitocondrial	33
3.2.6.4. Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	34
3.2.6.5. Avaliação do estado redox dos nucleotídeos de piridina.....	34
3.2.6.6. Níveis de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG)	35
3.2.6.7. Inchamento mitocondrial	35
3.2.6.8. Movimentação e liberação de Ca^{2+}	36
3.2.7. Cultivo celular.....	36
3.2.8. Viabilidade celular	37
3.2.9. Ensaio de Citotoxicidade	37
3.2.10. Análise da dissipação do potencial de membrana mitocondrial	38
3.2.11. Análise de fragmentação nuclear	39
3.2.12. Análise do ciclo celular	39
3.2.13. Ensaio de avaliação de apoptose/necrose utilizando anexina V e iodeto de propídeo (PI).....	40
3.2.14. Detecção da ativação das caspases 3, 8 e 9	41
3.2.15. Ensaio de genotoxicidade / mutagenicidade	44
3.2.15.1. Ensaio do cometa.....	44
3.2.15.2. Ensaio do micronúcleo	45
3.2.16. Análise estatística	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1. Isolamento e purificação das toxinas através de cromatografia de fase reversa em sistema FPLC	49
4.2. Identificação das toxinas isoladas	51
4.3. Ensaio realizados com o VRs.....	54
4.3.1. Ensaio de citotoxicidade	54
4.3.2. Ensaio mitocondriais.....	59
4.3.2.1. Respiração mitocondrial	60
4.3.2.2. Níveis de ATP mitocondrial	62
4.3.2.3. Potencial de membrana mitocondrial	63
4.3.2.4. Formação de espécies reativas de oxigênio (EROS).....	64
4.3.2.5. Avaliação do estado redox dos nucleotídeos de piridina.....	66
4.3.2.6. Níveis de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG)	67
4.3.2.7. Inchamento mitocondrial	69

4.3.2.8. Movimentação e liberação de Ca^{2+}	70
4.4. Ensaios realizados com as toxinas Rs1, Rs2 e Rs3	71
4.4.1. Ensaios de citotoxicidade	71
4.4.2. Análise da dissipação do potencial de membrana mitocondrial	74
4.4.3. Análise da fragmentação nuclear	76
4.4.4. Análise do ciclo celular	79
4.4.5. Ensaios de avaliação de apoptose/necrose utilizando anexina V e iodeto de propídeo (PI)	83
4.4.6. Avaliação da ativação das caspases 3, 8 e 9	87
4.4.7. Ensaios de genotoxicidade / mutagenicidade	94
4.4.7.1. Ensaio do cometa	95
4.4.7.2. Ensaio do Micronúcleo	97
5. CONCLUSÕES	101
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
ANEXOS	118

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais têm demonstrado conter uma série de moléculas biologicamente ativas que podem proporcionar ferramentas importantes para investigar diferentes sistemas fisiológicos e podem ser úteis para o desenvolvimento de novas drogas. Algumas dessas moléculas têm demonstrado potencial terapêutico devido às suas atividades antitumoral, cardiovascular, antimicrobianas, antivirais e antiparasitárias. As fontes mais comuns dessas moléculas são as plantas e animais peçonhentos e venenosos. Animais peçonhentos possuem células especializadas ou estruturas glandulares que produzem venenos e aparatos capazes de inocular estas secreções (por exemplo, ferrões, dentes, arpão). Animais venenosos podem produzir veneno ou adquirir toxinas do ambiente, plantas, outros animais ou microrganismos, e acumulam-se em glândulas ou tecidos, mas estes animais são incapazes de inoculação ativa, visto que eles não possuem aparatos para essa finalidade (MEBS, 2002).

As peçonhas e venenos animais apresentam uma complexa mistura de toxinas, que foram desenvolvidas durante o processo de evolução como estratégia de defesa e/ou captura de presas e causam modificações fisiológicas nos predadores destes animais e em suas presas. Os animais peçonhentos possuem uma capacidade única para paralisar e/ou matar suas presas, ativando estruturas específicas de diversos sistemas orgânicos da presa (MORTARI et al, 2007). Sendo assim, as toxinas têm grande potencial para a produção de novas drogas terapêuticas. Muitas toxinas de diferentes tipos de animais vêm sendo isoladas e muitas delas são consideradas grandes ferramentas para pesquisa básica e alvos farmacológicos (LEWIS; GARCIA, 2003).

1.1. Composição dos venenos de anfíbios

Os anfíbios são uma das mais importantes fontes de moléculas bioativas derivadas de animais. Eles tiveram durante sua evolução ajustes em sua pele, devido à transição entre a água e a terra. A pele destes animais foi modificada de acordo com o seu novo estilo de vida e resultou na sua adaptação à vida na terra (TOLEDO; JARED, 1995). A classe Amphibia possui 7520 espécies catalogadas, que se distribuem em três ordens, as quais são denominadas de Caudata, Gymnophiona e Anura (FROST, 2016). A ordem Anura é a mais populosa, com 6615

espécies, e é constituída por sapos, rãs e pererecas. Os sapos da família Bufonidae (589 espécies) são os mais tóxicos, sendo que no Brasil são encontradas 78 espécies, dentre elas a *Rhinella schneideri* (antigo *Bufo schneideri* ou popular Sapo Cururu) (Fig. 1) (SBH, 2015).

Figura 1. *Rhinella schneideri*.

Fonte: Acervo de fotos do Laboratório de Toxinas Animais (FCFRP-USP).

Estes vertebrados do grupo Anura ocupam amplos tipos de habitats e, para isto, sofreram adaptações em relação aos seus ancestrais, dentre estas, a mais característica está em sua pele, que apresenta um elaborado sistema de glândulas cutâneas distribuídas por toda superfície corporal. Estas glândulas liberam substâncias com diferentes funções, desde a regulação das funções fisiológicas à proteção contra predadores ou microrganismos. Se esta proteção for removida, sua pele é facilmente infectada por fungos e bactérias em poucos dias (CLARKE, 1996). Os anfíbios anuros utilizam suas toxinas para defesa. Como exemplo, sapos da espécie *Rhinella schneideri*, quando ameaçados, inflam o corpo exibindo suas glândulas parotóides ao predador, de forma que se for abocanhada pela cabeça, liberará o veneno leitoso das glândulas, cujas toxinas podem ser potencialmente mortais (JARED; ANTONIAZZI, 2009).

As glândulas se dividem em dois tipos: as glândulas mucosas e glândulas granulares (serosa ou venenosa), que possuem diferentes posições anatômicas e

diferente constituição de secreção (Fig. 2). As glândulas mucosas estão mais relacionadas com funções fisiológicas, como reprodução, defesa contra fungos e bactérias, respiração e dessecação, e encontram-se espalhadas por toda a pele do animal. Já as glândulas granulares produzem uma secreção repelente ou tóxica, representando uma das principais formas de defesa passiva do animal (TOLEDO; JARED, 1995).

Figura 2. Glândulas de sapo do gênero *Bufo* (*Rhinella schneideri*): mucosa (A); granular ou serosa (B). Fonte: BALDO et al., 2015.

Nos anfíbios, as glândulas serosas são divididas em vários grupos, de acordo com a região do corpo em que se localizam, como por exemplo, as parotóides (localizadas no dorso, imediatamente atrás do ouvido), lombares, e as peitorais.

Extraído das glândulas parotóides, o veneno de sapo possui o aspecto de um líquido espesso, leitoso ou cremoso, de cor branca (*Bufo marinus*) ou amarela (*Rhinella schneideri*), de cheiro fortemente alício no *Bufo crucifer* e quase inodoro nas outras espécies estudadas (BRAZIL; VELLARD, 1926).

Os venenos dos anfíbios contêm uma variedade de compostos biologicamente ativos, os quais funcionam como ferramentas de defesa contra predação e/ou como agentes antimicrobianos (MEBS et al., 2005). As toxinas são produzidas em glândulas epidérmicas e parótidas, sendo que em mamíferos a ingestão destas substâncias induz intoxicação severa.

A intoxicação por contato com o animal é rara e acontece quando a secreção ou o próprio animal é ingerido, porque ele só tem efeito quando em contato com feridas ou mucosas do agressor, como boca e olhos, considerando que eles só

liberam o seu veneno quando se sentem ameaçados ou provocados. No entanto, a segunda geração de anfíbios mantidos em cativeiro, perde a sua capacidade de produzir toxinas e os animais tornam-se não-tóxicos, já que as toxinas são produzidas por precursores encontrados na dieta do animal, o que explica a variação considerável na toxicidade dos sapos em diferentes localizações geográficas (DALY et al., 1997).

O envenenamento por toxinas de sapos manifesta-se primariamente por sintomas digitálicos-símile, efeitos cardioativos, que resultam em bradicardia, diferentes graus de bloqueio atrioventricular, taquicardia ventricular, fibrilação ventricular e morte súbita (CHI et al., 1998). Como resposta ao envenenamento, geralmente, o organismo responde de forma a tentar eliminar pelo menos parte do veneno, o que poderia levar a uma diminuição da intoxicação. Dentre os efeitos do envenenamento podem ser citados: irritação da mucosa, vômito, salivação diarreia (KNOWLES, 1968; BEDFORD, 1974).

Dentre os compostos biologicamente ativos, excretados por ambos os tipos de glândulas, podem-se encontrar aminas biogênicas, alcaloides, esteroides e peptídeos (Fig. 3), que estão envolvidos na regulação das funções fisiológicas da pele, bem como em mecanismos de defesa contra predadores e microrganismos. Podem ser associados a essas moléculas efeitos neurotóxicos, cardiotoxicos, hemotóxicos e miotóxicos. Adicionalmente, elas podem provocar anestesia ou apresentar atividade hipotensora e/ou hipertensora (ANJOLETTE et al., 2015).

Figura 3. Compostos biologicamente ativos encontrados nos venenos de sapos. Pode-se observar moléculas esteroidais como a bufalina, aminas biogênicas como a serotonina, alcaloides como a bufotenina e peptídeos como a α Aureina.

A alimentação é muito importante para a composição do veneno de sapo. O tipo de dieta depende de fatores como o local em que vivem e do tamanho estrutural do seu corpo. Normalmente a sua alimentação é através de pequenos insetos, mas pode variar, incluindo outros invertebrados (BATISTA et al., 2011).

Uma das principais características deste veneno é a sua resistência a diversos agentes físico-químicos, que o difere de outros venenos de origem animal, tais como o das serpentes, aranhas e escorpiões, que são facilmente destruídos ou alterados por agentes externos. O veneno de sapos resiste ao calor, à luz, aos reagentes químicos como os ácidos fortes, álcool, éter, acetona, clorofórmio e mesmo a outros mais comuns, como água oxigenada, tintura de iodo, solução de hipossulfito de sódio a 50%, solução deci-normal de soda e solução de nitrato de prata (BRAZIL; VELLARD, 1926). Porém, o anel lactônico contido nessas moléculas pode se abrir facilmente dependendo do solvente (LAMBERTON et al., 1985). As soluções concentradas ou diluídas do veneno podem ser esterilizadas a 120°C em autoclave sem que sofram diminuição de atividade. O veneno em óleo de oliva resiste, sem modificação de atividade, à temperatura de ebulição de 160°C. Sob a influência da luz, as soluções aquosas escurecem lentamente, tomando uma coloração pardacenta, entretanto, sem que haja modificação das suas propriedades tóxicas (BRAZIL ; VELLARD, 1926).

As principais toxinas do veneno bruto de sapos são classificadas em dois grupos: derivados esteróides e compostos básicos. No primeiro estão os bufadienolídeos e as bufotoxinas; no segundo, as aminas biogênicas e as bufoteninas. Os derivados esteróides são os responsáveis pelos efeitos cardiotoxicos, com ação digitálicos-símile, e os compostos básicos agem no sistema nervoso autônomo simpático e no sistema nervoso central (BICUDO, 2003). Diversos bufadienolídeos já foram extraídos do veneno de *Rhinella schneideri* (ZELNIK et al., 1963).

Os glicosídeos cardíacos têm sido utilizados há séculos como agentes terapêuticos. Estes compostos possuem um núcleo esteroidal contendo lactona insaturada na posição C17 e um ou mais resíduos em C3 e são encontrados em muitas plantas e em várias espécies de sapos, em geral atuando para a proteção contra predadores. Todos glicosídeos cardíacos são inibidores potentes e altamente seletivos do transporte ativo de Na⁺ e K⁺ através de membranas celulares, ligando-

se a um local específico na superfície extracitoplasmática da Na⁺K⁺-ATPase (KELLY; SMITH, 1996).

Bufadienólídeos e outras moléculas que apresentam estruturas derivadas ou semelhantes foram objetos de bioensaios, os quais demonstraram efeitos biológicos importantes, que estão relacionados à estrutura da molécula. Dentre esses ensaios estão os que avaliaram suas atividades antivirais (CUNHA-FILHO et al., 2010). Outros ensaios demonstraram uma atividade muito relevante em células cancerosas incluindo as de leucemia humana HL-60 e HCT-8 (NOGAWA et al., 2001; YE et al., 2005; WU et al., 2006), de câncer de mama (MCF-7), hepatocarcinoma humano (HepG2 e Bel-7402), de pulmão (NCI-H460), renal (TK10), melanoma (UACC62), gástrico (BGC-823), entre outras linhagens tumorais (GAO et al., 2011). As atividades anticancerígenas são amplamente estudadas devido ao relevante efeito que essa classe de moléculas produz em baixas concentrações, sendo observada a indução de apoptose em células tumorais (QI et al., 2011; FORNARI-BALDO et al., 2012).

Outra ação de interesse biotecnológico observada com componentes encontrados no veneno de sapo foi sobre os protozoários *Leishmania sp.* e *Trypanossoma cruzi*. Os parasitas apresentaram inibições de crescimento e até mesmo morte ao serem expostos a estas moléculas (TEMPONE et al., 2008).

Bufadienólídeos isolados do veneno de *Rhinella schneideri* demonstraram ações sobre o sistema nervoso central com potencial de inibição de crises convulsivas induzidas por Pentilenotetrazol (PTZ) e N-metil-D-aspartato (NMDA) (BALDO et al., 2012).

Alguns bufadienólídeos isolados de glândulas da pele de sapos da família Bufonidae estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Toxinas extraídas de glândulas da pele de sapos da família Bufonidae.

<i>Toxinas</i>	
Arenobufagenina	Cinobufotalitoxina
Arenobufagenina hemisuberata	Desacetilcinobufotalina
Arenobufatoxina	Gamabufotalina
Argentinogenina	Gamabufotalitoxina
Bufalina	Hellebrigenina
Bufalina hemisuberata	Hellebritoxina
Bufalitoxina	Marinobufagina
Bufotalina	Ácido Marinóico
Bufotalinina	Marinosina
Bufotalona	Resibufagina
Cinobufagenina	Resibufagenol
Cinobufagenina hemisuberata	Resibufagenina
Cinobufagina	Resibufotoxina
Cinobufotoxina	Telocinobufagenina
Cinobufotalina	Vulgarobufotoxina

Baseado em Steyn e Heerden, 1998.

O veneno de sapo, antes utilizado por indígenas como alucinógeno durante seus rituais, ou mesmo para a caça, ainda hoje é utilizado tradicionalmente por chineses em drogas como o Chansu (medicamento preparado a partir da pele seca de sapos), no tratamento de doenças cardíacas, como expectorante, diurético e até mesmo como remédio para dor de dente. Recentemente, pesquisadores têm observado o potencial antitumoral de produtos naturais usados na medicina tradicional chinesa (TCM). *Bufo bufo gargarizans* Cantor é uma espécie de sapo e mostrou ser fonte de alguns medicamentos chineses, como o Chansu e o Huachansu, (também conhecido como Cinobufacini), que é o extrato estéril solúvel em água contendo o Chansu. O uso do Huachansu foi aprovado pela Chinese State Food and Drug Administration (SFDA) (ISO9002) e tem sido amplamente utilizado para tratar pacientes com vários tipos de câncer em clínicas oncológicas na China (QI et al., 2011). Os seus principais componentes químicos biologicamente ativos são glicosídeos cardíacos esteroidais, tais como bufalina, resibufogenina, cinobufagina, cinobufotalina, marinobufagina, bufotalin, e alcalóides indólicos (bufotenina, bufotenidina, cinobufotenina e serotonina) (SU et al, 2003). Vários

estudos *in vitro* demonstraram que o Huachansu exerce atividade antitumoral em várias linhagens de células tumorais e que é capaz de inibir a proliferação celular, induz a diferenciação das células, a apoptose e interfere no ciclo celular. Estudos *in vivo* demonstraram a sua capacidade para inibir a angiogênese do tumor, reverter a resistência a múltiplas drogas e regular a resposta imune (ZHU, 2006).

Outros estudos *in vitro* demonstraram que o Huachansu inibiu a proliferação celular em hepatocarcinoma humano (SMMC-7721), gástrico (MKN45) e células de câncer do cólon (Lovo) e induziu apoptose em células de carcinoma gástrico MGC-80-3 (ZUO et al., 2003a). Huachansu inibiu o crescimento das linhagens de células humanas MGC-80-3 e SMMC-7721 através da parada da fase S do ciclo celular e inibição da expressão de Bcl-2 (ZUO et al., 2003b). Também inibiu a biossíntese de DNA e de RNA em células de hepatoma de ascite (H22 HA) de modo dose-dependente (GUAN et al., 1993). Além disso, quando células de câncer de mama humano (FBC-7) e células de câncer de pulmão (A549) foram tratadas com Huachansu, a droga inibiu significativamente o crescimento das células A549, mas não as células BCF-7, o que sugere que a atividade antiproliferativa de Huachansu pode ser específica para cada tipo celular (LIU et al., 2002).

A toxicidade de Huachansu foi avaliada em um estudo clínico de Fase I, realizado por Meng e colaboradores (2009). A dose típica usada na China é de aproximadamente 15 mililitros de drogas por metro quadrado de massa corporal (mL/m^2). Neste estudo, 15 pacientes com estágio III ou IV de carcinoma hepatocelular (fígado), câncer de pulmão ou câncer pancreático receberam uma das cinco doses que variavam de 10 até 90 mL/m^2 por 18 meses. Os resultados mostraram que seis doentes com carcinoma hepatocelular tinham estabilizado a doença por um período médio de seis meses e em um paciente houve uma redução de 20 por cento na massa tumoral, que durou mais de 11 meses, e nenhuma toxicidade cardíaca significativa foi observada. Assim, este estudo mostrou que o Huachansu tem níveis de toxicidade toleráveis, mesmo em doses seis vezes superiores às normalmente administradas, e pode retardar a progressão da doença em alguns pacientes com câncer.

Outro estudo avaliou 15 estudos clínicos randomizados, usando medidas de resultados clinicamente relevantes, e focado em comparações diretas da eficiência e segurança do Huachansu combinado com quimioterapia para simples quimioterapia no câncer gástrico avançado (XIE et al., 2013). Os resultados mostraram que o

Huachansu combinado com a quimioterapia é melhor do que o tratamento de quimioterapia simples por aumentar a taxa de resposta total e a pontuação de Karnofsky, reduzindo a ocorrência de efeitos colaterais gastrointestinais e leucocitopenia em doentes com câncer gástrico em estágio avançado.

Pesquisadores também avaliaram a eficácia e segurança do uso de gemcitabina-oxaliplatina (GEMOX) combinado com Huachansu em pacientes com carcinoma da vesícula biliar avançado e avaliaram a qualidade de vida dos pacientes (QIN et al., 2008). Este câncer tem um prognóstico muito ruim. Não há um padrão geralmente aceito e o tempo médio de sobrevivência de pacientes com câncer avançado que recebem os melhores cuidados de suporte é de aproximadamente 6 meses. Os resultados deste estudo indicaram que a quimioterapia usando GEMOX combinado com o Huachansu é um regime eficaz para o carcinoma da vesícula biliar metastático. Os pacientes conseguem tolerá-lo bem, e as toxicidades são principalmente hematológicas e facilmente tratáveis. Se este regime combinado pudesse ser aplicado na prática clínica, os pacientes teriam um tempo de sobrevida mais longo.

Bufalina, resibufogenina, e cinobufagina são os três principais glicosídeos cardíacos dos quais a atividade antitumoral do Huachansu podem ser atribuídos (SU et al., 2003).

Bufalina é o principal componente imunorreativo digoxina-like do Chansu e demonstrou ser capaz de inibir o crescimento, a parada do ciclo celular e a apoptose em células tumorais. Bufalina inibiu a proliferação celular *in vitro* de células de câncer do endométrio e de câncer de ovário por parada em G0/G1 do ciclo celular e induzindo a apoptose. Demonstrou pouco efeito sobre as células epiteliais endometriais normais humanas, o que sugere que os efeitos da bufalina podem ser específicos para cada tipo de célula e poderia ser menor sobre o endométrio normal (TAKAI et al., 2012). A bufalina também inibiu a proliferação de células MGC803 de câncer gástrico, de modo que em concentrações mais baixas induziu a parada do ciclo celular em fase M, e em concentrações mais elevadas induziu apoptose (LI et al., 2009). A bufalina apresentou atividade antitumoral significativa *in vitro* em carcinoma hepatocelular, leucemia, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de cólon, osteossarcoma e câncer de bexiga, induzindo a apoptose nas células por diferentes vias (TAKAI et al., 2012). Vários estudos pré-clínicos indicaram que a bufalina exerce a inibição do crescimento, a parada do ciclo celular e induz apoptose

em cânceres ginecológicos, gástrico, próstata, fígado, leucemia, melanoma, câncer de pulmão, câncer da mama, cólon e osteosarcoma (MIAO et al., 2013).

A cinobufagina representa de seis a sete por cento do Chansu e é capaz de inibir o crescimento de células tumorais por indução de apoptose através de vias diferentes em linhagens celulares tumorais humanas: HCT 116 (cólon), HT29 (cólon), A431 (pele), PC3 (próstata), A549 (pulmão), Spc-A1 (pulmão) e MCF-7 (mama) (LI et al., 2013).

A resibufogenina inibiu a proliferação de células cancerígenas do fígado SMMC-7721 e BEL-7402 de modo dependente do tempo, e induziu parada do ciclo celular em fase G2/M em células SMMC-7721 (XIE et al., 2012).

Levando-se em conta os estudos realizados até o momento utilizando venenos de sapos, pode se concluir que os compostos presentes nas secreções possuem atividade antitumoral potente, exercendo funções pró-apoptóticas e um efeito inibidor sobre uma ampla variedade de células cancerosas. Huachansu e seus bufadienólídeos ativos devem ser estudados mais profundamente, e são excelentes candidatos para se tornar uma nova terapia clínica para tratar o câncer e pode melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

1.2. Fisiopatologia do Câncer

O câncer é uma doença complexa multifatorial da célula. As células transformadas não são limitadas por controles de crescimento, que regulam a proliferação de células normais. Hoje em dia, a quimioterapia é uma das ferramentas mais importantes e fundamentais para o tratamento do tumor. No entanto, os atuais agentes quimioterápicos têm se mostrado ineficazes para certos tipos de câncer e têm causado muitos efeitos secundários para pacientes (LU et al., 2010).

A definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento de células transformadas. Existem quase 200 tipos que correspondem aos vários sistemas de células do corpo, os quais se diferenciam pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes (INCA, 2002).

A carcinogênese pode iniciar-se de forma espontânea ou ser provocada pela ação de agentes carcinogênicos (químicos, físicos ou biológicos), sendo que em ambos os casos verifica-se a indução de alterações mutagênicas e não-mutagênicas

(epigenéticas) nas células. O tempo para a carcinogênese ser completada é indeterminável, em alguns casos são necessários muitos anos para que se verifique o aparecimento do tumor. A carcinogênese pode ser interrompida em qualquer uma das etapas, se o organismo for capaz de reprimir a proliferação celular e de reparar o dano causado ao genoma (INCA, 2002).

As alterações que geram as neoplasias podem ocorrer em genes especiais denominados proto-oncogenes. Quando sofrem mutações, os proto-oncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização (transformação) das células normais (ALMEIDA et al., 2005). Do mesmo modo, mutações em genes supressores de tumor, que impediriam a progressão do ciclo celular, acabam por facilitar o crescimento de células anormais (FOSTER, 2008). O processo de carcinogênese, em geral, se dá lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor detectável. Esse processo passa por vários estágios antes de chegar ao tumor (ALMEIDA et al, 2005).

As alterações essenciais que levam à carcinogênese são: autossuficiência nos sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento, evasão da apoptose, defeitos no reparo do DNA, potencial infinito de replicação, angiogênese mantida e capacidade de invadir e metastatizar (KUMAR et al., 2005).

As células alteradas se comportam de forma anormal, multiplicando-se de maneira descontrolada. Com a constante multiplicação celular, há a necessidade de que novos vasos sanguíneos sejam formados para que haja a nutrição destas células, em um processo denominado angiogênese. A manutenção e o acúmulo de massa dessas células formam os tumores malignos. Elas também podem adquirir a capacidade de se desprenderem do tumor e de migrarem, invadindo inicialmente os tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através destes, disseminarem-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases. As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções que as suas correspondentes normais. Conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções (SPENCE; JONHSTON, 2001).

O câncer é a segunda causa de morte por doença, no Brasil. Os motivos que levam ao grande número de casos são o aumento da expectativa de vida da população em geral, associada à maior exposição a fatores de risco. O tipo de câncer que mais cresce é o de pulmão, em consequência da propagação do hábito

de fumar e da poluição ambiental (IBGE, 2014). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para o ano de 2016, o surgimento de 596 mil novos casos no Brasil, sendo o câncer de pele não melanoma o mais incidente para ambos os sexos, seguido de câncer de próstata e mama, para homens e mulheres, respectivamente (INCA, 2016).

Existem três tipos principais de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A técnica cirúrgica pode levar à remoção de tumores com eficácia, se não houver metástase. No caso da leucemia, por exemplo, costuma ser necessário o uso de outros tipos conjuntos de terapia (MURAD; KATZ, 1996), incluindo o transplante de medula. O tratamento por radiação é sujeito a severas limitações (MURAD; KATZ, 1996) e a quimioterapia possui muitos efeitos colaterais como náuseas, perda de cabelo e maior susceptibilidade às infecções (OLIVEIRA; ALVES, 2002).

A carcinogênese e o estudo do comportamento das células tumorais podem ajudar no desenvolvimento de novas terapias na luta contra o câncer. Substâncias capazes de induzir apoptose preferencialmente em células neoplásicas são promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos.

Desta forma, torna-se necessária a busca por novos compostos com ação anticancerígena, de forma que atuem em células tumorais com mais especificidade do que em células saudáveis, de forma a diminuir os efeitos colaterais e aumentar a eficácia dos tratamentos antitumorais.

1.3. Carcinoma Hepatocelular

O carcinoma hepatocelular (HCC) é o tumor primário maligno hepático mais comum. Sua incidência e prevalência são globalmente heterogêneas, com taxas mais elevadas no Sudeste da Ásia e África Subsaariana. Em nações industrializadas do Ocidente sua incidência tem aumentado significativamente ao longo das últimas três décadas. Sua heterogeneidade global é, em parte, um reflexo da distribuição global de seus fatores de risco. Seu prognóstico é muito ruim com uma sobrevida de 11% em 5 anos. O único tratamento potencialmente curativo é cirúrgico, com ressecção ou transplante hepático. No entanto, a maioria dos pacientes com HCC são diagnosticados em estágio avançado em que terapias cirúrgicas não são viáveis. O HCC é considerado um tumor resistente à quimioterapia (BLECHACZ; MISHRA, 2013).

O HCC é refratário à quimioterapia citotóxica convencional, à quimioterapia adjuvante usando doxorubicina, cisplatina, fluorouracilo, interferon, epirubicina, ou taxol, como agentes únicos ou em combinação, e, portanto, não produz nenhum benefício decisivo de sobrevivência. Acredita-se que o desenvolvimento e progressão de HCC se correlacionam com a perda de controle da proliferação de células cancerosas e da morte celular programada (apoptose). Manipular esse equilíbrio poderia, portanto, fornecer benefícios clínicos significativos (ARAVALLI; STEER; CRESSMAN, 2008). Por exemplo, o sorafenib, um inibidor de receptor tirosina quinase, foi aprovado pela FDA para pacientes com carcinoma hepatocelular avançado. Um grande estudo randomizado de fase III de pacientes com HCC avançado comprovado por biópsia, demonstrou que o sorafenib melhorou tanto a sobrevivência quanto o tempo total de progressão em comparação com o placebo (LLOVET, 2008; RIMASSA; SANTORO, 2009). O mecanismo de ação deve-se à capacidade do sorafenib em inibir o crescimento de células tumorais e aumentar a apoptose (KELLEY; VENOOK, 2008).

Nos últimos anos, tem sido provado que alguns medicamentos chineses tradicionais (TCMs) têm um efeito acentuado sobre o tratamento de carcinoma hepatocelular, com vantagens únicas, e ganharam aceitação generalizada como um tratamento seguro, eficaz e paliativo na China. O Delisheng, um medicamento da Medicina Tradicional Chinesa (TCM), composto principalmente de toxinas derivadas do veneno de sapos do gênero *Bufo*, exerce atividades anti-proliferativas, citotóxicas e pró-apoptóticas em células HepG2 (células de hepatocarcinoma humano), e tem sido utilizado no tratamento contra o câncer de fígado, obtendo resultados promissores (LU et al., 2010). Para este fim, a identificação de novos agentes com atividades farmacológicas semelhantes poderia promover o desenvolvimento de novos regimes terapêuticos para o HCC.

1.4. Ciclo Celular

A proliferação celular é um fenômeno altamente sofisticado que envolve proteínas reguladoras, incluindo as ciclinas, quinases dependentes de ciclina (CDK), as suas proteínas substratos, e os inibidores de CDK (CKI) (GOLIAS et al., 2004). Em neoplasias, os genes que regulam a proliferação celular, apoptose e diferenciação são alterados e os mecanismos de controle são perdidos. As ciclinas ligam-se às CDKs formando o complexo ciclina-CDK, que ativa o ciclo celular

através da fosforilação do subconjunto de genes alvo. Em particular, a ciclina D (D1, D2 e D3) modula a transição de fase G1/S através da ativação das quinases dependentes de ciclina levando à fosforilação da proteína retinoblastoma. Complexos ciclina D - CDK4/6 ativam ciclina E /CDK2 através de titulação dos inibidores de CDK p21Cip1 e p27Kip1, resultando na progressão do ciclo celular da fase G0-G1 para a fase S (MASSAGUE, 2004). A amplificação ou superexpressão de ciclina D tem sido frequentemente observada na ocorrência de diferentes tipos de câncer (DIEHL, 2002). Além disso, p27, um membro da família Kip / Cip de CKIs, liga-se e impede a ativação da ciclina E-CDK2, controlando deste modo a progressão do ciclo celular na fase G1 (SHERR; ROBERTS, 1999). Portanto, o p27 tem sido considerado como um gene supressor de tumor. A disfunção de p27 provoca sobreativação do ciclo celular e contribui para o desenvolvimento de diversos tumores (FERO et al., 1996). A proliferação da célula cancerosa pode também ser regulada por apoptose, bem como através do controle do ciclo celular.

Ao contrário das células normais, as tumorais mostram fácil adaptação às condições de cultivo em garrafas de plástico, mantendo um ritmo de divisão celular constante e por tempo indefinido. Isto se deve ao fato de que a grande maioria das células neoplásicas apresentam a telomerase na forma ativa, o que resulta na divisão celular infinita (imortalização). As células somáticas normais, após um número limitado de divisões celulares, deixam de se dividir e entram em estado de repouso ou senescência, devido ao encurtamento dos telômeros (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000).

A periodicidade do ciclo celular pode ser visto como uma sequência de eventos ativados conforme a necessidade do organismo. A atividade do ciclo celular pode ser tão curta como 10 minutos por ciclo ou tão longa como 48 horas, dependendo da espécie e da fase de desenvolvimento. Um componente crítico do ciclo celular é a capacidade para cessar a atividade replicativa e ficar em repouso. As células podem, em seguida, reentrar no ciclo celular se for estimulada. As células cancerígenas perdem a capacidade de ficar na fase de repouso (G0) (DOUGLAS; HADDAD, 2003). O ciclo celular pode ser dividido basicamente em duas fases: interfase e mitose. A interfase é subdividida em G1, S e G2. Em G1, os genes necessários para a replicação do DNA são ativados e as proteínas agentes de progressão para a fase S são acumuladas. Na subfase S, ocorre a replicação do DNA e em G2 há o acúmulo das proteínas necessárias para a mitose (DOUGLAS;

HADDAD, 2003). Durante a progressão do ciclo celular, ocorrem os pontos de checagem (*checkpoints*), onde o material genético é verificado e caso sejam detectadas alterações, são responsáveis por revertê-las. Os *checkpoints* são agentes que funcionam como supressores de crescimento e a perda ou mutação destes agentes induzem ao câncer (DOUGLAS; HADDAD, 2003). A progressão do ciclo celular é regulada essencialmente por quinases ciclina-dependentes (CDK). Cada CDK geralmente existe na forma fosforilada, associado a uma ciclina e inativa na célula. No tempo adequado do ciclo celular, o complexo ciclina/CDK é desfosforilado por Cdc25 e ativado. Cdc25A atua em ciclina E/CDK2 e é responsável pela progressão para a fase S, enquanto Cdc25C atua em ciclina B/CDK1 e é responsável pela progressão G2/M. As proteínas reguladoras dos checkpoints Chk1 e Chk2 exercem suas funções por fosforilação e inibindo estes homólogos Cdc25 (EASTMAN, 2004). Caso não seja possível reparar o DNA defeituoso, a célula é induzida à morte, por mecanismo de apoptose, ou prossegue para a fase mitose, em que as células filhas carregarão a falha genética, podendo levar ao desenvolvimento do câncer.

1.5. Mecanismos de morte celular: Necrose e Apoptose

As vias de morte celular foram estudadas isoladas durante muito tempo, já que se pensava que elas representavam estados celulares exclusivos. No entanto, na década passada, muitos estudos foram realizados sugerindo que a apoptose, necrose e autofagia são frequentemente regulados por vias similares, participam de locais sub-celulares e organelas comuns, e até mesmo compartilham moléculas iniciadoras e efectoras (NIKOLETOPOULOU et al., 2013).

Em 1964, foi proposto o termo "morte celular programada" para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental. Em 1972, Kerr, Wyllie e Currie sugeriram o termo apoptose para indicar esse tipo de morte celular. A apoptose tem sido intensamente estudada nas últimas duas décadas e é amplamente reconhecida como o principal mecanismo de morte regulamentado, devido não somente a um dano celular ou stress, mas também durante o desenvolvimento normal e morfogênese (NIKOLETOPOULOU et al., 2013). A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos

maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (MAURILLO et al., 2001).

A resistência anormal à apoptose pode conduzir ao aparecimento de neoplasias e doenças autoimunes, devido a persistência de células mutantes ou transformadas (RAMENGHI et al., 2000), enquanto que sua exacerbação acarreta o surgimento de doenças agudas neurodegenerativas e neuromusculares.

A apoptose pode ser desencadeada tanto por estímulos extrínsecos, através de receptores de morte da superfície celular, tais como TNF α (fator de necrose tumoral- α), Fas (CD95 / APO1) e receptores TRAIL, ou por estímulos intrínsecos através da sinalização via mitocondrial (NIKOLETOPOULOU et al., 2013). Em ambos os casos, a ativação de aspartil proteases de cisteína, denominadas caspases, resulta em permeabilização da membrana mitocondrial, condensação de cromatina e fragmentação do DNA, conduzindo assim à destruição da célula (NIKOLETOPOULOU et al., 2013). Estes eventos conferem à célula apoptótica uma morfologia distinta e característica, que inclui o arredondamento da célula de modo que o núcleo aparece picnótico, a cromatina condensa, ocorre a fragmentação do núcleo e o desprendimento de corpos apoptóticos, e a presença de vacúolos contendo citoplasma e organelas intactas.

O fenômeno da apoptose celular, quando iniciado, promove a ativação de eventos moleculares, que culminam na ativação de certas proteases, denominadas caspases, as quais são responsáveis pelo desmantelamento e morte celular (AMARANTE-MENDES; GREEN, 1999). As caspases são sintetizadas como precursores inativos denominados zimogênios. Após um sinal de morte celular, as caspases são ativadas por clivagem proteolítica. Essas enzimas podem interagir com receptores de membrana ou moléculas adaptadoras que contenham domínios de morte (*death domain*), pois esses domínios também existem nas caspases e a presença deles permite essa interação (BOATRIGT; SALVESEN, 2003). As caspases podem ser classificadas de acordo com seu pró-domínio e seu papel na apoptose. Caspases iniciadoras possuem pró-domínios longos, envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. Caspases efetoras apresentam pró-domínios curtos ou inexistentes, responsáveis pela clivagem de substratos (RUPNARAIN et al., 2004). Entre os diversos substratos das caspases pode-se citar a mdm-2 (*murine double minute*), uma proteína que se liga à p53, mantendo-a no citoplasma. Ao ser clivada pelas caspases, essa proteína libera a p53, que se transloca para o núcleo,

ativando a transcrição de genes pró-apoptóticos como o *Bax* (SCHULER et al., 2003).

A família Bcl-2 é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose, que participam ativamente da regulação da apoptose. Os membros da família Bcl-2, como Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo c e são chamados de reguladores antiapoptóticos. Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas (HENGARTNER, 2000). A expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria (VANDER HEIDEN et al., 1999). A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, como dano ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas. Esse desequilíbrio induz à apoptose (PETROS et al., 2004). Entre as proteínas mais estudadas desta família estão a Bax (pró-apoptótica) e a Bcl-2 (antiapoptótica). As proteínas Bax e Bcl-2 são capazes de formar homodímeros (Bax-Bax e Bcl-2-Bcl-2) e heterodímeros (Bax-Bcl-2), sendo que o equilíbrio entre esses homodímeros e heterodímeros pode definir o balanço pró-apoptótico ou antiapoptótico na célula. Após um estímulo de morte, a Bcl-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, pelo sequestro de Bax ou por competir por sítios que seriam ocupados pela Bax na membrana externa mitocondrial. A Bax pode promover a apoptose através da interação com a mitocôndria, de forma independente da interação com proteínas antiapoptóticas (PETROS et al., 2004) .

A superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (*tumor necrosis factor receptor*, rTNF) inclui diversos receptores, entre eles o rTNFR-1, Fas/CD95 e o TRAIL. Os membros da família do rTNF têm por principal característica um domínio extracelular rico em cisteína (ASHKENAZI, 2002). A inativação funcional dos rTNF com domínios de morte pode participar dos processos de tumorigênese, através da via extrínseca da apoptose, ou como elemento regulador do sistema imune. O receptor e ligante CD95 desempenham um papel importante na apoptose durante a morte de células T maduras no final da resposta imune e na morte de células infectadas por vírus. Foi observada uma correlação entre os níveis séricos de Fas/CD-95 solúvel e a incidência de linfomas. A explicação para este achado é de que o Fas/CD-95 solúvel compete com o ligante natural inibindo a apoptose (KRAMMER, 2000). Também foi demonstrado que mutações que afetam a

funcionalidade do Fas/CD-95 estão associadas a um efeito protetor da tumorigênese (FULDA; DEBATIN, 2006).

Ao entrar em apoptose, podem-se 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 que se concentra junto à membrana nuclear, formação de *blebs* (prolongamentos da membrana celular), externalização da fosfatidilserina na membrana, aumento de número e tamanho dos *blebs* que se rompem formando assim os corpos apoptóticos, que serão fagocitados por macrófagos sem causar inflamação (GRIVICICH et al., 2007; ELMORE, 2007; McHUGH; TURINA, 2006). Outra característica muito marcante da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico. Uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 (ou 185) pares de base.

Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio (HENGARTNER, 2000). A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial).

A via extrínseca (Fig. 4) é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases (BUDIHardjo et al., 1999). Todos os membros da família rTNF possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que eles reconheçam seus ligantes. Tal fato resulta na trimerização e consequente ativação dos receptores de morte específicos. A sinalização a seguir é mediada pela porção citoplasmática desses receptores que contém uma sequência de 65 aminoácidos chamada "domínio de morte" sendo, por isso, chamados de "receptores de morte celular". Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem a caspase-8, que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose (NAISMITH; SPRANG, 1998).

A via intrínseca (Fig. 4) é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são transduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria (HENGARTNER, 2000).

Figura 4. Vias de ativação da apoptose. Adaptado de FAVALORO et al., 2012.

Os sinais de morte, quando alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi$), bem como a uma transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). A água do espaço entre membranas passa para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela e liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma (GUPTA, 2003). Além disto, a indução do $\Delta\psi$ e TPM levam à perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) (KROEMER; REED, 2000). O aumento nos níveis de EROS leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso do $\Delta\psi$. A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose. Além disso, sabe-se que as EROS induzem a ativação das caspases 9 e 3 (GOTTLIEB, 2001). Alguns estudos indicam que durante o processo apoptótico ocorre a formação de um megaporo que abrange as membranas interna e externa da mitocôndria, ocorrendo

a liberação do citocromo *c* para o citoplasma onde participa da ativação da apoptose (WETZEL; GREEN, 1999). Estes sinais indutores de apoptose são detectados pela mitocôndria, fazendo com que ocorra um desacoplamento da cadeia respiratória e consequente liberação de citocromo *c* e proteínas ativadoras da apoptose para o citosol (GUPTA, 2003). No citosol, o citocromo *c* forma um complexo com a APAF-1 e a caspase-9, chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9, ativa. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai resultar na apoptose (PETROS, 2004; RUPNARAIN et al., 2004).

A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular levou a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer.

Considerando os estudos realizados até o momento que demonstraram que venenos de sapos podem induzir apoptose em uma ampla variedade de células cancerosas, o presente trabalho visa isolar toxinas presentes no veneno de *Rhinella schneideri* e avaliar suas ações sobre diversas linhagens tumorais, visando a identificação e caracterização de moléculas com uso potencial em terapias antitumorais.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este projeto tem como objetivo geral o isolamento de toxinas do veneno de *Rhinella schneideri*, a avaliação de sua ação antineoplásica em linhagens tumorais HL-60 (leucemia promielocítica aguda), MCF-7 (câncer de mama humano estrógeno dependente), SKBr-3 (câncer de mama humano estrógeno independente), HepG2 (hepatocarcinoma humano), PC-12 (tumor de glândula adrenal murino) e B16F10 (melanoma murino), e a investigação do mecanismo de morte celular em células HepG2. Será também avaliada a capacidade das toxinas em induzir instabilidade genômica (genotoxicidade e mutagenicidade) em células HepG2.

2.2. Objetivos específicos

- Extrair os componentes de baixa massa molecular presentes no veneno de *Rhinella schneideri* (VRs) através de diálise.
- Purificar estes componentes (toxinas) por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, em fase reversa e coluna C-18.
- Determinar a citotoxicidade das toxinas presentes na fração de baixa massa molecular do veneno (VRs) através do método espectrofotométrico de MTT em linhagens HL-60, PC-12, HepG2, B16F10, MCF-7, SKBr-3, L929 (fibroblastos saudáveis murino) e em hepatócitos primários (extraídos de fígado de ratos) através da avaliação da viabilidade celular.
- Avaliar a capacidade do VRs em induzir danos em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, através da análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$), do inchamento mitocondrial (swelling), da alteração do estado redox e da homeostasia do cálcio nestas organelas. Avaliar a capacidade do VRs em interferir na síntese de ATP e sob a respiração mitocondrial.
- Determinar a citotoxicidade de toxinas isoladas do veneno de *Rhinella schneideri* em células HepG2, e avaliar a capacidade destas toxinas de induzirem apoptose e/ou necrose na linhagem HepG2 por meio de ensaios de viabilidade celular, análise do ciclo celular, expressão de fosfatidilserina (Anexina V) e marcação com Iodeto de Propídeo (PI), dissipação do potencial de membrana mitocondrial, fragmentação nuclear e detecção da ativação das caspases 3, 8 e 9.

- Determinar a citotoxicidade das toxinas isoladas em hepatócitos primários extraídos de ratos Wistar sadios.
- Avaliar o efeito das toxinas isoladas em nível de DNA através do ensaio do Cometa (genotoxicidade) em células HepG2 e ensaio de indução de micronúcleos em células HepG2 binucleadas (mutagenicidade).

Materiais e

Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma abaixo (Fig. 5) apresenta os ensaios realizados neste trabalho com a fração de baixa massa molecular do veneno de *Rhinella schneideri* (VRs) e com as toxinas isoladas Rs1, Rs2 e Rs3.

Figura 5. Fluxograma dos ensaios realizados neste trabalho com a fração de baixa massa molecular do veneno de *Rhinella schneideri* (VRs) e com as toxinas isoladas Rs1, Rs2 e Rs3.

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Veneno de *Rhinella schneideri*

O veneno de sapo *Rhinella schneideri* (sapos machos e fêmeas, coletados na região de Ribeirão Preto, Brasil) foi colhido por pressão das glândulas parotóides (Fig. 6) dos animais previamente limpos, dessecado à vácuo em temperatura ambiente e conservado à -20°C , até o momento do uso. Os animais foram mantidos sob condições adequadas no Biotério Central da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto (Certificado de Regularidade do Biotério Central – IBAMA registro 1506748 – Anexo II).

Figura 6. Extração do veneno de *Rhinella schneideri* através da compressão de suas glândulas parotóides. Observa-se uma substância viscosa de cor amarelada. (Fonte: Acervo do Laboratório de Toxinas Animais)

3.1.2. Linhagens celulares

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram HL-60 (leucemia promielocítica aguda humana), HepG2 (hepatocarcinoma humano), PC-12 (tumor de glândula adrenal murino), B16F10 (melanoma murino), MCF-7 (câncer de mama humano estrógeno dependente), SKBr-3 (câncer de mama humano estrógeno independente) e L929 (fibroblastos saudáveis murino), e foram obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection*, Rockville, MD, EUA).

3.1.3. Animais experimentais

As mitocôndrias e hepatócitos primários foram isolados de fígados de ratos Wistar jovens, pesando aproximadamente 150 g, mantidos sob condições adequadas no Biotério Central da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto (biotério convencional), com temperatura em torno de 19 a 23°C e a ração servida “*ad libitum*”. Os ratos foram eutanasiados por decapitação, sem o uso de anestésico, para não interferir nos parâmetros bioenergéticos das mitocôndrias. O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto (Protocolo nº 13.1.765.53.2).

3.1.4. Reagentes

Os reagentes rotenona, cianeto de carbonila clorofenilhidrazona (CCCP), succinato, glutamato, malato, Ácido Etilenoglicol bis (β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), N-etil-maleimina (NEM), o-ftalaldeído (OPT), difosfato de adenosina (ADP) e safranina-o foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co (St Louis, MO, USA), enquanto que 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) e Calcium Green 5N foram adquiridos da Molecular Probe (OR, USA).

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico, preparados em água purificada por sistema Milli-Q.

3.1.5. Equipamentos e acessórios

- Balança Analítica Digital – *Ohaus*
- Balança Eletrônica Digital *BG-400* – *Gehaka*
- Centrífuga Eppendorf *5415R*
- Coletor de Frações conectado a duas Unidades Controladoras (Ótica e Ultravioleta – UV-1) e Registrador *REC 120*– *Pharmacia Biotech*
- Coluna HiPrep *Sephacryl*TM S-100 (1,6 x 60 cm – GE)
- Coluna para CLAE C-18 (ShimPak®, 250 x 4,6 mm, com partículas de 5 μ m – *Shimadzu*)
- Condutivímetro CD-20 – *Digimed*
- Cuba e fonte de eletroforese BioRad modelo *PowerPac*TM HC
- Eletrodo tipo Clark (*Oxytherm electrode unit*)

- Espectrofluorímetro *F-4500 - Hitachi*
- Espectrofotômetro computadorizado *U-2001 – Hitachi*
- Freezer -80°C – *Forma Scientific*
- Liofilizador *Flex-Dry™ MP – FTS Systems*
- Membrana de Filtração *Millex* para seringa 0,45 e 0,22 μm - *Millipore®*
- Oxígrafo *Hansatech instruments*
- pHmetro – modelo 8010 - *QUALXTRON*
- Sistema de Cromatografia Líquida *ÄktaBasic UPC* equipado com duas bombas, detector ultravioleta (UV), detector de condutividade, coletor de frações, acoplado a um microcomputador – *Amersham Biosciences*.
- Sistema de imagem *ChemiDoc™ MP BioRad*

3.2. MÉTODOS

Os ensaios mitocondriais e os ensaios utilizando a linhagem celular HepG2 foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta, do Departamento de Química da FFCLRP. Os ensaios de citotoxicidade nas linhagens PC-12, B16F10, HepG2 e HL-60 foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Suely Vilela Sampaio, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP, enquanto os ensaios com as células de câncer de mama (SKBr-3 e MCF-7) foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Maria Regina Torqueti Toloi, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP. Os ensaios de genotoxicidade foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes do departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP. O isolamento de hepatócitos primários foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Luciane Carla Alberici do Departamento de Física e Química da FCFRP.

3.2.1. Filtração do veneno de *Rhinella schneideri* por diálise

Foram suspensos 350 mg do veneno dessecado em 50 mL de água, sendo obtida uma suspensão mucosa de cor amarelada. Essa suspensão foi submetida à diálise contra água. Utilizaram-se membranas Fisherbrand MWCO 6000-8000 contendo 50 mL da amostra. A diálise foi realizada em béquer contendo 500 mL de água milli-Q. O processo de filtração ocorreu sob agitação e o veneno foi fracionado

em componentes de alta (acima de 6 kDa, retido pela membrana) e baixa (abaixo de 6 kDa, permearam a membrana) massa molecular. Foram realizadas 4 trocas de água, de 12 em 12 horas. A fração que permeou a membrana de diálise, contendo os componentes de baixa massa molecular do veneno de *R. schneideri* (VRs), foi congelada e posteriormente liofilizada e submetida à cromatografia de fase reversa em sistema FPLC.

3.2.2. Liofilização da água de diálise

As águas de diálise foram separadas em frascos com aproximadamente 200 mL cada um e congeladas a - 80°C. Posteriormente, foram liofilizadas e a amostra obtida corresponde à amostra contendo os componentes de baixa massa molecular do veneno de *Rhinella schneideri* (VRs).

3.2.3. Cromatografia de fase reversa em sistema FPLC

O fracionamento da amostra de baixa massa molecular (VRs) foi feito por FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) utilizando-se uma coluna C-18 de fase reversa, conforme metodologia descrita por BALDO (2015). A coluna foi equilibrada e inicialmente eluída com uma mistura de 85% de solução A (solução aquosa de TFA a 0,1%) e 15% de solução B (solução aquosa de TFA a 0,1 % + acetonitrila 80 %). A vazão foi de 0,8 mL/min e a amostra foi eluída com gradiente segmentado de acetonitrila chegando a 100% da solução B em aproximadamente 28 minutos.

A cromatografia da amostra foi realizada utilizando o comprimento de onda de 280 nm para a detecção dos constituintes da amostra, e resultou em aproximadamente 16 picos de absorbância, sendo que os de escolha para as análises subsequentes foram denominados de Rs1, Rs2 e Rs3.

3.2.4. Isolamento de hepatócitos primários

Os hepatócitos primários foram isolados de ratos Wistar sadios pesando aproximadamente 200 g.

Inicialmente, os ratos foram anestesiados com uma mistura 1:1 de cetamina 10% e xilasina 2%. Foi feita uma incisão longitudinal na cavidade abdominal do animal e os intestinos foram deslocados para a esquerda. As veias porta e cava no ramo inferior foram amarradas com ligaduras frouxas e a veia porta canulada. A ligadura da veia porta foi apertada e iniciou-se a perfusão com meio Krebs-Hanselet

contendo glicose 10 mM, NaCl 120 mM, KCl 4,8 mM, K_2HPO_4 1,2 mM, MgSO_4 1,2 mM, NaHCO_3 24mM, HEPES 10 mM e pH 7,4, penicilina 50.000 unidades/L, estreptomicina 50 mg/L, anfotericina B 125 $\mu\text{g/L}$ e ciprofloxacino 2 mg/mL, num fluxo de 10 mL/min, oxigenado e aquecido a 37°C. A veia cava foi seccionada no ramo inferior para dessangramento total do animal. A cavidade torácica foi aberta e o ramo superior da veia cava foi canulado. Aumentou-se lentamente a velocidade do fluxo para 30 mL/min e a ligadura do ramo inferior foi apertada para direcionamento do fluxo sentido veia cava ramo superior. A solução foi perfundida por mais 15 minutos em sistema aberto para estabilização das funções hepáticas. Perfundiou-se a solução de Krebs-Hanselet contendo collagenase 0,05% e CaCl_2 1,3 mM em sistema de recirculação por 7 minutos. O fígado foi retirado e colocado em placa de Petri contendo meio Krebs-Hanselet acrescido de CaCl_2 1,3 mM (meio de lavagem) em banho de gelo. As células foram cuidadosamente removidas do fígado com auxílio de um pincel e filtradas com 3 camadas de gaze estéril. A suspensão celular foi centrifugada a 60 g por 4 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado celular foi ressuspenso em meio de cultura MEM acrescido de soro bovino fetal 10%, penicilina 10.000 unidades/L, estreptomicina 100 mg/L, anfotericina B 250 $\mu\text{g/L}$ e ciprofloxacino 2 mg/mL (MEM completo).

3.2.5. Isolamento mitocondrial

Ratos Wistar, pesando aproximadamente 150 a 200 g, foram eutanasiados através de decapitação e o fígado (10-15 g) foi imediatamente removido, picotado com o auxílio de tesoura em 50 mL de meio de homogeneização (sacarose 250 mmol/L, EGTA 1 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2) a 4°C, lavado com o mesmo meio de homogeneização para retirada do excesso de sangue e homogeneizado em homogenizador Potter-Elvehjen (3 ciclos de 15 segundos com intervalos de 1 minuto). O homogenato foi centrifugado em centrífuga refrigerada (HITACHI Himac CR21E), a temperatura constante de 4°C, a 580 g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, desprezando-se o precipitado por possuir restos de células intactas, membranas e núcleos. O sobrenadante (onde estão as mitocôndrias) foi novamente centrifugado a 10300 g por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspenso em meio de lavagem (sacarose 250 mmol/L, EGTA 0,3 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2) e novamente centrifugado a 3400 g por 15 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e o precipitado contendo as

mitocôndrias foi ressuspensa em 1 mL de meio de ressuspensão (sacarose 250 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2) obtendo-se assim a suspensão mitocondrial que foi mantida em gelo e utilizada dentro de um período de 3 horas (PEDERSEN et al., 1978). A concentração de proteína mitocondrial foi determinada pela reação de Biureto (CAIN; SKILLETER, 1987). Uma alíquota de 10 μ L da amostra foi adicionada a 100 μ L de uma solução de ácido deoxicólico 5% (m/v) e água q.s.p. 1,5 mL. A essa mistura foi adicionado 1,5 mL de Reagente de Biureto. A absorbância foi monitorada em espectrofotômetro em comprimento de onda 540 nm, a partir de uma curva de calibração usando BSA como padrão.

3.2.6. Experimentos mitocondriais realizados com o VRs

3.2.6.1. Respiração mitocondrial

A respiração mitocondrial foi avaliada através do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias energizadas, monitorado polarograficamente em um oxígrafo equipado com um eletrodo tipo Clark (CHANCE; WILLIAMS, 1956). As mitocôndrias (1 mg de proteína/mL) foram incubadas em 1 mL do meio padrão (sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2). A respiração de estado III foi iniciada com 400 nmols de ADP (CAIN; SKILLETER, 1987). O meio reacional (sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L, K_2HPO_4 10 mmol/L e EGTA 0,5 mmol/L) foi suplementado com glutamato e malato 5 mmol/L cada como substratos oxidáveis de complexo I. As velocidades de consumo de oxigênio foram expressas em ng/átomo de oxigênio consumidos por miligrama de proteína mitocondrial por minuto, na ausência (controle) e presença das diferentes soluções do VRs. Foram realizados 3 experimentos utilizando suspensão mitocondrial de diferentes ratos.

O eletrodo de oxigênio é uma forma especializada na eletroquímica que consiste em dois eletrodos imersos em uma solução de eletrólito. Normalmente, uma solução a 50% saturada de KCl é usado em sistemas de eletrodos de oxigênio, sendo preparada por dissolução de 17,5 g de sal anidro em 100 mL de água deionizada a 25° C. Com a aplicação de uma tensão de polarização de 700 mV o eletrólito é ionizado e inicia-se o fluxo de corrente através de uma série de reações electroquímicas.

Dentro de uma determinada faixa de polarização, o fluxo de elétrons, ou seja, a corrente elétrica gerada é proporcional à concentração de oxigênio (BRACHT,

2003). O eletrodo de Clark é constituído por um cátodo de platina acoplado a dois ânodos de prata por meio de uma ponte de KCl saturada, e cobertos por uma membrana de teflon. Quando polarizado, o oxigênio dissolvido no meio de incubação é reduzido no cátodo de platina a íons OH^- . Este tipo de sensor por eletrodo foi inicialmente desenvolvido por Clark (1956) para medir oxigênio em amostras de sangue e muitas vezes é referido como eletrodo de Clark.

3.2.6.2. Níveis de ATP mitocondrial

Os níveis de ATP mitocondrial foram determinados por quimioluminescência utilizando-se o sistema luciferina-luciferase. A suspensão mitocondrial (1 mg de proteína/mL) foi centrifugada a 9000 *g* por 5 minutos, a 4°C, e o sedimento contendo as mitocôndrias foi tratado com 1 mL de HClO_4 . Após centrifugação a 14000 *g* por 5 minutos, a 4°C, alíquotas (100 μL) do sobrenadante foram neutralizadas com 70 μL de KOH 2 M, acrescidas de Tris-HCl 100 mM, pH 7,8 (volume final 1 mL), e novamente centrifugadas. A luminescência do sobrenadante foi medida, utilizando-se o “kit” da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) empregando um luminômetro AutoLumat LB953 Luminescence photometer (Perkin Elmer Life Sciences, Wildbad Germany). Foram realizados 3 experimentos utilizando suspensão mitocondrial de diferentes ratos.

3.2.6.3. Potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado através de espectrofluorímetro, monitorando-se as alterações na fluorescência da safranina-o, um corante catiônico fluorescente, que se distribui eletroforeticamente na matriz em resposta a carga negativa da membrana mitocondrial interna, utilizando-se comprimentos de onda de excitação em 495 nm e de emissão 586 nm (LEMASTERS et al., 1987). As mitocôndrias (1 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio padrão de reação (sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2), acrescido de rotenona 2,5 $\mu\text{mol/L}$ e safranina-o 10 $\mu\text{mol/L}$ e das soluções do VRs, em volume final de 2 mL, e energizadas pela adição de succinato de potássio 5 mmol/L. O potencial de membrana foi totalmente desfeito utilizando 5 μL de CCCP (Cianeto de Carbonila Clorofenilhidrazona) 1 mmol/L. A diminuição do potencial de membrana, correlaciona-se linearmente com o aumento da intensidade de fluorescência do corante na medida em que ele é liberado das mitocôndrias

(AKERMAN, 1976; EMAUS et al., 1986). Foram realizados 3 experimentos utilizando suspensão mitocondrial de diferentes ratos.

3.2.6.4. Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi monitorada espectrofluorimetricamente utilizando-se a sonda fluorescente H₂DCFDA nos comprimentos de onda de 503 nm para excitação e 529 nm para emissão. As mitocôndrias (1,0 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio padrão de reação (sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,20) acrescido de rotenona 2,5 µmol/L e H₂DCFDA 2 µmol/L e energizadas pela adição de succinato de potássio 5 mmol/L. Foram realizados o controle negativo (basal) e o positivo induzido por *t*-butilhidroperóxido 300 µmol/L.

Esta sonda é utilizada neste ensaio porque o DCFDA é uma molécula que atravessa facilmente as membranas biológicas e é hidrolisado por esterases liberando o composto não fluorescente DCFH. Este composto, em presença de EROs (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio), é rapidamente oxidado e transformado em DCF, que apresenta alto rendimento quântico de fluorescência quando excitado em 503 nm. Sendo assim, o aumento da fluorescência é diretamente proporcional à produção de EROs pelas mitocôndrias (AMES, 1983). Foram realizados 3 experimentos utilizando suspensão mitocondrial de diferentes ratos.

3.2.6.5. Avaliação do estado redox dos nucleotídeos de piridina

O estado redox dos nucleotídeos de piridina foi monitorado fluorimetricamente em comprimento de onda para excitação em 366 nm e 450 nm para emissão. As mitocôndrias (1,0 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio padrão de reação (sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L) acrescido de rotenona 2,5 µmol/L e energizadas pela adição de succinato de potássio 5 mmol/L. Foram realizados os controles negativo (basal) e positivo (induzido por *t*-butilhidroperóxido 300 µmol/L) (OLIVEIRA et al., 2005). Os nucleotídeos de piridina reduzidos (NAD(P)H) são fluorescentes, enquanto que os nucleotídeos de piridina oxidados (NAD(P)⁺) não o são. Desta forma, alterações na intensidade de fluorescência refletem mudanças no estado redox dos nucleotídeos de piridina.

Foram realizados 3 experimentos utilizando suspensão mitocondrial de diferentes ratos.

3.2.6.6. Níveis de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG)

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foram determinados espectrofluorimetricamente em comprimento de onda para excitação de 350 nm e 420 nm para emissão, utilizando o o-ftalaldeído (OPT) (HISSIN; HILF, 1976). As mitocôndrias (1,0 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio padrão de reação (sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L) acrescido de rotenona 2,5 µmol/L e succinato 5 mmol/L e diferentes concentrações do VRs por 30 minutos a 30° C. A reação foi interrompida com ácido perclórico (PCA) 1% e as suspensões mitocondriais levadas a centrifugação a 9000 g por 3 minutos. Alíquotas do sobrenadante (100 µL) foram adicionadas a 1,8 mL de tampão NaH₂PO₄ 100 mmol/L, pH 8,0 e EGTA 5 mmol/L e adicionando-se 100 µL de OPT (1 mg/mL). A fluorescência para GSH foi determinada após 15 minutos de incubação ao abrigo da luz. Os níveis de GSSG foram determinados pela adição de 250 µL de N-etil-maleimida (NEM) 0,04 M em alíquotas de 250 µL de sobrenadante. Após 20 minutos de incubação a temperatura ambiente, 500 µL de NaOH 10 mol/L foi adicionado a cada solução e 100 µL foram retirados e adicionados à 2 mL de NaOH 1 mol/L e 100 µL de OPT (1mg/mL). A fluorescência foi determinada após 15 minutos de incubação ao abrigo da luz. Foram realizados 3 experimentos utilizando suspensão mitocondrial de diferentes ratos.

A glutathiona é distribuída nas células e é responsável por muitas funções biológicas, sendo encontrada na forma oxidada (GSSG) que é rapidamente convertida para a forma reduzida (GSH) pela enzima glutathiona redutase. Este método consiste na utilização de um agente fluorescente que possui afinidade por GSH ou GSSG dependente do pH utilizando NEM para evitar a oxidação do GSSG (HISSIN; HILF, 1976).

3.2.6.7. Inchamento mitocondrial

O inchamento mitocondrial (“swelling”) foi monitorado através da diminuição da absorbância aparente da suspensão de mitocôndrias (0,4 mg proteína/mL), incubadas em 1,5 mL do meio padrão de reação (sacarose 125 mmol/L, KCl 65

mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L) acrescido de rotenona 2,5 μ mol/L, succinato 5 mmol/L e CaCl_2 10 mmol/L, utilizando-se espectrofotômetro em λ 540 nm. Foram realizados 3 experimentos utilizando suspensão mitocondrial de diferentes ratos.

O processo de inchamento mitocondrial é acompanhado da diminuição na turbidez da suspensão e, portanto, da diminuição proporcional na absorbância (LEMASTERS et al., 1999). O inchamento mitocondrial é observado espectrometricamente acompanhando-se a diminuição da dispersão de luz em um comprimento de onda específico. Isto ocorre porque a matriz inchada possui um índice de refração menor que a forma condensada, tornando-se perceptível as modificações na organização estrutural. A penetração de água ou solutos acompanhados de água promove o distanciamento de elementos estruturais, promovido por um rearranjo estrutural de sistemas macromoleculares, e este fenômeno pode ser acompanhado na sua velocidade ou na sua extensão, quando mantidas em condições constantes (ZORATTI; SZABO, 1995).

3.2.6.8. Movimentação e liberação de Ca^{2+}

A movimentação de Ca^{2+} foi monitorada utilizando-se o marcador fluorescente Calcium Green 5N, com comprimento de onda de excitação em 506 nm e 531 nm de emissão. Utilizou-se 1 mg de proteína mitocondrial em volume final de 2 mL de meio de reação padrão (sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L) acrescido de rotenona 2 μ mol/L + Ca^{2+} 10 mmol/L + Calcium Green 5N 150 nmol/L. As mitocôndrias foram energizadas com succinato de potássio 5 mmol/L e a captação e efluxo de Ca^{2+} foi monitorado por 600 segundos em espectrofluorímetro. O efluxo total de Ca^{2+} foi realizado utilizando-se CCCP 1 mmol/L. Observa-se uma diminuição na fluorescência do meio à medida que o Calcium Green 5N é captado pela mitocôndria (RAJDEV, 1993). Foram realizados 3 experimentos utilizando suspensão mitocondrial de diferentes ratos.

3.2.7. Cultivo celular

As linhagens tumorais utilizadas neste projeto foram adquiridas pela ATCC (American Type Culture Collection). As células HL-60, PC-12, MCF-7, SKBr-3 e L929 foram mantidas em meio RPMI 1640 (Gibco Life Technologies), enquanto as células HepG2 e B16F10 foram mantidas em meio MEM (Meio Mínimo Essencial Gibco, 41500-018). Os meios foram suplementados com 10% de soro bovino fetal

(Gibco), suspensão de antibiótico e antimicótico (SIGMA, penicilina G 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL). O cultivo das células foi feito em garrafas plásticas, e mantidas em estufa de CO₂ (5%) a 37° C. Células com confluência de 80-90% foram utilizadas para o início dos tratamentos. As células empregadas neste estudo estavam entre a 3ª e a 9ª passagem após o descongelamento. Em cada experimento, uma quantidade diferente de células é utilizada, por esse motivo utilizam-se as placas de cultura adequadas para o número de células e tempo de exposição do teste.

3.2.8. Viabilidade celular

O teste de viabilidade celular foi realizado antes de se iniciar qualquer experimento, segundo Tennant (1964). Neste ensaio foi utilizado o corante azul de Tripán, que é incorporado por células com membranas fragilizadas, indicando que as células já estão em um estágio de morte avançado. Este corante é usado na proporção de 1:1, pipetando-se 20 µL de corante para 20 µL de suspensão de células e, em seguida, é feita a leitura no microscópio. As células viáveis não são coradas e aparecem incolores, ao passo que as células mortas apresentam coloração azul. Através da equação abaixo, calcula-se a porcentagem de células viáveis, sendo que para a realização dos experimentos foram utilizadas culturas celulares com viabilidade igual ou superior a 98%.

$$\% \text{ de células viáveis} = (\text{células viáveis} / \text{total de células}) \times 100$$

3.2.9. Ensaio de Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados através do método colorimétrico do MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986).

Inicialmente, as células (5×10^4 cels/poço) foram incubadas em meio de cultura, em placa de 96 poços, resultando em volume final de 200 µL. Após 24 horas de incubação, necessária para a aderência das células (exceto para as células HL-60, que ficam em suspensão), o meio foi trocado, as células foram tratadas com as toxinas e levadas para estufa, mantidas a 37° C em 5% de CO₂, por 24 e/ou 48 horas. Após este período, o conteúdo dos poços foi descartado e em cada poço foram acrescentados 180 µL de meio sem vermelho de fenol e 20 µL de MTT (5

mg/mL em PBS). Após 3 horas de incubação, o conteúdo dos poços foi retirado e foram acrescentados 200 µL de DMSO, para a solubilização dos cristais formazan (coloração roxa), produzidos pelas células viáveis. Em seguida foi feita a leitura da absorbância em 570 nm em espectrofotômetro. Como controle positivo foi usado o Triton X-100 a 0,1% e o controle negativo foi realizado sem a adição das toxinas. Foram realizados 3 ensaios independentes em triplicata para cada concentração de toxina utilizada.

3.2.10. Análise da dissipação do potencial de membrana mitocondrial

Os ensaios para avaliar o potencial de membrana mitocondrial foram realizados segundo Imberti (1993).

Inicialmente, as células HepG2 (1×10^5 cels/poço) foram incubadas em meio MEM, em placa de 24 poços, resultando em volume final de 1 mL. Após 24 horas de incubação, para aderência das células, o meio foi trocado, as células foram tratadas com as toxinas e levadas para estufa mantida a 37° C em 5% de CO₂, por 24 e/ou 48 horas. Após este período, o conteúdo dos poços foi recolhido em tubos de fundo cônico de 15 mL com a ajuda de pipetas Pasteur, e foi feita uma lavagem com 1 mL de PBS. Em seguida, acrescentou-se 350 µL de tripsina (1:10) em cada poço e a placa foi incubada por 3 minutos. Após este tempo, as suspensões de células contidas nos poços foram recolhidas nos respectivos tubos e foi feita centrifugação a 220 g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e as células foram lavadas com 500 µL de meio completo sem vermelho de fenol. Foi feita nova centrifugação nas mesmas condições e os sobrenadantes foram descartados. Ao precipitado de células foram acrescentados 497 µL de meio sem fenol e 3 µL da solução de TMRM (Tetrametilrodamina Metil Ester) (6,6 µmol/L). Os tubos foram protegidos da luz e incubados a 37° C por 30 minutos. Fez-se nova centrifugação e os sobrenadantes foram descartados. Foram acrescentados 2 mL de solução 0,1% Triton X-100, homogeneizados e aguardou-se 5 minutos. Foi feita nova centrifugação a 1600 g por 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado para leitura da fluorescência em espectrofluorímetro (F-4500, Hitachi – Japão), usando-se comprimentos de onda de excitação 485 nm e de emissão 590 nm. Foram realizados 3 ensaios independentes em triplicata para cada concentração de toxina utilizada.

3.2.11. Análise de fragmentação nuclear

Os ensaios para avaliar a fragmentação nuclear foram realizados segundo os métodos descritos por Ciancio e colaboradores (1988).

Inicialmente, as células HepG2 (1×10^5 cels/poço) foram incubadas em meio MEM, em placa de 12 poços contendo uma lamínula circular em cada poço, resultando em volume final de 1 mL. Após 24 horas de incubação, para aderência das células, o meio foi trocado, as células tratadas com as toxinas e levadas para estufa mantida a 37° C em 5% de CO₂, por 24 e/ou 48 horas. Após este período, o meio foi descartado e os poços foram lavados com PBS. Em seguida, 2 mL de metanol foram adicionados em cada poço e a placa foi levada a -20° C por 2 horas. Após este período, os poços foram lavados com PBS e acrescentou-se 200 µL de solução de corante Hoechst 33342 a 5 mg/mL. A placa foi protegida da luz e incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, foram feitas duas lavagens com PBS e as lamínulas foram retiradas dos poços e fixadas em lâminas de vidro. As células foram quantificadas por microscopia de fluorescência (Leica DM 5000 B). Trezentas células foram avaliadas e o número de células apresentando fragmentação nuclear foi expresso como porcentagem em relação ao número total de células. Foram realizados 3 ensaios independentes em triplicata para cada concentração de toxina utilizada.

3.2.12. Análise do ciclo celular

Os ensaios de avaliação da distribuição do ciclo celular foram realizados baseados nos métodos descritos por Braylan e colaboradores (1982) e Crissman e Steinkamp (1973).

Inicialmente, as células HepG2 (1×10^5 cels/poço) foram incubadas em meio MEM, em placa de 12 poços, resultando em volume final de 1 mL. Após 24 horas de incubação, para aderência das células, o meio foi trocado, as células tratadas com as toxinas e levadas para estufa mantida a 37° C em 5% de CO₂, por 24 e/ou 48 horas. Após este período, o conteúdo dos poços foi recolhido em tubos de fundo cônico de 15 mL com a ajuda de pipetas Pasteur e foi feita uma lavagem com 1 mL de PBS. Em seguida, acrescentou-se 350 µL de tripsina (1:10) em cada poço e a placa foi incubada por 3 minutos. Após este tempo, as suspensões de células contidas nos poços foram recolhidas nos respectivos tubos e foi feita a centrifugação a 220 g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados

ressuspendidos em 500 μ L de PBS gelado e mantidos em gelo durante todo o experimento. Em seguida, foram acrescentados 500 μ L de etanol a 100%, e aguardou-se 1 hora. Ao término deste período, acrescentou-se 1 mL de soro bovino fetal nos tubos, que foram centrifugados nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram aspirados cuidadosamente e adicionou-se 2 mL de PBS em cada tubo. Foi feita outra centrifugação e os sobrenadantes descartados. Adicionou-se ao “pellet” 330 μ L de PBS e 1 μ L de solução de RNase (10mg/mL), e incubou-se em banho-maria a 37° C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 125 μ L de solução de iodeto de propídeo (5mg de PI/ 100mL de solução de citrato de sódio 1,12% p/v) e incubados a temperatura ambiente por 30 minutos. As análises foram realizadas por citometria de fluxo, no equipamento FACSCanto I (Bencton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), onde foram analisados 10.000 eventos, e os resultados foram avaliados pelo programa MOD-FIT. Foram realizados 3 ensaios independentes em triplicata para cada concentração de toxina utilizada.

3.2.13. Ensaios de avaliação de apoptose/necrose utilizando anexina V e iodeto de propídeo (PI)

Os ensaios realizados com anexina V/ PI foram baseados nos métodos descritos por Zhivotovsky et al. (1999).

Inicialmente, as células HepG2 (1×10^5 cels/poço) foram incubadas em meio MEM, em placa de 6 poços, resultando em volume final de 3 mL. Após 24 horas de incubação, para aderência das células, o meio foi trocado, as células foram tratadas com as toxinas e levadas para estufa mantida a 37° C em 5% de CO₂, por 24 e/ou 48 horas. Após este período, o conteúdo dos poços foi recolhido em tubos de fundo cônico de 15 mL com a ajuda de pipetas Pasteur, e foi feita uma lavagem com 1 mL de PBS. Em seguida, acrescentou-se 350 μ L de tripsina (1:10) em cada poço e a placa foi incubada por 3 minutos. Após este tempo, as suspensões de células contidas nos poços foram recolhidas nos respectivos tubos e foi feita centrifugação a 220 g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e foi feita nova lavagem com 1 mL de PBS gelado. Foi realizada nova centrifugação sob as mesmas condições. A partir deste momento, o experimento foi realizado em banho de gelo. Novamente o sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 100 μ L de solução de anexina V (0,25 μ g/mL em tampão de ligação). Após homogeneização, o

conteúdo dos tubos cônicos foi transferido para tubos de citometria. Imediatamente antes da leitura por citometria de fluxo, foram acrescentados 100 μ L de solução de iodeto de propídeo (5 μ g/mL em tampão de ligação). O branco do experimento foi lido apenas com PBS (200 μ L). O controle negativo foi realizado sem a adição das toxinas e o controle positivo foi feito com a adição de cisplatina (0,16 mg/L). As análises foram realizadas por citometria de fluxo, no equipamento FACSCanto I (Bencton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA), onde foram analisados 10.000 eventos. Foram realizados 3 ensaios independentes em triplicata para cada concentração de toxina utilizada.

3.2.14. Detecção da ativação das caspases 3, 8 e 9

Inicialmente, as células HepG2 (5×10^5 cels/poço) foram incubadas em meio MEM, em placa de 6 poços, resultando em volume final de 3 mL. Após 24 horas de incubação, para aderência das células, o meio foi trocado, as células foram tratadas com as toxinas e levadas para estufa mantida a 37° C em 5% de CO₂, por 24 e 48 horas. Após este período, o meio de cultivo foi descartado, as células lavadas com PBS, tripsinizadas, lavadas novamente com PBS e o precipitado celular resultante (amostras) foi congelado.

Com todas as amostras prontas, estas foram descongeladas e foi realizada a extração de proteínas adicionando-se tampão RIPA (50 mmol/L de Tris/HCl, pH: 7,4.; 150 mM de NaCl; 1 mM de EDTA; 1% triton; 1% deocoxilato; 0,1% SDS) contendo mix de inibidor de proteases (Sigma- AEBSF 2 mM, Aprotinina 0,3 μ M, Bestatina 130 μ M, EDTA 1 mM, E-64 14 μ M, Leupeptina 1 μ M) às amostras, que foram submetidas a 3 ciclos de ultrassom de 5 minutos, intercalado em banho de gelo e agitação de 15 seg em vórtex. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20°C por 24 horas. Após este período a amostra foi descongelada e foram repetidos os três ciclos no ultrassom, seguidos então por centrifugação a 15.000 g por 20 minutos. O sobrenadante, que contém a fração total de proteínas celulares, foi recolhido e armazenado a -20 °C.

A quantificação das proteínas no tampão de extração foi feita utilizando-se o “kit” da Bio-Rad DC (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), baseado no método descrito por Bradford (1976). O ensaio foi realizado em microplacas com volume total de 220 μ L por poço, com faixa de linearidade 0,5 a 2,0 μ g de proteínas. Foram utilizados 20 μ L

de amostra diluída em água destilada (foram realizadas três diluições 50x, 100x e 150x), 200 µL do reagente de Bradford. O volume total utilizado em cada poço da microplaca foi mantido constante (220 µL). Após 15 minutos de incubação as absorvâncias foram mensuradas utilizando leitor de ELISA (Versamarx Tunable Microplate Reader) com leitura a 595 nm. Uma curva padrão, com 5 pontos correspondentes a quantidades conhecidas (0,0 a 2,0 µg) de BSA (soro albumina bovina fração V, BioRad) foi feita a cada ensaio realizado. Foram feitas triplicatas para cada amostra. O coeficiente de variação foi sempre menor que 10%.

Para cada amostra, foi coletado o correspondente a 100 µg de proteínas, que foram então diluídas em tampão de amostra Laemmli sample Buffer Bio-rad 2X (Tris-HCl 65,8 mmol/L pH 6,8; 2,1% SDS; 26,3% glicerol; 0,01% azul de bromofenol) e 5% β-mercaptoetanol, aquecidas a 85 °C por 5 minutos em banho seco e submetidas a eletroforese em gel SDS-Page (acrilamida/bis-acrilamida), por aproximadamente 15 minutos a 80V e 1,5 hora a 100V em cuba de eletroforese (Mini-Protean tetra cell; Bio-rad). O gel de separação foi preparado a 12,5% de acrilamida/bis-acrilamida, com tampão Tris 1,5 mol/L (pH 8,8) e 0,08% de SDS e o gel de empilhamento (stacking gel) a 5% de acrilamida/bis-acrilamida, com tampão Tris 0,5 mol/L (pH 6,8) e 0,1% de SDS. Foi utilizado tampão de corrida da Bio-rad (Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,3, glicina 192 mmol/L e SDS 0,1%).

Foi utilizado o padrão de proteínas caleidoscópio (10-250 kD) (Precision plus proteins Standadas, Kaleidoscope, Bio-rad) para comparação com a massa molecular das proteínas das amostras e como controle de qualidade da transferência.

Terminada a corrida, as bandas proteicas foram transferidas para a membrana de PVDF (Immun-Blot PVDF® Membranes for protein blotting 162-0177, bio-rad) utilizando-se uma cuba de transferência (Mini tras-blot ; Bio-rad), por 30 minutos a 100V e 30 mA e 1 hora a 120 V e 30 mA. O tampão de transferência utilizado foi o da Bio-rad (Tris 20 mmol/L pH 8,3, glicina 192 mmol/L e metanol 20%).

Após a transferência das bandas proteicas, para evitar ligações inespecíficas, fez-se o bloqueio da membrana por meio da incubação com uma solução de TBS-T (Tris 25 mmol/L pH 7,6, NaCl 150 mmol/L e 0,1% de Tween 20) contendo 5% de leite (Blotting-grade blocker) por 1 hora sob constante agitação, e logo depois foram realizadas duas lavagens rápidas e mais três lavagens de 15 minutos com TBS-T.

A membrana foi incubada “overnight” com o anticorpo primário a 4 °C sob constante agitação e em seguida lavada (duas vezes rapidamente e três lavagens de 15 minutos) com TBS-T. Logo após, procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário por 1 hora, sob constante agitação. Terminado o intervalo de exposição, a membrana foi submetida a duas lavagens rápidas e três de 15 minutos com TBS-T.

As bandas proteicas foram reveladas utilizando-se o kit ECL™ Prime (GE Healthcare RPN 2232), de acordo com as especificações do fabricante. A revelação por quimioluminescência foi feita no equipamento ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad; EUA) por meio do software Image LAB™ 4.1 (Bio-Rad; EUA) para Windows. Os dados obtidos foram analisados no software ImageJ 1.48 para Windows.

O procedimento realizado foi o mesmo para as três caspases avaliadas, variando-se apenas os anticorpos primários e secundários utilizados em cada teste.

Para os anticorpos primários foi utilizada a diluição de 1:250 em TBS-T contendo 10% de WesternDot™ (Invitrogen) Tampão de Bloqueio. Todos os anticorpos secundários foram diluídos 1:1000 em TBS-T contendo 10% de WesternDot™ Tampão de Bloqueio.

Uma vez que as bandas referentes à caspase em questão foram reveladas, a membrana passou por um processo para retirada da marcação anterior, denominado “strip”, para em seguida serem marcadas as bandas referentes a uma proteína controle, a β -actina. Este processo se faz necessário devido ao peso molecular da β -actina (45 kDa) ser próximo do peso das caspases analisadas.

No processo de remoção da marcação anterior (“strip”), a membrana foi incubada por 1 hora, a 56 °C, em tampão contendo Tris 0,5 mmol/L (pH 6,8), SDS 2% e β -mercaptoetanol 100 mmol/L. Logo após, foram realizadas três lavagens de 15 minutos com TBS-T, seguidas pelo bloqueio por 1 hora com uma solução de TBS-T contendo 5% de leite (Blotting-grade blocker). Posteriormente, foram feitas duas lavagens rápidas e três lavagens de 15 minutos com TBS-T, e prosseguiu-se com a incubação com os anticorpos primários (β -actina) e secundários, e finalmente foi feita a revelação das bandas proteicas conforme descritos acima.

A caspase 3 utilizada nos ensaios foi adquirida da Santa Cruz Biotechnology (SC56046), e as caspases 8 e 9 foram adquiridas da Cell Signaling (#9746 e #9502,

respectivamente). A β -actina foi adquirida da Cell Signaling (#3700). Os anticorpos secundários *anti-mouse* e *anti-rabbit* também foram adquiridos da Cell Signaling (#7076S e #7074S, respectivamente).

3.2.15. Ensaios de genotoxicidade / mutagenicidade

3.2.15.1. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com métodos descritos por Singh e colaboradores (1988) e Tice e colaboradores (2000).

Inicialmente, as células HepG2 (1×10^5 cels/poço) foram incubadas em meio MEM, em placa de 6 poços, resultando em volume final de 3 mL. Após 24 horas de incubação, para aderência das células, o meio foi trocado, as células foram tratadas com as toxinas e levadas para estufa mantida a 37° C em 5% de CO₂, por 4 horas. Após este período, o conteúdo dos poços foi recolhido em tubos de fundo cônico de 15 mL com a ajuda de pipetas Pasteur, e foi feita uma lavagem com 1 mL de PBS. Em seguida, acrescentou-se 1 mL de tripsina (1:10) em cada poço e a placa foi incubada por 3 minutos. Após este tempo, as suspensões de células contidas nos poços foram recolhidas nos respectivos tubos e foi feita a centrifugação a 220 g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os tubos contendo as suspensões celulares foram mantidos em banho de gelo. Neste momento, foi avaliada a viabilidade celular de cada amostra, utilizando-se o corante Trypan Blue. As amostras deveriam apresentar viabilidade igual ou superior a 80% para prosseguir o experimento. Em seguida, foram homogeneizados 100 μ L da suspensão celular de cada amostra com 250 μ L de agarose LMP (baixo ponto de fusão). Esta mistura foi disposta em lâminas de agarose (foram confeccionadas 2 lâminas por amostra), e foram acrescentadas as lamínulas. As lâminas foram colocadas em geladeira por 30 minutos. Após este período, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram mergulhadas em solução de lise recém-preparada (NaCl 2,5M, EDTA 100mmol/L, TRIS 10mmol/L, Triton 1%; DMSO10%, pH=10) por 20 horas a 4° C. Após a lise, as lâminas foram imersas em solução alcalina (300 mM NaOH, 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos a 4°C, para que ocorresse o desnovelamento das cadeias de DNA. Após esse período, as lâminas foram levadas à cuba de eletroforese, de modo a induzir a migração dos fragmentos de DNA resultantes de danos. A eletroforese foi conduzida em solução alcalina (300 mM

NaOH, 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos com voltagem e amperagem constantes (25V/300A). Após a corrida eletroforética, as lâminas foram imersas em solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 minutos. Quando as lâminas estavam quase secas, foram colocadas em coppling com etanol absoluto por 2 minutos, para promover a fixação. Em seguida, estas lâminas ficaram em temperatura ambiente até secagem completa. As lâminas foram coradas imediatamente antes de cada leitura (esperar 4 minutos para fixação do corante) com 200 µL de solução de GelRed (1µL de GelRed : 10 mL de água milliQ) e examinadas no microscópio de fluorescência Olympus Bx50 (Olympus America INC, Melville, NY), em objetiva de 40X. Utilizando-se o software Comet IV, 100 nucleóides de cada lâmina foram analisados. Foram realizados 3 experimentos independentes.

O controle negativo foi realizado sem a adição das toxinas e o positivo com 15 µg/mL de MMS (metil metano sulfonato).

O princípio deste ensaio baseia-se no fato de que o DNA da célula que não apresentar dano migrará de forma homogênea durante a corrida eletroforética formando um círculo. Caso o DNA apresente dano, serão formados fragmentos de diversos tamanhos, de modo que, durante a eletroforese, os fragmentos menores migrarão mais rapidamente em relação aos fragmentos maiores (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990).

3.2.15.2. Ensaio do micronúcleo

O ensaio do micronúcleo foi realizado baseado em métodos descritos por Fenech (2000). Este teste avalia a ocorrência ou não de mutagenicidade.

Inicialmente, as células HepG2 (1×10^5 céls/poço) foram incubadas em meio MEM em placas de 6 poços, resultando em volume final de 3 mL, por 24 h a 5% CO₂ a 37°. Após este período, as células foram tratadas com as toxinas e novamente encubadas por mais 20 h. O meio de cultivo de cada poço foi desprezado e adicionou-se 3 mL de PBS a 37 °C para lavagem das células. Em seguida, retirou-se o excesso de PBS com pipeta Pasteur e foram colocados 3 mL de meio de cultivo completo a 37°C em cada poço. Após, adicionou-se 30 µL da solução de citocalasina B de uso (concentração final de 3,0 µg/mL). As placas foram novamente colocadas na estufa a 37°C com 5% de CO₂ por mais 28 horas. Posteriormente, foram acrescentados 0,5 mL de tripsina 0,1% e as placas foram colocadas na estufa por 5 min. A tripsina foi inativada com meio de cultura contendo soro bovino fetal. Os

meios de cultura e as suspensões celulares foram transferidos para tubos de centrífuga e centrifugados por 5 min a 220 g. O sobrenadante foi retirado e 5 mL da solução de citrato de sódio foi adicionada aos tubos, que posteriormente foram homogeneizados. Foram adicionados 20 µL de formol em cada tubo, que novamente tiveram o conteúdo homogeneizado. O material foi submetido a uma nova centrifugação a 220 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e 5 mL do fixador metanol/ácido acético 3:1 foi adicionado. O conteúdo foi homogeneizado e centrifugado a 220 g por 5 min. O sobrenadante foi retirado. Para cada tratamento, 2 lâminas foram confeccionadas. Em cada uma foram colocados 50 µL de suspensão de células e aguardou-se a secagem das mesmas. As lâminas foram coradas imediatamente antes de cada leitura com 1 mL de solução de Acridina 40 µg/mL (esperar 2 minutos para fixação do corante e, em seguida, lavar a lâmina com água corrente) e examinadas no microscópio de fluorescência Olympus Bx50 (Olympus America INC, Melville, NY), em objetiva de 40X.

Para cada grupo experimental foram analisadas 2 lâminas e, em cada lâmina, 500 células foram classificadas como mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e tetranucleadas, sendo que 1000 células binucleadas foram analisadas quanto a presença dos biomarcadores de danos ao DNA (micronúcleo, ponte nucleoplasmática e broto nuclear). Essa contagem tem como finalidade a realização do índice de divisão nuclear (IDN), que pode ser calculado por meio da fórmula:

$$\text{IDN} = [M1 + 2 (M2) + 3 (M3) + 4 (M4)] / N$$

Onde M1-M4 representam os números de células com 1, 2, 3 e 4 ou mais núcleos, respectivamente, e N é o número total de células contadas. Esse índice fornece uma medida do estado proliferativo das células viáveis. Além disso, foi analisada a porcentagem de células binucleadas. Segundo Fenech (2000), para a análise de micronúcleos, as células devem apresentar um percentual de células binucleadas (BN) acima de 35%.

Para o ensaio do micronúcleo, o controle positivo utilizado foi a doxorrubicina 0,03 µg/mL. Cada concentração foi avaliada em triplicata e os resultados analisados estatisticamente.

3.2.16. Análise estatística

A significância estatística dos dados experimentais foi avaliada pela análise de variância (one-way ANOVA), seguida pelo teste de Dunnet. Este teste estatístico foi escolhido para a comparação dos grupos tratados em relação aos seus controles, utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 5.0 (San Diego, CA, U.S.A.). Os resultados com valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento das toxinas através de cromatografia de fase reversa em sistema FPLC

A extração do veneno bruto de *Rhinella schneideri* foi feita através da compressão das glândulas parotóides do animal, obtendo-se um veneno com coloração amarelada, com uma grande quantidade de muco e com textura pastosa (Fig. 6).

A separação dos compostos do veneno bruto de *Rhinella schneideri* foi feita através de uma membrana de diálise, e resultou em uma fração de baixa massa molecular (moléculas que permearam a membrana) e uma fração de alta massa molecular (moléculas que não permearam a membrana). As moléculas menores são capazes de atravessar a membrana por difusão passiva e, ao atingir concentrações iguais dos dois lados da membrana, atingem o equilíbrio. Desta forma, na porção de alta massa molecular retida dentro do saco de diálise também conterá uma porção de moléculas de baixa massa molecular. Já a água de diálise conterá apenas as moléculas de baixa massa molecular. Devido ao grande volume da água de diálise (2 L), esta foi submetida ao processo de liofilização, para concentração dos compostos, que foram, então, submetidos ao fracionamento através de cromatografia.

Dentre as moléculas de baixa massa molecular são encontradas uma diversidade de estruturas químicas, dentre elas: heterosídeos cardiotônicos, alcaloides indólicos e ácidos orgânicos. A fração de baixa massa molecular do veneno de *R. schneideri* (**VRs**) foi escolhida por conter os bufadienolídeos, que, como demonstrado por estudos publicados na literatura, têm demonstrado atividade antineoplásica em uma vasta gama de células tumorais. Portanto, a VRs é a fração mais promissora para se alcançar os objetivos propostos neste trabalho.

Segundo Su e colaboradores (2003), a atividade antitumoral do Huachansu pode ser atribuída principalmente aos heterosídeos cardiotônicos bufalina, resibufogenina e cinobufagina. Estes compostos demonstraram induzir a inibição do crescimento celular, a parada do ciclo celular e a apoptose em diversas linhagens de células tumorais, tais como células de câncer do endométrio, de câncer de ovário, de câncer gástrico, carcinoma hepatocelular, leucemia, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de cólon, osteossarcoma e câncer de bexiga (LI et al., 2009; TAKAI et

al., 2012). Os bufadienolídeos pertencem a classe dos heterosídeos cardiotônicos (TIAN et al., 2010) e apresentam um esqueleto molecular esteroidal e um anel lactônico contendo 6 átomos (Fig. 7).

Figura 7. Esquema representando a estrutura química dos heterosídeos cardiotônicos. Pode-se observar na parte superior da figura o exemplo de uma molécula completa, apresentando três constituintes: o glicosídeo, o núcleo esteroidal e o anel lactônico. O anel lactônico de cardenolídeos provenientes de plantas contém 5 átomos, mas nos bufadienolídeos obtidos de anfíbios o anel lactônico apresenta 6 átomos, como apresentado acima (grupo R). Pode-se observar também que estruturas contendo apenas o anel lactônico e o núcleo esteroidal (sem o açúcar) formam a parte aglicona ou genina da molécula. O exemplo apresentado é a bufalina. *Fonte:* BALDO, 2015.

A amostra do veneno de *Rhinella schneideri* contendo os componentes de baixa massa molecular (**VRs**) (amostra resultante da liofilização da água de diálise) foi submetida à cromatografia em sistema de FPLC em coluna de fase reversa C-18, na qual a separação foi feita com o aumento do gradiente de concentração de acetonitrila (solução B, 80% de acetonitrila e TFA 0,1%) e no comprimento de onda de 280 nm (Fig. 8).

Figura 8. Perfil cromatográfico da amostra de baixa massa molecular do veneno de *Rhinella schneideri* (VRs) em coluna de fase reversa C-18. A coluna foi inicialmente equilibrada com solução A (solução aquosa de TFA 0,1%). A vazão foi de 0,8 mL/min e a amostra foi eluída com gradiente segmentado de acetonitrila, partindo de 15 e chegando a 100% da solução B (solução aquosa de TFA 0,1 % + acetonitrila 80 %), em aproximadamente vinte e oito minutos. Posteriormente, a coluna foi reequilibrada em solução A.

Através da análise do perfil cromatográfico da amostra, percebe-se que há vários picos não totalmente separados, mas nota-se a presença de 3 subfrações com picos bem definidos (indicativo da pureza das amostras), eluídas ao final da corrida e que foram nominadas Rs1, Rs2 e Rs3. As substâncias correspondentes a este picos foram coletadas e liofilizadas, a fim de serem utilizadas nos experimentos subsequentes. Adicionalmente, estudos anteriores do grupo (BALDO, 2015), verificaram a eluição de bufadienolídeos neste região do cromatograma.

4.2. Identificação das toxinas isoladas

A identificação provável das toxinas Rs1, Rs2 e Rs3, isoladas pela cromatografia de fase reversa da VRs, foi feita através de comparação dos dados obtidos neste estudo (perfil cromatográfico e massa molecular das toxinas) com dados obtidos por integrantes do nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Toxinas Animais (BALDO, 2015) e dados de literatura (SCIANI et al., 2013) .

Baldo (2015) identificou a Rs3 (nomeada como Rs5 por Baldo, 2015) como a molécula de bufalina, através da comparação do perfil de eluição obtido do VRs e da bufalina adquirida comercialmente. A confirmação de que a Rs3 é a bufalina foi feita

através de cromatografia gasosa seguida de espectrometria de massas (CG-EM). Baldo (2015) também identificou Rs3 como a bufalina (386 Da) através da comparação dos fragmentos obtidos da Rs3 (MS-MS) com a base de dados encontrada na literatura.

As moléculas Rs1 e Rs2 tiveram suas massas moleculares determinadas por espectrometria de massas (BALDO, 2015), obtendo-se 400 e 402 Da, respectivamente. A comparação do perfil cromatográfico obtido neste trabalho com o perfil cromatográfico (cromatografia de fase reversa em coluna C18, eluição com gradiente de 0 a 90% de acetonitrila em TFA 0,1%) de outras espécies de sapos encontrados na fauna brasileira, pertencentes aos gêneros *Rhaebo* e *Rhinella* (SCIANI et al., 2013), dentre elas o *Rhinella schneideri*, indica que as toxinas Rs1 e Rs2 são, provavelmente, a marinobufagina e telocinobufagina, respectivamente (Fig. 9). A eluição das frações Rs1, Rs2 e Rs3, é semelhante a dos picos 11 (marinobufagina), 3 (telocinobufagina) e 8 (bufalina) obtidos por SCIANI et al. (2013). Porém, para a confirmação da identidade destas toxinas devem ser realizados outros métodos de identificação, como a CG-EM e/ou RMN (Ressonância Magnética Nuclear). Desta forma, as toxinas continuarão sendo chamadas de Rs1, Rs2 e Rs3 no decorrer deste trabalho.

Figura 9. Perfis obtidos da cromatografia de fase reversa em sistema HPLC do veneno de diferentes espécies de sapos encontrados na fauna brasileira, *R. crucifer*, *R. marina*, *R. granulosa* e *Rhinella schneideri*. Pico 11: marinobufagina; Pico 3: telocinobufagina; Pico 8: bufalina. Fonte: SCIANCI et al., 2013.

As estruturas das toxinas marinobufagina, telocinobufagina e bufalina estão representadas a seguir (Fig. 10).

Figura 10. Estruturas dos heterosídeos cardiotônicos Marinobufagina, Telocinobufagina e Bufalina. Baseado em STEYN; HEERDEN, 1998.

4.3. Ensaios realizados com o VRs

4.3.1. Ensaios de citotoxicidade

Extratos obtidos a partir de venenos de sapos de diferentes espécies demonstraram ser citotóxicos para uma grande variedade de células tumorais. O veneno do sapo *Bufo bufo gargarizans* Cantor apresentou citotoxicidade e induziu à apoptose células de carcinoma hepatocelular SMMC-772, Bel-7402 e HepG2, células de carcinoma gástrico humano BGC-823, células leucêmicas humanas U937 e HL-60, células de adenocarcinoma de pulmão A 549 (QI et al., 2011). Um estudo conduzido por Sciani e colaboradores (2013) utilizando venenos brutos de 7 espécies de sapos da fauna brasileira, dentre eles o *R. schneideri*, avaliou a citotoxicidade destes venenos em células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, e como resultado demonstrou que alguns venenos são citotóxicos para as duas linhagens celulares, enquanto outros são citotóxicos apenas para uma destas linhagens, o que demonstra que os venenos e seus compostos são seletivos para diferentes tipos celulares. Desta forma, a primeira etapa deste trabalho consistiu em avaliar os efeitos citotóxicos do VRs em diversas linhagens tumorais.

Inicialmente, a atividade citotóxica da amostra de baixa massa molecular do veneno de *Rhinella schneideri* (VRs), foi avaliada nas linhagens celulares PC-12, B16F10, HepG2 e HL-60 (Fig. 11). As concentrações do VRs utilizadas foram 5, 10,

20, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Estas concentrações foram escolhidas após a realização de vários ensaios do MTT e ajuste de dose. Foram considerados controles negativos (100% de viabilidade celular) os ensaios realizados com células sem tratamento com o VRs. No controle positivo (morte celular) foi utilizado o Triton X-100 (Sigma Aldrich) a 1%, e também foram utilizadas culturas tratadas com 0,33 mg/mL de cisplatina (Darrow®), por se tratar de um agente antineoplásico utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer em humanos (PABLA; DONG, 2012).

Figura 11. Viabilidade celular avaliada por MTT em linhagens celulares **(A)** PC-12, **(B)** B16F10, **(C)** HepG2 e **(D)** HL-60, após tratamento com o VRs. Avaliação da citotoxicidade do VRs em diferentes concentrações (5-100 $\mu\text{g/mL}$) após 24 horas de tratamento. Resultados expressos pela média $\pm$ S.E.M. para 3 experimentos independentes. CN (controle negativo). CP (controle positivo – Triton X-100 0,1%). Cis (cisplatina 0,33 mg/mL). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ - diferença estatisticamente significante em relação ao controle negativo.

A linhagem celular PC-12 (Fig. 11 A) demonstrou ser a menos sensível aos efeitos do VRs (de 72 a 93% de viabilidade celular). Apenas nas concentrações de 5 e 100 $\mu\text{g/mL}$ foi observada diferença estatística significativa em relação ao grupo controle. Não foi evidenciada relação concentração-resposta.

Para a linhagem B16F10 (Fig. 11 B) pôde-se notar que houve uma diminuição notável da viabilidade celular quando as células foram tratadas com o VRs. Houve diferença estatística significativa para todas as concentrações utilizadas do VRs, sendo que os valores de viabilidade celular se mantiveram próximos (de 32 a 40%), não havendo também relação concentração-resposta.

O tratamento das células HepG2 (Fig. 11 C) com o VRs resultou em diminuição da viabilidade celular em todas as concentrações utilizadas e a viabilidade variou de 76 a 84%. Já a linhagem celular HL-60 (Fig. 11 D) demonstrou ser a mais sensível ao tratamento com o VRs. Os valores de viabilidade celular obtidos para todas as concentrações utilizadas do VRs foram baixos, variando de 17 a 20%. Devido a esta maior sensibilidade, foram realizados outros ensaios do MTT com esta linhagem celular, utilizando concentrações menores do VRs, a fim de se identificar a partir de qual concentração começa a haver citotoxicidade (Fig. 12).

Figura 12. Viabilidade celular avaliada por MTT em linhagem HL-60 após tratamento com o VRs. Avaliação da citotoxicidade do VRs em diferentes concentrações (0,001-1000 µg/mL) após 24 horas de tratamento. Resultados expressos pela média $\pm$ S.E.M. para 3 experimentos independentes. CN (controle negativo). CP (controle positivo – Triton X-100 0,1%). Cis (cisplatina 0,33 mg/mL). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ - diferença estatisticamente significante em relação ao controle negativo.

Como se pode observar na figura 12, na menor concentração utilizada do VRs (0,001 µg/mL) a maioria das células se mantiveram viáveis (~95 %). Na concentração de 0,01 µg/mL, houve uma pequena diminuição da viabilidade celular (~92 %), já sendo considerada uma diferença significativa. A partir da concentração de 0,1 µg/mL, os valores de viabilidade celular se mantiveram baixos (de 22 a 28 %),

similares aos apresentados anteriormente com concentrações mais altas (Fig. 10 D). Desta forma, decidiu-se utilizar as concentrações de 0,01 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ do VRs na realização dos ensaios de citotoxicidade subsequentes.

Foram realizados também ensaios do MTT para linhagens tumorais de células de câncer de mama (Fig. 13). As linhagens utilizadas foram a MCF-7 (estrógeno dependente) e SKBr-3 (estrógeno independente). As concentrações do VRs analisadas foram de 0,01 a 1000 $\mu\text{g/mL}$. Os controles negativos foram considerados células sem tratamento com o VRs e como controle positivo foram utilizadas células tratadas com TritonTM X-100 (Sigma-Aldrich).

Figura 13. Viabilidade celular avaliada por MTT em linhagens (A) MCF-7 e (B) SKBr-3 após tratamento com o VRs. Avaliação da citotoxicidade do VRs em diferentes concentrações (0,01-1000 $\mu\text{g/mL}$) após 24 horas de tratamento. Resultados expressos pela média $\pm$ S.E.M. para 3 experimentos independentes. CN (controle negativo). CP (controle positivo – Triton X-100 0,1%). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ - diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo.

A linhagem celular MCF-7 não sofreu interferência com o tratamento com o VRs nas concentrações utilizadas (Fig. 13 A). Este resultado corrobora com dados da literatura, em que secreções do veneno bruto de *R. schneideri* apresentaram baixa citotoxicidade em células MCF-7 (SCIANI, 2013).

Algumas concentrações do VRs foram citotóxicas para células SKBr-3 (Fig. 13 B), sendo que a maior concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e a de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram diminuição significativa da viabilidade celular. A concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ foi a mais citotóxica (~59% de viabilidade celular).

Os medicamentos obtidos através de extratos de venenos de sapos, tais como o Huachansu, demonstraram através de ensaios clínicos não apresentar efeitos colaterais graves (MENG et al., 2009; XIE et al., 2013), característica

importante para o seu uso como agente terapêutico. Desta forma, decidiu-se avaliar os efeitos citotóxicos do VRs em células não tumorais. Foram realizados ensaios do MTT em fibroblastos (células L929) e em hepatócitos primários (isolados de fígado de ratos Wistar) (Fig. 14).

Figura 14. Viabilidade celular avaliada por MTT em **(A)** células L929 e **(B)** hepatócitos primários após tratamento com o VRs. Avaliação da citotoxicidade do VRs em diferentes concentrações (0,01-1000 $\mu\text{g/mL}$) após 24 horas de tratamento. Resultado expressos pela média $\pm$ S.E.M. para 3 experimentos independentes. CN (controle negativo). CP (controle positivo – Triton X-100 0,1%). CCCP (Cianeto de Carbonila Clorofenilhidrazona - 25 μM). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ - diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo.

Quando as células L929 foram tratadas com o VRs (Fig. 14 A), apenas a maior concentração do VRs causou diminuição significativa da viabilidade celular (~49,5%). Nos hepatócitos primários, o VRs foi capaz de diminuir a viabilidade celular nas concentrações de 1 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, apresentando maior nas concentrações de 10 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ (22 e 17%, respectivamente). Neste ensaio foi realizado também o tratamento das células com CCCP, que atua como desacoplador da cadeia respiratória, inibindo a produção de ATP e levando à morte celular (PARK, 1997).

Analizando os resultados obtidos pelo ensaio do MTT para as diferentes linhagens celulares, pode-se concluir que o VRs foi seletivo em causar citotoxicidade, assim como os venenos de outras espécies de sapos já descritos na literatura. Esta seletividade se deve ao fato de que as diferentes células tumorais apresentam características específicas de cada linhagem. A composição da membrana plasmática é alterada na maioria das células tumorais, o que pode indicar as diferenças de citotoxicidade. Ensaios realizados com toxinas de venenos e

peçonhas animais demonstram a seletividade de toxinas por células tumorais (MAMELAK et al., 2006; SUN et al., 2008; GHAVAMI et al., 2005).

O VRs foi capaz de induzir citotoxicidade nas linhagens celulares HL-60, B16F10, SKBr-3 e nos hepatócitos primários. Não foi possível obter relação concentração-resposta, principalmente devido ao fato da amostra ser uma mistura de toxinas, e cada uma pode exercer uma atividade diferente, seja causando toxicidade ou não. Assim, as diferentes concentrações do VRs exercem efeitos diferentes sobre as linhagens celulares, demonstrando especificidade.

4.3.2. Ensaios mitocondriais

Os ensaios realizados com mitocôndrias isoladas de fígados de ratos Wistar foram realizados com o objetivo de verificar se o VRs é capaz de interferir em parâmetros bioenergéticos e oxidativos mitocondriais e, desta forma, avaliar se o VRs pode induzir citotoxicidade, quando administrado diretamente sobre suspensão mitocondrial.

Deficiências na funcionalidade da cadeia respiratória levam à diminuição na produção de ATP, à formação de radicais livres e alterações nos mecanismos de regulação do cálcio intracelular. Estes eventos celulares podem induzir a oxidação do DNA, de proteínas e de lipídeos e também induzir a abertura do poro de transição de permeabilidade, um acontecimento que está correlacionado com os mecanismos de apoptose e morte celular (LEMASTERS, 1999).

Agentes citotóxicos em geral e seus metabólitos podem influenciar o equilíbrio energético das células pelo aumento de consumo de ATP e/ou redução da síntese do ATP. A depleção do ATP é um dos eventos iniciais da toxicidade induzida por compostos, como consequência da inibição do transporte de elétrons (fosforilação oxidativa), dissipação do potencial de membrana mitocondrial, desregulação da homeostase cálcica, bem como geração de espécies reativas de oxigênio (WALLACE; STARKOV, 2000; MINGATTO et al., 2002; KOWALTOWSKI, CASTILHO; VERCESI, 2001). Heterosídeos cardiotônicos apresentam como alvo primário a enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$. Esta enzima, quando apresenta seu funcionamento comprometido, altera a concentração iônica no interior celular, principalmente Na^+ e Ca^{2+} . Nesta situação, ela tem demonstrado ações importantes em processos apoptóticos (WANG et al., 2006).

Os ensaios mitocondriais foram realizados com o VRs nas concentrações de 0,001 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Estas concentrações foram escolhidas baseadas nos ensaios de citotoxicidade realizados anteriormente, porém com concentrações menores, por se tratar de experimentos realizados em mitocôndrias isoladas, e na tentativa de se avaliar um amplo espectro de concentrações.

4.3.2.1. Respiração mitocondrial

O ensaio de respiração mitocondrial foi realizado a fim de se medir o consumo de O_2 , utilizando-se um oxígrafo. A respiração mitocondrial é dividida principalmente em duas fases: o estado III e o estado IV. O estado III demonstra a velocidade de consumo de oxigênio, quando a mitocôndria é colocada em um meio com substrato oxidável e ADP, produzindo assim o ATP. No estado IV observa-se a velocidade do consumo de O_2 após a mitocôndria já ter consumido todo o ADP disponível.

Um dos parâmetros utilizados para a avaliação da função mitocondrial é o RCR (Razão de Controle Respiratório) que determina a razão entre as velocidades de respiração no estado III e no estado IV. Ou seja, determina o quanto a respiração é aumentada quando estimulada com ADP, na presença de substratos, em relação ao seu estado basal (CARLOTTI JUNIOR, 2001). Este parâmetro avaliou, portanto, se houve ou não diminuição na velocidade máxima de respiração, determinada pelo estado III, quando da presença do VRs. Outra ferramenta utilizada é a razão ADP/O, que determina a quantidade de ADP que é consumida por átomo de oxigênio durante a respiração. Este parâmetro é capaz de avaliar se está havendo um maior consumo de ADP para manter a mesma velocidade de respiração.

A figura 15 mostra o efeito das diferentes concentrações do VRs sobre o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas de fígado de rato, usando glutamato e malato como substratos oxidáveis para sítio I da cadeia respiratória. A respiração mitocondrial foi avaliada após o estímulo com ADP (0,4 μmol) (estado III) e também no estado basal (IV). O controle foi feito sem a adição do VRs e as concentrações utilizadas do VRs foram de 0,001 a 100 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 15. Efeito do VRs (0,001 a 100 µg/mL) sobre a respiração de estado III em mitocôndrias (1mg de proteína/mL) isoladas de fígado de rato, incubadas em meio padrão, que consiste de uma solução aquosa contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, acrescido de EGTA 0,5 mmol/L e K₂HPO₄ 10 mmol/L pH 7,2. As mitocôndrias foram energizadas com glutamato 5 mmol/L e malato 5 mmol/L. A respiração de estado III foi iniciada com ADP 0,4 µmol. Os resultados representam a média de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais.

Os perfis de consumo de oxigênio obtidos na presença de todas as concentrações do VRs (Fig. 15) mostram aumentos semelhantes da velocidade de consumo de oxigênio quando é adicionado o ADP, retornando à velocidade do estado basal no estado IV, quando o ADP é consumido. Isto indica que o VRs, nas concentrações utilizadas, não interferiu na respiração mitocondrial. Estes resultados podem ser confirmados através da análise dos parâmetros respiratórios RCR e ADP/O (Tab 2).

Tabela 2. Razão de controle respiratório (RCR) e razão ADP/O utilizando glutamato e malato como substratos oxidáveis em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

VRs (µg/mL)	RCR	ADP/O
Controle	4,4 ± 0,4	1,51 ± 0,3
0,001	3,4 ± 0,4	1,42 ± 0,3
0,01	3,3 ± 0,5	1,49 ± 0,2
0,1	3,6 ± 0,4	1,57 ± 0,5
1	4,0 ± 0,4	1,59 ± 0,5
10	3,2 ± 0,5	1,27 ± 0,4
100	3,7 ± 0,4	1,46 ± 0,4

Os valores são expressos como média +/- desvio padrão para três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

Os valores obtidos de RCR e ADP/O (Tab. 2) não foram estatisticamente alterados em relação ao controle. Desta forma, pode-se concluir que os parâmetros respiratórios não foram significativamente alterados pela adição do VRs nas mitocôndrias, quando energizadas com substratos para sítio I da cadeia respiratória.

4.3.2.2. Níveis de ATP mitocondrial

A síntese do ATP necessária às funções celulares é realizada nas mitocôndrias através do funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial acoplada à função da ATP sintase. Na presença de agentes tóxicos diversos, este processo pode ser inibido e a capacidade energética da célula diminuída. Concomitantemente, a inibição da cadeia respiratória induz um aumento na produção de radicais livres no interior das células, que leva à citotoxicidade por meio de danos oxidativos em macromoléculas celulares como proteínas e DNA, além de peroxidação dos lipídios de membrana (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Durante este ensaio, o ATP presente na amostra é consumido durante a oxidação da Luciferina, catalisada pela enzima luciferase com emissão de luz conforme reação:

Quando as concentrações de luciferina, luciferase e oxigênio são mantidas constantes, o ATP é o reagente limitante, e a quantidade de luz emitida é proporcional ao ATP presente no meio (THORE, 1979).

Os Níveis de ATP mitocondrial foram avaliados após 15 minutos de incubação das mitocôndrias com as amostras de VRs. (Fig. 16).

Figura 16. Efeitos do VRs em diferentes concentrações sobre o nível de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. A queda nos níveis de ATP foi induzida por CCCP 1mmol/L. Os resultados representam a média de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. *p < 0,05 – diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo.

Os resultados obtidos demonstram que não houve variação significativa dos níveis de ATP quando as amostras do VRs foram adicionadas ao meio. Estes dados confirmam os resultados obtidos anteriormente, em que o VRs, nas concentrações utilizadas, não foi capaz de alterar os parâmetros respiratórios, não interferindo na produção de ATP, e mantendo os níveis de ATP semelhantes aos do controle negativo.

4.3.2.3. Potencial de membrana mitocondrial

Alterações no processo de fosforilação oxidativa ou quando sinais de morte alcançam a mitocôndria podem levar ao colapso do potencial de membrana interna mitocondrial (SLUSE; JARMUSZKIEWICZ, 1998). Desta forma, foi avaliada a habilidade do VRs em dissipar o potencial de membrana mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos. O CCCP foi utilizado como controle positivo, levando à dissipação total do potencial (Fig. 17).

Figura 17. Efeitos do VRs em diferentes concentrações sobre o potencial de membrana mitocondrial, avaliados com safranina-o e CCCP 2 μ M como controle positivo. Os traçados são representativos de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. U.F.A. (Unidade de Fluorescência Arbitrária).

Os resultados indicam que o VRs não foi capaz de dissipar o potencial de membrana mitocondrial em nenhuma das concentrações testadas.

4.3.2.4. Formação de espécies reativas de oxigênio (EROS)

A presença de inibidores da cadeia respiratória faz com que uma fração do O_2 disponível para a mitocôndria sofra redução incompleta gerando o radical superóxido (TURRENS, 1997). Quando ocorre um aumento na formação de superóxido ou deficiência nas defesas antioxidantes, o superóxido acumula-se e ocorre uma condição conhecida como estresse oxidativo, que na presença de Fe^{2+} , produz o radical hidroxil (reação de Fenton). Este radical, para o qual não existe nenhum sistema antioxidante enzimático, é capaz de induzir citotoxicidade por meio de danos oxidativos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Desta forma, foi avaliada também a capacidade do VRs em produzir espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos. Como não houve alterações na quantidade de EROS produzida em relação ao controle (Fig. 18), optou-se por avaliar se o VRs teria efeito protetor contra a formação destas espécies (Fig. 19). Para isto, o VRs (0,001-100 μ g/mL) foi adicionado à suspensão mitocondrial e, em seguida, foi induzida a formação de EROs pelas mitocôndrias através da adição de *t*-butil hidroperóxido (*t*-BOOH) 300 μ M. O controle negativo foi realizado sem a adição do *t*-BOOH e o positivo sem a adição do VRs.

Figura 18. Produção/accumulação de EROs na presença de diferentes concentrações do VRs. O estresse oxidativo foi induzido por *t*-BOOH e monitorado usando H_2DCFDA . Os traçados são representativos de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. U.F.A.(Unidade de Fluorescência Arbitrária).

Figura 19. Produção/accumulação de EROs na presença de diferentes concentrações do VRs e do *t*-BOOH. O estresse oxidativo foi induzido por *t*-BOOH e monitorado usando H_2DCFDA . Os traçados são representativos de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. U.F.A.(Unidade de Fluorescência Arbitrária).

Os dados obtidos neste ensaio (Fig. 19) demonstram que o VRs apresentou um efeito protetor contra a produção de EROs, estabelecendo uma relação concentração-resposta, exceto para a concentração de 0,1 µg/mL que demonstrou ser mais protetora que a fração de 1 µg/mL.

Esta característica de proteção contra a formação de EROs é muito relevante, já que o VRs demonstrou não interferir sobre a respiração e nem sobre o potencial

de membrana mitocondrial, não gerando danos (citotoxicidade) nesta organela e, portanto, apenas exercendo o efeito benéfico de proteção contra o estresse oxidativo. Este dado indica que no VRs devem existir moléculas com atividade antioxidante, outra atividade com potencial farmacológico.

Os antioxidantes agem nos organismos vivos por meio de diferentes mecanismos. Dentre estes, podem ser citados: a complexação de íons metálicos, a captura de radicais livres, a decomposição de peróxidos, a inibição de enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a modulação de vias sinalizadoras celulares (VASCONCELOS et al., 2006). Para tentar elucidar por quais mecanismos esta proteção ocorre foram realizados ensaios para avaliar os efeitos do VRs na oxidação do NAD(P)H e também avaliar seus efeitos nos níveis de glutathiona reduzida e glutathiona oxidada, principal sistema antioxidante destas organelas.

4.3.2.5. Avaliação do estado redox dos nucleotídeos de piridina

Os efeitos do VRs foram avaliados sobre a oxidação NAD(P)H, sendo que o VRs não demonstrou afetar este sistema antioxidante (Fig. 20). A capacidade do VRs em proteger contra a oxidação do NAD(P)H foi avaliada através da indução da oxidação pelo *t*-BOOH 300 μ M, que foi adicionado às amostras. O controle positivo foi realizado pela adição de *t*-BOOH, enquanto o negativo foi feito apenas com a suspensão mitocondrial em meio padrão (Fig. 21).

Figura 20. Efeitos de diferentes concentrações do VRs na oxidação do NAD(P)H em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos. A indução da oxidação foi feita por *t*-BOOH. Os traçados são representativos de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. U.F.A. (Unidade de Fluorescência Arbitrária).

Figura 21. Efeitos de diferentes concentrações do VRs na oxidação do NAD(P)H induzida por *t*-BOOH em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos. Os traçados são representativos de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. U.F.A. (Unidade de Fluorescência Arbitrária).

Através dos dados obtidos nota-se que para todas as concentrações do VRs houve a oxidação do NAD(P)H em valores similares ao do controle positivo, indicando que o VRs não interferiu neste processo de oxidação, não sendo, portanto, o processo pelo qual o VRs protege contra a formação de EROS.

4.3.2.6. Níveis de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG)

A glutathiona é um antioxidante hidrossolúvel, conhecido como o tiol não proteico mais importante nos sistemas vivos. Trata-se de um tripeptídeo linear, constituído por três aminoácidos: ácido glutâmico, cisteína e glicina, sendo o grupo tiol da cisteína o local ativo responsável pelas suas propriedades bioquímicas. Pode-se encontrar na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG). A importância deste par é que a razão GSH/GSSG é normalmente utilizada para estimar o estado redox dos sistemas biológicos. Em sistemas normais, a GSSG representa apenas uma pequena fração da glutathiona total (menos de 10%). A mitocôndria tem sua própria reserva de GSH, de importância crucial na proteção desta organela contra a ação das espécies reativas de oxigênio (EROs) (MELO et al., 2008).

Sendo assim, foram realizados experimentos para avaliar os níveis de GSH e GSSG sob a influência do VRs (Figs. 22 e 23). Os resultados são expressos através da razão GSH/GSSG, ou seja, quanto menor o valor obtido, maior a oxidação da glutathiona.

Figura 22. Razão entre GSH e GSSG em mitocôndrias (1mg de proteína/mL) isoladas de fígado de rato na presença de diferentes concentrações do VRs. Os resultados representam a média de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. * $p < 0,05$ – diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Primeiramente foi avaliado se o VRs seria capaz de influenciar na oxidação da glutatona (Fig. 22), sendo que para todas as concentrações utilizadas do VRs a razão GSH/GSSG se manteve similar ao controle negativo. Consequentemente, realizou-se o experimento para analisar se haveria proteção, ou seja, diminuição da oxidação da glutatona quando adicionado o *t*-BOOH, na presença das amostras do VRs (Fig. 23).

Figura 23. Razão entre GSH/GSSG na presença das amostras do VRs em diferentes concentrações. A oxidação da glutatona foi induzida por *t*-BOOH 300 µM. Os resultados representam a média de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. Não foram obtidos valores significativamente diferentes do VRs + *t*-BOOH em relação ao tratamento somente com *t*-BOOH.

Os resultados (Fig. 23) demonstram que não houve proteção contra a oxidação da glutathiona induzida pelo *t*-BOOH ao se adicionar as amostras do VRs. Conclui-se, portanto, que o VRs não é capaz de interferir neste sistema antioxidante nas concentrações utilizadas, não apresentando capacidade nem de induzir nem de proteger a oxidação da glutathiona, não sendo este o processo pelo qual o VRs é capaz de diminuir a formação de EROs. Desta forma, o mecanismo pelo qual o VRs é capaz de diminuir a formação de EROs, quando induzida pela adição de *t*-BOOH (Fig. 18) permanece desconhecido.

4.3.2.7. Inchamento mitocondrial

O inchamento mitocondrial (“swelling”) está associado à alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial provocada por vários fatores, tais como íons, agentes desacopladores, estado inicial das mitocôndrias, condições de incubação e interferências na respiração ou fosforilação. Este processo de intumescimento é observado na amostra mitocondrial levada a espectrofotômetro, acompanhando-se a diminuição da dispersão de luz (CÂMARA et al., 2001).

A capacidade do VRs em alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial foi avaliada através do ensaio de inchamento mitocondrial. O fosfato inorgânico (Pi) foi utilizado para induzir a permeabilidade da membrana mitocondrial, gerando intumescimento celular e consequente diminuição da turbidez da suspensão, resultando em um aumento da absorbância (Fig. 24).

Figura 24. Efeito do VRs em diferentes concentrações sobre a indução do inchamento mitocondrial. O controle positivo foi induzido com fosfato inorgânico (Pi) 1 mmol/L. Os resultados são a média de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. Não foram obtidos valores significativamente diferentes do VRs em relação ao controle negativo.

Nas concentrações testadas do VRs, este não foi capaz de interagir com a membrana mitocondrial, não alterando a sua permeabilidade, mantendo os valores de absorbância similares ao do controle.

4.3.2.8. Movimentação e liberação de Ca^{2+}

A homeostase cálcica é fundamental para o bom funcionamento das mitocôndrias. A membrana interna mitocondrial exibe um permutador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (diferente do trocador do sarcolema $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$). Esta é a principal via para o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial. Estas vias de efluxo de Ca^{2+} mitocondrial são os principais reguladores da normalidade intramitocondrial (BERS, 2010). A homeostase mitocondrial de Ca^{2+} desempenha um papel central no fornecimento de energia. O aumento do Na^+ estimula o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e traz problemas para os processos oxidativos envolvendo NADH em células cardíacas (LIU et al., 2010). O teste que avalia a captação e efluxo de cálcio pelas mitocôndrias foi realizado, utilizando CCCP 2 μM como controle positivo e as amostras do VRs foram adicionadas em aproximadamente 150 segundos após o início do ensaio para verificação dos seus efeitos (Fig.25).

Figura 25. Efeitos do VRs sobre o efluxo de Ca^{2+} mitocondrial, avaliados usando Calcium Green. Succinato (5mM) foi adicionado à suspensão mitocondrial para estimular a captação de cálcio. As amostras do VRs foram adicionadas após 150 segundos. O CCCP 2 μM foi utilizado como controle positivo. Os traçados são representativos de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. U.F.A.(Unidade de Fluorescência Arbitrária).

Os resultados (Fig. 25) demonstram que o VRs não interferiu na movimentação do cálcio nas mitocôndrias. Este resultado era o esperado, já que anteriormente verificou-se que o VRs não alterou a permeabilidade da membrana, nem a respiração e nem o potencial de membrana mitocondrial. Altas concentrações de cálcio induzem a formação de poros na membrana mitocondrial, alterando a sua permeabilidade e levando ao inchamento mitocondrial.

Levando-se em conta todos os resultados obtidos através dos ensaios realizados em mitocôndrias isoladas, pode-se concluir que o VRs não foi capaz de induzir danos a esta organela. Ensaios mitocondriais realizados com venenos / peçonhas e toxinas animais são raros na literatura. Um estudo realizado com secreções da pele da rã *Bombina variegata*, no qual o veneno demonstrou citotoxicidade em várias linhagens de células tumorais, também demonstrou citotoxicidade em mitocôndrias isoladas de fígados de ratos saudáveis, através de inibição da respiração e fosforilação, e os pesquisadores sugeriram que a citotoxicidade causada nas mitocôndrias fosse devido à presença de peptídeos no veneno (RUSSEL; SAUNDERS, 1966). Como o VRs contém apenas moléculas de baixa massa molecular e peptídeos (menores que 6 kDa), pode ser que as moléculas responsáveis pela citotoxicidade tenham ficado na porção de alta massa molecular, ou que o veneno de *R. schneideri* não possua estes peptídeos ou moléculas. Porém, como não há dados na literatura para comparação dos resultados, mais estudos e ensaios devem ser realizados.

4.4. Ensaios realizados com as toxinas Rs1, Rs2 e Rs3

4.4.1. Ensaios de citotoxicidade

Muitos bufadienolídeos extraídos de diferentes espécies de sapos têm sido estudados e demonstraram ser citotóxicos para várias linhagens celulares tumorais. A bufalina, componente majoritário do Chansu, demonstrou ser citotóxica para células de câncer endometrial e câncer de ovário *in vitro*, mas exerceu pouco efeito em células saudáveis humanas epiteliais do endométrio, sugerindo que os efeitos da bufalina devem ser menos citotóxicos em células normais (TAKAI et al., 2012). A bufalina também inibiu a proliferação de células de câncer gástrico MGC803 de maneira dose e tempo-dependente (LI et al., 2009) e demonstrou citotoxicidade em células leucêmicas HL-60, U937 e ML1 na concentração de 10 nM (ZHANG et al.,

1992). Em estudo conduzido por Zhang e colaboradores (2012), foram isolados quatro bufadienolídeos do Chansu, bufalina, bufotalina, telocinobufagina e cinobufagina, e os quatro compostos demonstraram efeitos citotóxicos em células de hepatocarcinoma HepG2 e em células de hepatocarcinoma resistentes a multidrogas R-HepG2.

Desta forma, a fim de se iniciar os experimentos para avaliação da atividade anticancerígena das toxinas isoladas e purificadas através da cromatografia (subfrações Rs1, Rs2 e Rs3), foram realizados os ensaios de citotoxicidade destas toxinas em células HepG2 (hepatocarcinoma humano) (Fig. 26). A linhagem HepG2 foi escolhida por se tratar de uma linhagem de fácil cultivo e devido ao fato de o hepatocarcinoma ser um câncer de difícil tratamento e prognóstico ruim, e também para posterior comparação dos efeitos das toxinas nestas células e com células saudáveis (hepatócitos primários extraídos de ratos Wistar). Foram utilizadas as concentrações de 1, 10, 50, 100, 500 e 1000 nM para cada toxina, e o tratamento foi realizado com período de incubação de 24 e 48 horas.

Figura 26. Viabilidade celular avaliada por MTT de HepG2 após tratamento com as subfrações **(A)** Rs1, **(B)** Rs2 e **(C)** Rs3 por 24 e 48 horas. Resultados expressos pela média $\pm$ S.E.M. para 3 experimentos independentes. CN (controle negativo). CP (controle positivo – Triton X-100 0,1%). *p < 0,05 - diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo.

Os resultados de viabilidade celular demonstraram que a subfração Rs3 é a mais citotóxica para células HepG2, seguida pela Rs1 e pela Rs2, respectivamente. A Rs3 causou citotoxicidade a partir da concentração de 10 nM quando do tratamento por 24 horas, e em todas as concentrações quando por 48 horas, sendo que a citotoxicidade foi gerada de maneira concentração-dependente (Fig. 26 C). A subfração Rs1 foi capaz de diminuir significativamente a viabilidade celular a partir da concentração de 50 nM, tanto para o tratamento por 24 horas quanto para o de 48 horas, obtendo-se também um resultado concentração-resposta (Fig. 26 A). A subfração Rs2 causou citotoxicidade apenas na maior concentração quando tratada por 24 horas, e a partir de 100 nM quando tratada por 48 horas (Fig. 26 B), sendo que o valor da menor viabilidade celular foi de aproximadamente 61%, muito maior que o valor obtido para Rs1 e Rs3 (~18 e 17%, respectivamente). Desta forma, optou-se por utilizar as subfrações Rs1 e Rs3 na realização dos próximos experimentos, por apresentarem perfil mais citotóxico a esta linhagem tumoral. Os valores de IC_{50} obtidos foram de 70,53 nM (intervalo de confiança de 95%: 48,97 nM a 101,6 nM) para a Rs1 e de 42,42 nM (intervalo e confiança de 95%: 24,71 nM a 72,82 nM) para a Rs3. O cálculo das IC_{50} foi baseado nos dados obtidos pelo tratamento por 24 horas. Os baixos valores de IC_{50} obtidos para estas toxinas corroboram com o estudo realizado por Zhang (2013), em que a bufotoxina arenobufagina apresentou valor de IC_{50} de $20.24 \pm 3,84$ nM para células HepG2.

O ideal para que uma substância possa ser utilizada no tratamento antitumoral é que ela seja capaz de induzir citotoxicidade em células tumorais, porém não seja lesiva às células saudáveis. Diversos estudos demonstraram que a bufalina exerce efeitos diferentes em células tumorais e células saudáveis, como por exemplo, em ensaio realizado por YU e colaboradores (2008), em que a bufalina foi citotóxica para três linhagens de células tumorais de câncer de próstata e não exerceu efeito significativo em células mesangiais humanas e epiteliais de mama. Desta forma, decidiu-se avaliar a citotoxicidade das toxinas Rs1 e Rs3 em hepatócitos isolados de fígado de ratos Wistar saudáveis (Fig. 27).

Figura 27. Viabilidade celular avaliada por MTT de hepatócitos após tratamento com as subfrações **(A)** Rs1 e **(B)** Rs3. Avaliação da citotoxicidade após 24 horas de tratamento. Resultados expressos pela média $\pm$ S.E.M. para 3 experimentos independentes. CN (controle negativo). CP (controle positivo – Triton X-100 0,1%). CCCP (Cianeto de Carbonila Clorofenilhidrazona - 25 μ M). * $p < 0,05$ - diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo.

A Rs1 demonstrou diminuir significativamente a viabilidade celular nas concentrações de 50, 100 e 500 nM em torno de 8% (viabilidade celular ~92% - Fig. 27 A). Este efeito da Rs1 foi bem menor em células sadias do que nas células tumorais HepG2 (viabilidade celular ~70, 60 e 40%, respectivamente - Fig. 26 A). Já a Rs3 não exerceu efeitos sobre a viabilidade celular de hepatócitos primários (Fig. 27 B). Esta característica de especificidade de alguns bufadienolídeos extraídos de sapos em causar citotoxicidade preferencialmente a células tumorais foi avaliada por um estudo clínico de Fase I, realizado por Meng e colaboradores (2009). Neste estudo a toxicidade do Huachansu foi testada em pacientes com carcinoma hepatocelular, utilizando doses até seis vezes maiores do que a dose comumente utilizada na China e os resultados mostraram que nenhuma toxicidade cardíaca significativa foi observada, demonstrando que o Huachansu tem níveis de toxicidade toleráveis. Dados semelhantes foram obtidos nos ensaios com os hepatócitos primários, os quais mostram que as toxinas Rs1 e Rs3 causam baixa ou nenhuma citotoxicidade a estas células, demonstrando um efeito marcante nas células tumorais HepG2, sendo um dado bastante relevante para este estudo e para sua possível atuação como agentes antineoplásicos.

4.4.2. Análise da dissipação do potencial de membrana mitocondrial

Quando uma célula entra em processo apoptótico, e a via intrínseca é ativada (via mitocondrial), ocorre a perda do potencial de membrana mitocondrial, fazendo

com que o citocromo c seja liberado para o citosol, para formar o complexo apoptossomo, aumentando a permeabilidade da membrana, o que, consequentemente, leva ao inchamento mitocondrial (REED, GREEN, 2011). A despolarização mitocondrial pode ser avaliada pela fluorescência da tetrametilrodamina metil ester (TMRM), um composto catiônico permeável à membrana celular, que é rapidamente sequestrado pelas mitocôndrias intactas das células e produz uma relação estequiométrica entre a fluorescência da substância e o potencial de membrana mitocondrial da célula (IMBERTI, 1993). Desta forma, foram realizados ensaios para avaliar o potencial de membrana mitocondrial das células HepG2 quando tratadas com as toxinas (Fig. 28).

Figura 28. Análise do potencial de membrana mitocondrial em células HepG2 após tratamento com as subfrações **(A)** Rs1 e **(B)** Rs3 por 24 e 48 horas. Resultados expressos pela média $\pm$ S.E.M. para 3 experimentos independentes. CN (controle negativo). CP (controle positivo - CCCP 25 μ M). *p < 0,05 - diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo.

Ambas as toxinas induziram a dissipação do potencial de membrana mitocondrial de forma concentração-resposta, sendo que a Rs3 se mostrou mais potente, confirmando os dados obtidos nos ensaios de citotoxicidade. Estudos realizados com bufadienolídeos isolados do Chansu demonstraram que os mesmos também são capazes de dissipar o potencial de membrana mitocondrial em diferentes linhagens tumorais (ZHANG et al., 2012; ZHANG et al., 2013; QI et al., 2011; HUANG et al., 2012).

4.4.3. Análise da fragmentação nuclear

Algumas das alterações morfológicas celulares associadas com a ocorrência de apoptose incluem a condensação da cromatina, que se concentra junto à membrana nuclear, e a fragmentação internucleossômica do DNA (WYLLIE et al., 1980; MCCONKEY, 1998). Corantes fluorescentes como o Hoechst 33342 são amplamente utilizados para determinar a concentração de DNA e para corar núcleos avaliados por microscopia de fluorescência. Esse corante é permeável nas membranas celulares e se une a ligações adenina-timina, sendo utilizados para avaliação de apoptose (KIECHLER; ZHANG, 2002). Desta forma, foi avaliada a capacidade das toxinas em induzir a condensação e fragmentação nuclear em células HepG2 (Figs. 29, 30 e 31).

Figura 29. Análise da condensação e fragmentação nuclear em células HepG2 após tratamento com as subfrações **(A)** Rs1 e **(B)** Rs3 por 24 e 48 horas. Resultados expressos pela média $\pm$ S.E.M. para 3 experimentos independentes. CN (controle negativo). CP (controle positivo – cisplatina 0,5 g/mL).

Figura 30. Imagens representativas da condensação e fragmentação nuclear em células HepG2 após tratamento com a subfração Rs1 por (A-H) 24 e (I-P) 48 horas. (A e I) Controles negativos. (B e J) Controles positivos- cisplatina 0,5 g/mL. (C e K) Rs1 - 1 nM; (D e L) Rs1 - 10 nM; (E e M) Rs1 - 50 nM; (F e N) Rs1 - 100 nM; (G e O) Rs1 - 500 nM; (H e P) Rs1 - 1000 nM.

Figura 31. Imagens representativas da condensação e fragmentação nuclear em células HepG2 após tratamento com a subfração Rs3 por (A-H) 24 e (I-P) 48 horas. (A e I) Controles negativos. (B e J) Controles positivos- cisplatina 0,5 g/mL. (C e K) Rs3 - 1 nM; (D e L) Rs3 - 10 nM; (E e M) Rs3 - 50 nM; (F e N) Rs3 - 100 nM; (G e O) Rs3 - 500 nM; (H e P) Rs3 - 1000 nM.

Através destes ensaios, pode-se observar que ambas as toxinas induzem a fragmentação nuclear. Não foi possível obter um resultado concentração-resposta, já que nos tratamentos com as maiores concentrações das toxinas houve um decréscimo na quantidade de núcleos fragmentados, porém também houve uma grande diminuição do número de células, indicando que grande parte das células já estava inviável. No ensaio com a Rs3 não foi possível calcular a porcentagem de fragmentação nuclear nas concentrações de 500 nM e 1000 nM por não haver quantidade suficiente de células para realizar a contagem (Fig. 29). Nos controles negativos (Figs. 30 (A e I) e 31 (A e I)), é possível observar a grande quantidade de células presentes e também muitas delas em processo de divisão (a maioria na fase telófase da mitose). Quando há o tratamento com as toxinas, não são mais observadas células em divisão, e nota-se que a quantidade de células diminui com o aumento da dose.

Sendo assim, estes dados sugerem que as toxinas Rs1 e Rs3 podem induzir apoptose nas células tumorais HepG2. Por se tratar de uma característica de apoptose celular, a fragmentação nuclear pode ser observada em diversas linhagens tumorais quando tratadas com diferentes bufadienolídeos (HUANG et al., 2012, MIAO et al, 2013, XIE et al., 2012).

A retração celular e nuclear, condensação de cromatina, formação de corpos apoptóticos e fagocitose por células vizinhas são as principais alterações morfológicas do processo de apoptose. A clivagem do DNA em fragmentos de tamanho oligonucleossomal é uma indicação bioquímica de apoptose (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). As alterações morfológicas e bioquímicas durante a apoptose acontecem para assegurar que as células que estão morrendo deixem um impacto mínimo para os tecidos vizinhos *in vivo*. Estas características de apoptose contrastam com as de necrose, uma outra forma de morte celular em resposta a estímulos nocivos ou lesão. A necrose é acompanhada por ruptura de membranas e vazamento do conteúdo celular e, assim, muitas vezes provoca a inflamação do tecido (THOMPSON, 1995; VAUX; KORSMEYER, 1999).

4.4.4. Análise do ciclo celular

O ensaio para análise de ciclo celular foi realizado com o intuito de verificar se as toxinas são capazes de interferir no processo de divisão celular das células

HepG2. Para isto, o DNA das células foi corado com iodeto de propídeo (PI), um fluorocromo específico, permitindo a quantificação e distribuição do ciclo celular.

Figura 32. Distribuição do ciclo celular de células HepG2 após tratamento com a subfração Rs1 por (A) 24 e (B) 48 horas. Em (C) está expressa a população de células na fase subG1, indicando apoptose. As células foram coradas com iodeto de propídeo por 30 minutos e foi feita a análise por citometria de fluxo para determinar a distribuição do ciclo celular. Resultados expressos pela média $\pm$ S.E.M. para 3 experimentos independentes. CN (controle negativo). * $p < 0,05$ - diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo.

A análise do ciclo celular das células tratadas com a toxina Rs1 por 24 horas (Fig. 32 A) demonstra que a menor concentração da toxina (1 nM) quase não gerou efeitos no ciclo celular, havendo um sutil aumento da fase S. Na concentração de 10 nM houve um aumento considerável de células na fase G2, e diminuição de células em G1. Na concentração de 50 nM a maioria das células ficaram presas em fase S, diminuindo a quantidade de células em G1. A partir da concentração de 100 nM (100-1000 nM) houve aumento de células em G1 e diminuição das células em S e G2. A porcentagem de células apoptóticas (Fig. 32 C) aumenta com o aumento da concentração, exceto no tratamento das células com 50 nM, onde apresentou porcentagem maior de células apoptóticas do que quando tratadas com 100 nM da

toxina. Ao se analisar o ciclo celular com o tratamento por 48 horas (Fig. 32 B), nota-se que a menor concentração de Rs1 também influenciou pouco na distribuição do ciclo celular com um pequeno atraso em G1. Nas concentrações de 10 e 50 nM houve aumento das células na fase G2 e diminuição na fase G1. No tratamento com 100 nM ocorreu aumento de células em S e diminuição das células em G2. Nas maiores concentrações (500 e 1000 nM) houve aumento de células em G1 e diminuição de células em G2. A porcentagem de células apoptóticas (Fig. 32 C) seguiu o mesmo perfil de quando as células foram tratadas por 24 horas, porém em maior proporção, sendo que na concentração de 50 nM também ocorreu maior incidência de células apoptóticas do que na concentração de 100 nM.

Figura 33. Distribuição do ciclo celular de células HepG2 após tratamento com a subfração Rs3 por (A) 24 e (B) 48 horas. Em (C) está expressa a população de células na fase subG1, indicando apoptose. As células foram coradas com iodeto de propídeo por 30 minutos e foi feita a análise por citometria de fluxo para determinar a distribuição do ciclo celular. Resultados expressos pela média $\pm$ S.E.M. para 3 experimentos independentes. CN (controle negativo). * $p < 0,05$ - diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo.

A análise do ciclo celular das células tratadas com a toxina Rs3 por 24 horas (Fig. 33 A) demonstra que a menor concentração da toxina (1 nM) não provocou efeitos significativos na distribuição do ciclo celular. Na concentração de 10 nM houve um aumento considerável de células na fase S, e diminuição de células em G1. A partir da concentração de 50 nM (50-1000 nM) houve aumento de células em G1 e diminuição das células em S. A porcentagem de células apoptóticas (Fig. 33 C) atingiu valores maiores nas concentrações de 100 e 500 nM (~25%). Ao se analisar o ciclo celular com o tratamento por 48 horas (Fig. 33 B), nota-se que a menor concentração de Rs3 também não influenciou na distribuição do ciclo celular. Na concentração de 10 nM houve aumento das células na fase G2 e diminuição na fase G1. No tratamento com 50 nM ocorreu aumento de células em G1 e S e diminuição das células em G2. Nas maiores concentrações (100-1000 nM) houve aumento de células em G1 e diminuição de células em G2 e S. A porcentagem de células apoptóticas (Fig. 33 C) não demonstrou relação concentração-resposta, sendo que nas concentrações de 10, 50 e 1000 nM houve maior porcentagem destas células (~15%), porém apresentando menor quantidade de células apoptóticas do que quando foi feito o tratamento por 24 horas com esta toxina.

Um estudo realizado por Zhang e colaboradores (2012), em que foi estudada a toxina bufotalina, isolada do Chansu, demonstrou que esta substância, em menores concentrações, induz o aumento de células HepG2 na fase G2/M, enquanto que no tratamento com maiores concentrações há diminuição das células nesta fase, levando a um aumento dose e tempo-dependente de células em fase subG1, indicando que a ocorrência de apoptose acompanha o decréscimo de células em G2/M. Este perfil foi notado quando do tratamento das células HepG2 com a Rs1 (Fig. 25). Huang e colaboradores (2012) demonstraram que a bufalina (toxina presente em abundância no Chansu) causou o atraso de células T24 (câncer de bexiga humano) na fase G0/G1 e Xie e colaboradores (2012) demonstraram que a bufalina induz atraso na fase G2/M em células de diversos tipos de osteosarcoma humano. Em 2011, Xu e colaboradores demonstraram que a toxina cinobufagina (bufadienolideo presente na maioria dos venenos de sapos) induz um acúmulo significativo de células HepG2 e SMMC-7721 (linhagem de hepatocarcinoma humano) na fase S. Outro estudo, realizado por Sciani e colaboradores (2013), com secreções do veneno de *R. schneideri*, mostrou que o veneno é capaz de induzir o acúmulo de células MCF-7 na fase G2/M. Com base nos dados da literatura e nos

dados obtidos neste estudo, pode-se concluir que as toxinas Rs1 e Rs2 podem interferir em diferentes fases do ciclo celular, promovendo o acúmulo de células em qualquer uma das fases G1, S e G2.

As células podem ficar presas nos pontos de checagem (“checkpoints”) do ciclo celular temporariamente: (a) para permitir que o dano celular seja reparado, (b) permitir a dissipação de um sinal de stress celular exógeno, (c) ou em função da disponibilidade de fatores essenciais de crescimento, hormônios, ou nutrientes (PIETENPOL; STEWART, 2002). A sinalização do ponto de checagem pode também resultar na ativação de vias que conduzem à morte celular programada, em caso de danos celulares que não podem ser devidamente reparados. Estudos recentes mostram que células tumorais com defeitos nos pontos de checagem são mais vulneráveis aos agentes anticancerígenos. De fato, ao se considerar a frequência de alterações na p53 e pRb, bem como as suas vias regulatórias em células tumorais, a maioria dos carcinomas humanos têm função defeituosa dos pontos de checagem. Desta forma, muitos laboratórios atualmente estão à procura de compostos que interferem com pontos de controle do ciclo celular, na esperança de que tais agentes possam ser mais eficazes na terapia anticancerígena (PIETENPOL; STEWART, 2002).

4.4.5. Ensaios de avaliação de apoptose/necrose utilizando anexina V e iodeto de propídeo (PI)

A anexina V (AV) tem a capacidade de se ligar aos fosfolipídeos de membrana plasmática, incluindo as fosfatidilserinas (FS), que são externalizadas na fase inicial do processo de apoptose (VAN HEERDE et al., 2000). A anexina V associada ao FITC (isocianato de fluoresceína) é utilizada para avaliar os níveis de FS expostas na membrana celular externa, indicando a apoptose. A associação com iodeto de propídeo (PI) é feita para se avaliar a permeabilidade da membrana, já que o PI só consegue penetrar na célula quando a permeabilidade está alterada, indicando um processo necrótico, ou também o processo chamado por alguns autores de “apoptose tardia” (termo em desuso), em que a célula é marcada tanto por AV quanto pelo PI (PEC et al., 2003).

Os resultados obtidos nos ensaios de marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (PI) com o tratamento das células HepG2 pela toxina Rs1 por 24 e 48 h estão expressos nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3. Percentual de células HepG2 marcadas com anexina V-FITC e/ou PI. As células foram tratadas com Rs1 por 24 h.

Rs1 (nM)	Marcação (%)			
24 h	AV+/PI-	AV-/PI+	AV+/PI+	AV-/PI-
CN	4,1 ± 0,64	4,0 ± 0,11	3,5 ± 0,14	88,4 ± 0,43
CP	6,2 ± 0,86 *	7,8 ± 0,23 *	76,1 ± 0,65 *	9,9 ± 0,64 *
1	4,3 ± 0,22 *	2,5 ± 0,13 *	6,0 ± 0,44 *	87,2 ± 0,15
10	10,6 ± 0,34 *	2,2 ± 0,22 *	4,3 ± 0,35	82,9 ± 0,87 *
50	9,3 ± 1,12 *	3,0 ± 1,04	9,4± 0,76 *	78,3 ± 1,34 *
100	15,5 ± 0,97 *	2,2 ± 0,45 *	9,9 ± 1,16 *	72,4 ± 0,87 *
500	9,4 ± 1,08 *	2,0 ± 0,87 *	5,9 ± 0,75 *	82,7 ± 1,11 *
1000	7,0 ± 0,65 *	2,5 ± 0,33 *	7,9 ± 0,66 *	82,6 ± 1,65 *

CN: Controle Negativo. CP: Controle positivo (cisplatina 0,16 mg/L). Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes. * p< 0,05 - estatisticamente diferente em relação ao controle negativo.

Tabela 4. Percentual de células HepG2 marcadas com anexina V-FITC e/ou PI. As células foram tratadas com Rs1 por 48 h.

Rs1 (nM)	Marcação (%)			
48 h	AV+/PI-	AV-/PI+	AV+/PI+	AV-/PI-
CN	3,4 ± 0,12	3,3 ± 0,23	5,7 ± 0,76	87,6 ± 0,79
CP	9,9 ± 0,45 *	13,8 ± 0,33 *	59,0 ± 1,12 *	17,3 ± 1,54 *
1	6,6 ± 0,65 *	2,9 ± 0,36	5,3 ± 1,54	85,9 ± 1,13
10	6,8 ± 0,53 *	2,9 ± 0,87	4,6 ± 0,66	85,7 ± 1,25
50	11,0 ± 0,76 *	2,5 ± 0,45	9,3 ± 1,01 *	77,2 ± 2,18 *
100	14,4 ± 1,56 *	2,6 ± 1,24	10,7 ± 1,56 *	72,3 ± 2,09 *
500	7,9 ± 1,07 *	2,6 ± 1,43	7,9 ± 0,96	81,6 ± 1,87 *
1000	7,6 ± 0,99 *	9,9 ± 1,65 *	17,8 ± 2,53 *	64,7 ± 1,56 *

CN: Controle Negativo. CP: Controle positivo (cisplatina 0,16 mg/L). Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes. * p< 0,05 - estatisticamente diferente em relação ao controle negativo.

Através dos dados obtidos, observa-se que tanto no tratamento por 24 quanto por 48 horas, as células em processo de apoptose (AV+/PI-) tiveram um leve aumento com o aumento da concentração da Rs1, chegando em torno de 15% na concentração de 100 nM. Porém, nas maiores concentrações da toxina (500 e 1000 nM), houve uma diminuição das células em apoptose, em relação às concentrações anteriores, porém se mantiveram maiores que o controle negativo. Já as células em processo necrótico (AV-/PI+), não sofreram alteração significativa em relação ao CN, exceto no tratamento da Rs1 por 48 horas na concentração mais alta, em que a

porcentagem de células necróticas atingiu quase 9,9% do total de células. As células que foram duplamente marcadas (AV+/PI+) aumentaram com o aumento da concentração, apesar de não ser possível estabelecer uma relação concentração-resposta, sendo que no tratamento por 48 horas a porcentagem destas células foi um pouco maior que no tratamento por 24 horas. A porcentagem de células que não se apresentavam em processo de morte (AV-/PI-) diminuíram com o aumento da concentração da toxina, apesar de não estabelecer também relação concentração-resposta, já que em concentrações mais altas houve certa diminuição de células em processo de morte, quando comparadas com concentrações mais baixas. Estes resultados sugerem morte por apoptose, já que a porcentagem de células em processo necrótico (AV-/PI+) não aumentou em relação ao controle negativo, exceto na concentração 1000 nM no tratamento por 48 horas.

Também foi realizado o ensaio de marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (PI) no tratamento das células HepG2 com a toxina Rs3 por 24 e 48 horas, e os resultados estão expressos nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5. Percentual de células HepG2 marcadas com anexina V-FITC e/ou PI. As células foram tratadas com Rs3 por 24 h.

Rs3 (nM)	Marcação (%)			
24 h	AV+/PI-	AV-/PI+	AV+/PI+	AV-/PI-
CN	3,5 ± 0,67	2,3 ± 1,12	4,5 ± 1,15	92,7 ± 1,58
CP	6,0 ± 0,45 *	6,8 ± 0,46 *	78,6 ± 2,41 *	88,6 ± 1,32
1	4,4 ± 0,24	3,1 ± 0,87	5,7 ± 0,56	86,8 ± 1,54 *
10	15,6 ± 2,61 *	2,2 ± 0,98	5,7 ± 1,59	76,5 ± 2,48 *
50	9,6 ± 1,32 *	1,4 ± 0,34	5,5 ± 0,67	83,5 ± 1,32 *
100	11,8 ± 1,65 *	3,0 ± 0,36	5,9 ± 0,54	79,3 ± 2,35 *
500	19,5 ± 2,34 *	5,4 ± 1,65	8,5 ± 1,14 *	66,6 ± 2,78 *
1000	10,2 ± 0,87 *	7,6 ± 1,13 *	12,6 ± 2,43 *	69,6 ± 3,45 *

CN: Controle Negativo. CP: Controle positivo (cisplatina 0,16 mg/L). Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes. * p< 0,05 - estatisticamente diferente em relação ao controle negativo.

Tabela 6. Percentual de células HepG2 marcadas com anexina V-FITC e/ou PI. As células foram tratadas com Rs3 por 48 h.

Rs3 (nM) 48 h	Marcação (%)			
	AV+/PI-	AV-/PI+	AV+/PI+	AV-/PI-
CN	3,7 ± 0,89	4,5 ± 1,65	6,0 ± 2,08	85,8 ± 2,87
CP	9,7 ± 1,12 *	9,9 ± 1,87 *	68,2 ± 2,76 *	12,2 ± 2,58 *
1	3,2 ± 0,76	3,9 ± 0,78	6,1 ± 1,54	86,8 ± 0,76
10	14,7 ± 2,15 *	2,6 ± 1,93	9,3 ± 2,76	73,4 ± 2,22 *
50	15,6 ± 2,76 *	2,8 ± 2,14	12,2 ± 1,55 *	69,4 ± 3,54 *
100	12,3 ± 1,54 *	7,5 ± 1,23	20,2 ± 2,50 *	60,0 ± 2,13 *
500	14,1 ± 1,97 *	13,7 ± 1,65 *	24,7 ± 3,21 *	47,5 ± 3,81 *
1000	12,3 ± 1,88 *	18,8 ± 2,77 *	23,8 ± 3,78 *	45,1 ± 4,33 *

CN: Controle Negativo. CP: Controle positivo (cisplatina 0,16 mg/L). Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ - estatisticamente diferente em relação ao controle negativo.

Através dos dados obtidos, nota-se que a porcentagem de células em processo apoptótico (AV+/PI-) após o tratamento com a Rs3 por 24 e 48 horas aumentou a partir da concentração de 10 nM (15,6 e 14,7%, respectivamente), porém não foi possível estabelecer uma relação concentração-resposta. A porcentagem de células em processo necrótico (AV-/PI+) aumentou apenas nas concentrações mais altas, chegando a 18,8% no tratamento com Rs3 1000 nM por 48 horas. Já as células duplamente marcadas (AV+/PI+) aumentaram com o aumento das concentrações, estabelecendo uma relação concentração-resposta, sendo que no tratamento por 48 horas observou-se maior quantidade destas células (24,7%). Os resultados demonstram também que a quantidade de células não marcadas (AV-/PI-), ou seja, que não estavam em processo de morte, também diminuiu com o aumento das concentrações. Estes dados demonstram que a Rs3 também induz a morte celular por apoptose, por não aumentar a quantidade de células necróticas em relação ao controle negativo, exceto nas maiores concentrações.

A translocação da fosfatidilserina (FS) para a superfície da membrana celular é considerada como a principal marca de apoptose em fase precoce. Este ensaio também foi realizado em outras toxinas isoladas de sapos que demonstraram induzir apoptose em células tumorais. O tratamento de células HepG2 com a bufotalina aumentou a quantidade de células apoptóticas para 14% em relação ao controle (ZHANG et al., 2012). A arenobufagina, outro bufadienolídeo, também aumentou a

proporção de células em processo de morte celular por apoptose em diversas linhagens de células de carcinoma hepatocelular humano (ZHANG et al., 2013). Visto que a externalização da FS é uma característica inerente de apoptose e que os ensaios com anexina V / PI demonstraram esta característica nas células HepG2 tratadas com Rs1 e Rs3, e juntamente com os resultados que demonstraram que estas toxinas induzem a fragmentação nuclear, pode-se concluir que as toxinas são capazes de diminuir a viabilidade celular de células HepG2, induzindo as células à morte, principalmente através do processo de apoptose. Sendo assim, foi realizada a avaliação de ativação de caspases, a fim de se identificar a via pela qual a apoptose é induzida nestas células.

4.4.6. Avaliação da ativação das caspases 3, 8 e 9

A ativação das caspases é um processo bioquímico fundamental para desencadear a apoptose (ZHOU et al., 2013). De acordo com seu papel no processo apoptótico, as caspases podem ser classificadas como iniciadoras (caspases 8 e 9) ou efetoras (caspases 3 e 7). As caspases iniciadoras desencadeiam a cascata de sinalização que resulta na ativação das caspases efetoras, responsáveis por promover os mecanismos que produzem as mudanças morfológicas características da via apoptótica (NAHLE et al, 2002). A via de sinalização extrínseca ocorre através da ativação da caspase 8, envolvendo receptores na membrana celular, responsáveis por receber os estímulos de morte e clivar a pró-caspase 8 na sua forma ativa, caspase 8. A via de sinalização intrínseca é mediada pela mitocôndria, em que ocorre a clivagem da pró-caspase 9 em caspase 9 e liberação do citocromo c no citosol. As duas vias de ativação desencadeiam em cascatas de sinalização que culminam na clivagem da pró-caspase 3 na sua forma ativa, caspase 3, dando prosseguimento às alterações celulares para a morte celular programada (CHOI et al., 2015; IGNEY; KRAMMER, 2002; FAN et al., 2014). Sendo assim, foi avaliada a ativação das caspases 3, 8 e 9 em células HepG2 quando tratadas com as toxinas Rs1 e Rs3.

Inicialmente, foi avaliada a ativação da caspase 3 em células HepG2 quando tratadas com a Rs1 e Rs3, por 24 e 48 horas (Figs. 34 e 35).

Figura 34. Efeito da Rs1 sobre a ativação da caspase 3 em células HepG2, após incubação por (A) 24 e (B) 48 horas. Para controle e posterior relação da quantidade de proteínas, utilizou-se a marcação com β -actina. O gráfico representa a média de triplicatas. * $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo. Os inserts ilustram as bandas proteicas da pró-caspase 3 e β -actina após tratamento com Rs1.

Figura 35. Efeito da Rs3 sobre a ativação da caspase 3 em células HepG2, após incubação por (A) 24 e (B) 48 horas. Para controle e posterior relação da quantidade de proteínas, utilizou-se a marcação com β -actina. O gráfico representa a média de triplicatas. * $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo. Os inserts ilustram as bandas proteicas da pró-caspase 3 e β -actina após tratamento com Rs3.

Os resultados obtidos mostram que nos tratamentos com ambas as toxinas houve diminuição da pró-caspase 3, significando que houve ativação da caspase 3, uma caspase efetora e que demonstra a ocorrência do processo apoptótico. Não foi possível estabelecer uma relação concentração-resposta, sendo que nas maiores concentrações pareceu haver menor ativação da caspase 3. Uma possível explicação para este fato é que grande parte das células já estavam mortas antes do processo de extração e quantificação de proteínas, e por isto já teriam sido eliminadas da suspensão celular. O processo de quantificação demonstrou menor quantidade de proteínas totais nas amostras de concentrações mais altas das toxinas, o que significa menor quantidade de células. Além disto, no tratamento das células com a Rs3 por 48 horas (Fig. 35 B), não foi possível realizar o experimento com as maiores concentrações por não haver quantidade de células suficientes. Este ensaio provou que as toxinas Rs1 e Rs3 induzem morte celular nas células

HepG2 através da apoptose, corroborando com os dados obtidos anteriormente, de fragmentação nuclear (item 4.4.3) e marcação com anexina V (item 4.4.5).

A via de sinalização extrínseca da apoptose também foi investigada através da avaliação da ativação da caspase 8 (Figs. 36 e 37).

Figura 36. Efeito da Rs1 sobre a ativação da caspase 8 em células HepG2, após incubação por (A) 24 e (B) 48 horas. Para controle e posterior relação da quantidade de proteínas, utilizou-se a marcação com β -actina. O gráfico representa a média de triplicatas. * $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo. Os inserts ilustram as bandas proteicas da pró-caspase 8 e β -actina após tratamento com Rs1.

Figura 37. Efeito da Rs3 sobre a ativação da caspase 8 em células HepG2, após incubação por **(A)** 24 e **(B)** 48 horas. Para controle e posterior relação da quantidade de proteínas, utilizou-se a marcação com β -actina. O gráfico representa a média de triplicatas. * $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo. Os inserts ilustram as bandas proteicas da pró-caspase 8 e β -actina após tratamento com Rs3.

Os tratamentos com as toxinas Rs1 e Rs3 (Figs. 36 e 37) causaram diminuição na quantidade de pró-caspase 8, evidenciando a ativação da caspase 8 e indução de apoptose pela via extrínseca. Nas concentrações menores (1 a 100 nM), pôde-se observar relação concentração-resposta para ambas as toxinas. Novamente, a explicação para que nas maiores concentrações (500 e 1000 nM) a relação pró-caspase 8/ β -actina seja maior que para a concentração de 100 nM de toxina pode ser o fato de que parte das células já estavam mortas e foram eliminadas do ensaio antes da extração de proteínas.

Por fim, foi avaliada também a ativação da via intrínseca de apoptose, através da ativação da caspase 9 (Figs. 38 e 39).

Figura 38. Efeito da Rs1 sobre a ativação da caspase 9 em células HepG2, após incubação por (A) 24 e (B) 48 horas. Para controle e posterior relação da quantidade de proteínas, utilizou-se a marcação com β -actina. O gráfico representa a média de triplicatas. * $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa em relação ao o controle negativo. Os inserts ilustram as bandas proteicas da pró-caspase 9 e β -actina após tratamento com Rs1.

Figura 39. Efeito da Rs3 sobre a ativação da caspase 9 em células HepG2, após incubação por (A) 24 e (B) 48 horas. Para controle e posterior relação da quantidade de proteínas, utilizou-se a marcação com β -actina. O gráfico representa a média de triplicatas. * $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo. Os inserts ilustram as bandas proteicas da pró-caspase 9 e β -actina após tratamento com Rs3.

Os resultados demonstram que as toxinas Rs1 e Rs3 também induziram a apoptose via mitocondrial, evidenciada pela diminuição da pró-caspase 9 e consequente ativação da caspase 9 (Figs. 38 e 39). Assim como no ensaio de ativação da caspase 8, foi possível observar relação concentração-resposta nas menores concentrações, sendo que no tratamento por 48 horas com a Rs1 não foi possível realizar o ensaio com a maior concentração (1000 nM), por não haver quantidade suficiente de células. A ativação da caspase 9, associada com a perda do potencial de membrana observado anteriormente (item 4.4.2), sugerem que a mitocôndria está envolvida no processo apoptótico de morte celular.

A maioria dos bufadienolídeos que apresentam citotoxicidade em células tumorais induzem estas células à morte celular por apoptose através de ambas as vias de ativação, extrínseca e intrínseca. A bufotalina, bufalina e cinobufagina, extraídas do Chansu, e o Delisheng, medicamento da TCM, demonstraram induzir

apoptose em células tumorais através da ativação extrínseca e mitocondrial (LU et al., 2010; QI et al., 2011; ZHANG et al., 2012). A mitocôndria atua como um ponto de integração para os sinais apoptóticos porque ambas as vias podem convergir para desencadear a permeabilização da membrana mitocondrial (CORY; ADAMS, 2002).

Levando-se em consideração os resultados dos experimentos realizados até o momento pode-se concluir que as toxinas Rs1 e Rs3 ativam a morte celular programada (apoptose), por ativação de ambas as vias de sinalização: extrínseca e intrínseca. O próximo passo foi avaliar a capacidade destas toxinas em causar danos ou lesões no material genético celular.

4.4.7. Ensaios de genotoxicidade / mutagenicidade

Os agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, formando adutos, alteração oxidativa, ou mesmo quebras na molécula de DNA. Na grande maioria dos casos a lesão é reparada pelo próprio sistema de reparo da célula ou a mesma é eliminada. Caso a lesão seja fixada, provocando mutações, que podem perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação, o agente é considerado mutagênico (UMBUZEIRO; ROUBICEK 2003). Embora as mutações possam surgir espontaneamente, a maioria delas é provocada por agentes físicos, químicos ou biológicos (MATSUMOTO, 2004). As mutações são a principal fonte de variabilidade genética de uma população, sendo, portanto fundamentais para a manutenção das espécies. Porém, podem causar doenças tanto aos indivíduos como a seus descendentes, dependendo da quantidade, do tipo e do local onde ocorrem (UMBUZEIRO; ROUBICEK, 2003).

A linhagem HepG2 é muito utilizada em ensaios toxicológicos, uma vez que as células têm uma morfologia epitelial semelhante às células parenquimáticas do fígado e sintetizam e secretam várias das proteínas plasmáticas características de células hepáticas humanas normais. Em particular, a HepG2 mantém a atividade de muitas enzimas das fases I e II (KNOWLES et al., 1980.; KANASMULLER et al., 1998; KANASMULLER et al., 2004). O ensaio cometa e o teste do micronúcleo são amplamente utilizados na avaliação genotóxica, principalmente por causa da sensibilidade de ambos os ensaios em detectar danos no DNA (ÇAVAS; KONEN, 2007). Desta forma, foi avaliada capacidade das toxinas Rs1 e Rs3 em induzir danos ou lesões no DNA.

4.4.7.1. Ensaio do cometa

A detecção de quebras no DNA através do ensaio do cometa analisa núcleos celulares isolados submetidos a uma solução alcalina para relaxamento do DNA. Estes núcleos, chamados de nucleóides, passam por uma eletroforese na qual os fragmentos de DNA migram assumindo o aspecto de um cometa (Fig. 40), sendo que o tamanho da cauda do cometa reflete a extensão do dano ao DNA (DAVID, 2007).

O ensaio cometa não é utilizado para verificar mutações, mas sim lesões genômicas que se não forem corrigidas, podem ser processadas levando às mutações, o que as caracteriza como lesões pré-mutagênicas (KAMMANN et al., 2001). Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção (TICE, 1995). Por meio desse ensaio, é possível avaliar danos em células em proliferação ou não, *in vivo* ou *in vitro*, sendo bem aplicado com o propósito de análises genotóxicológicas.

Figura 40. Imagem representativa dos nucleóides formando cometas com diferentes graus de dano ao DNA. **A:** nucleóide sem dano no DNA. **B-D:** aumento gradual de dano no DNA. As imagens foram obtidas através de análise em microscópio de fluorescência, em objetiva de 40X. As lâminas foram coradas com 200 μ L de solução de GelRed (1 μ L de GelRed : 10 mL de água milliQ). *Fonte própria:* fotos obtidas das lâminas de controle negativo e controle positivo.

A determinação da extensão dos danos ao DNA gerados pelas toxinas Rs1 e Rs3 foi realizada com a utilização do parâmetro de porcentagem de DNA na cauda (tail intensity). Os resultados estão expressos nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Porcentagem de DNA na cauda dos nucleóides de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações da toxina Rs1.

Rs1 (nM)	% de DNA na cauda
	Média ± DV
CN	4,58 ± 1,43
MMS	18,22 ± 5,61*
1	3,89 ± 0,67
10	5,31 ± 0,89
50	4,12 ± 1,78
100	6,32 ± 2,04
500	4,56 ± 1,65
1000	4,32 ± 1,08

Para cada grupo experimental foram analisados 300 nucleóides.

CN - controle negativo

MMS (metil metano sulfonato -15µg/mL) – controle positivo

Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes.

* estatisticamente diferente do controle negativo (p<0,05).

Tabela 8. Porcentagem de DNA na cauda dos nucleóides de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações da toxina Rs3. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes.

Rs3 (nM)	% de DNA na cauda
	Média ± DV
CN	3,76 ± 2,12
MMS	15,43 ± 3,22*
1	5,78 ± 1,87
10	4,45 ± 1,76
50	4,67 ± 0,88
100	3,07 ± 0,97
500	5,14 ± 1,56
1000	6,34 ± 2,45

Para cada grupo experimental foram analisados 300 nucleóides.

CN - controle negativo

MMS (metil metano sulfonato -15µg/mL) – controle positivo

Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes.

* estatisticamente diferente do controle negativo (p<0,05).

Como observado nas tabelas 7 e 8, os resultados obtidos no ensaio cometa com as células HepG2 tratadas por 4 horas com as toxinas Rs1 e Rs3 mostraram

que em nenhuma das concentrações avaliadas, a porcentagem de DNA na cauda dos nucleoides foi significativamente alterada. Desta forma, não houve indicativo de genotoxicidade das toxinas em células HepG2 nas concentrações avaliadas.

4.4.7.2. Ensaio do Micronúcleo

Os micronúcleos (MNs) são formações de material nuclear que aparecem no citoplasma como pequenos núcleos satélites do núcleo principal (Fig. 41). Os micronúcleos podem ser resultantes de eventos celulares que levam a fragmentação do material genético, como, por exemplo, os fragmentos acêntricos, decorrentes de quebras cromossômicas durante o processo de divisão celular (agente clastogênico); ou ainda de perdas de cromossomos inteiros, que não são incorporados ao núcleo principal, durante o ciclo celular, pela inativação do fuso mitótico (agente aneugênico). Assim, as substâncias indutoras de micronúcleo podem ser classificadas como de ação clastogênica ou aneugênica (FENECH, 2000). A presença de micronúcleo é um fenômeno natural, porém as exposições a compostos genotóxicos aumentam a sua frequência nas células. Os MNs formados por agentes genotóxicos só aparecem após um ciclo de divisão celular (SALVADORI et al., 2003), portanto, a frequência de micronúcleos dentro de uma população de células é altamente dependente da cinética da proliferação celular (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Figura 41. (A) Imagem de uma célula binucleada e **(B)** uma célula binucleada apresentando micronúcleo. As imagens foram obtidas através de análise em microscópio de fluorescência, em objetiva de 40X. As lâminas foram coradas com solução de acridina 40 $\mu\text{g/mL}$. *Fonte própria*: fotos obtidas das lâminas de controles negativo positivo, respectivamente.

A tabela 9 apresenta os dados de distribuição de células de acordo com o número de núcleos, porcentagem de células binucleadas e o índice de divisão nuclear (IDN) nos tratamentos realizados com a Rs1, mostrando que para todas as

concentrações foi obtido um número suficiente de células binucleadas para a análise da frequência de micronúcleos (>35%) (Tab. 10).

Tabela 9. Distribuição de células de acordo com o número de núcleos, porcentagem de células binucleadas e IDN em culturas de células HepG2 tratadas com Rs1 em diferentes concentrações.

Rs1 (nM)	Distribuição de células de acordo com o número de núcleos				% células binucleadas	IDN
	1	2	3	4		
CN	843	2149	8	0	71,63	1,72
DXR	1314	1668	16	2	55,60	1,56*
1	876	2112	12	0	70,40	1,71
10	1076	1917	6	1	63,90	1,64
50	997	1986	15	2	66,20	1,67
100	1045	1945	9	1	64,83	1,65
500	854	2138	8	0	71,26	1,72
1000	918	2073	8	1	69,10	1,70

Para cada experimento (n=3) foram analisadas 2 lâminas (500 células por lâmina) totalizando 3000 células analisadas. IDN = índice de divisão nuclear $[(M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)) / n]$, M1-M4 são número de células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos e n o número total de células analisadas. CN (controle negativo). DXR (doxorubicina 0,03µg/mL). *estatisticamente diferente do controle negativo (p<0,05).

Tabela 10. Frequência de micronúcleos em células HepG2 binucleadas tratadas com diferentes concentrações de Rs1.

Rs1 (nM)	Células binucleadas com presença de micronúcleos
CN	24 ± 1,3
DXR	89 ± 2,6 *
1	36 ± 3,0
10	32 ± 3,3
50	25 ± 1,6
100	36 ± 2,3
500	28 ± 2,6
1000	35 ± 3,6

Para cada experimento (n=3) foram analisadas 2 lâminas (500 células por lâmina) totalizando 3000 células analisadas. CN (controle negativo). DXR (doxorubicina 0,03µg/mL). *estatisticamente diferente do controle negativo (p<0,05).

Os resultados da análise do IDN mostraram que os tratamentos com Rs1 nas concentrações avaliadas não resultaram em diferenças significativas, quando comparados ao controle negativo, assim como não mostraram diferenças no número de micronúcleos das células expostas em relação ao controle negativo.

A tabela 11 apresenta os dados de distribuição de células de acordo com o número de núcleos, porcentagem de células binucleadas e o índice de divisão nuclear (IDN) nos tratamentos realizados com a Rs3, mostrando que para todas as concentrações foi obtido um número suficiente de células binucleadas, para a análise da frequência de micronúcleos (>35%) (Tab. 12).

Tabela 11. Distribuição de células de acordo com o número de núcleos, porcentagem de células binucleadas e IDN em culturas de células HepG2 tratadas com Rs3 em diferentes concentrações.

Rs3 (nM)	Distribuição de células de acordo com o número de núcleos				% células binucleadas	IDN
	1	2	3	4		
CN	935	2057	7	1	68,56	1,69
DXR	1453	1532	14	1	51,06	1,52*
1	1024	1968	8	0	65,60	1,66
10	986	2007	6	1	66,90	1,67
50	1013	1974	12	1	65,80	1,66
100	889	2096	13	2	69,86	1,70
500	1002	1987	9	2	66,23	1,67
1000	978	2008	12	2	66,93	1,68

Para cada experimento (n=3) foram analisadas 2 lâminas (500 células por lâmina) totalizando 3000 células analisadas. IDN = índice de divisão nuclear $([M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / n)$, M1-M4 são número de células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos e n o número total de células analisadas. CN (controle negativo). DXR (doxorubicina 0,03µg/mL). *estatisticamente diferente do controle negativo (p<0,05).

Tabela 12. Frequência de micronúcleos em células HepG2 binucleadas tratadas com diferentes concentrações de Rs3.

Rs3 (nM)	Células binucleadas com presença de micronúcleos
CN	36 ± 3,3
DXR	102 ± 4,6*
1	42 ± 2,6
10	28 ± 1,3
50	32 ± 2,0
100	45 ± 3,6
500	29 ± 3,0
1000	43 ± 2,3

Para cada experimento (n=3) foram analisadas 2 lâminas (500 células por lâmina) totalizando 3000 células analisadas. CN (controle negativo). DXR (doxorubicina 0,03µg/mL). *estatisticamente diferente do controle negativo (p<0,05).

Os resultados da análise do IDN mostraram que os tratamentos com Rs3 nas concentrações avaliadas também não resultaram em diferenças significativas, quando comparados ao controle negativo, assim como não mostraram diferença no número de micronúcleos das células expostas em relação ao controle negativo.

Os resultados dos ensaios do cometa e micronúcleo para as amostras Rs1 e Rs3 demonstraram que estas toxinas não são capazes de induzir mutagenicidade e genotoxicidade em células HepG2 nas concentrações utilizadas. Estes dados sugerem que a via de ativação de morte celular e citotoxicidade que estas toxinas geram nas células HepG2 não estão relacionadas a danos ao DNA destas células. Estudos de genotoxicidade com bufadienólídeos são raros na literatura. Um estudo realizado por Lee e colaboradores (2014) avaliou a citotoxicidade e genotoxicidade do Chansu em células tumorais de câncer de mama humano (MCF-7), carcinoma de pulmão humano (A-549), leucemia (células T Jurkat humanas) e em linfócitos sadios humanos e os resultados demonstraram que o Chansu causou tanto citotoxicidade quanto genotoxicidade nas células tumorais, de forma concentração-dependente. No entanto, o Chansu não exerceu efeitos nos linfócitos normais, demonstrando mais uma vez um efeito citotóxico mais seletivo para células tumorais do que para células sadias.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

A fração de baixa massa molecular do veneno de *Rhinella schneideri* (VRs) foi citotóxica para quatro das seis linhagens tumorais estudadas (B16F10, HepG2, HL-60 e Skbr-3) e para hepatócitos primários. A maioria dos resultados não demonstrou relação concentração-resposta, já que se trata de uma mistura complexa de toxinas, que podem interagir com as células de diferentes maneiras, e até opostas, gerando efeitos diversos.

Os experimentos mitocondriais realizados com o VRs, demonstrou que ele não interfere nos parâmetros bioenergéticos de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos saudáveis, e também não alterou negativamente os parâmetros oxidativos. Ao contrário, o VRs demonstrou característica antioxidante ao diminuir o acúmulo de EROs quando induzidos por t-butil hidroperóxido, por mecanismo ainda desconhecido.

Por demonstrar citotoxicidade em hepatócitos primários e não interferir nos principais parâmetros mitocondriais, sugere-se que o VRs não atue diretamente sobre a mitocôndria, e a sinalização inicial para morte nestas células não acontece via mitocondrial. Não existem estudos publicados analisando os efeitos diretos sobre mitocôndrias de secreções de venenos de sapos ou toxinas isoladas, portanto não foi possível comparar os resultados obtidos com dados da literatura.

As toxinas Rs1 e Rs3, isoladas por cromatografia de fase reversa demonstraram ser citotóxicas às células tumorais HepG2 e pouco interferiram na viabilidade celular de hepatócitos primários, característica extremamente importante para uma possível ação antitumoral.

Estas toxinas foram capazes de induzir a dissipação do potencial de membrana, e também causaram a condensação da cromatina e fragmentação nuclear, características de células em apoptose. A análise da distribuição do ciclo celular em células HepG2 após o tratamento com Rs1 e Rs3, demonstrou que estas toxinas interferem na progressão do ciclo celular. Os ensaios realizados com anexina V e PI, demonstram que ambas as toxinas são capazes de induzir as células HepG2 à morte, principalmente pelo processo de apoptose. E os ensaios de ativação de caspases 3, 8 e 9 confirmaram a ativação da apoptose, tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca.

Os ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade revelaram que ambas as toxinas não causaram danos ao DNA das células HepG2.

Desta forma, os resultados obtidos neste estudo indicam a seletividade dos efeitos citotóxicos das toxinas Rs1 e Rs3 pelas células tumorais HepG2, induzindo estas células à morte principalmente por apoptose, evidenciando o potencial uso destas duas toxinas em terapias antitumorais.

Referências

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKERMAN, K.E.O.; WIKSTROM, M.K.F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **Febs Lett.**, v.68, p.191-197, 1976.
- ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**, v. 28, no. 1, 118-129, 2005.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.343, p. 121-135, 1995.
- AMARANTE-MENDES, G. P.; GREEN, D. R.. The regulation of apoptotic cell death. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v.32, n.9, p.1053-61, 1999.
- AMES, B.N. et al., Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 134, p.111-116, 1983.
- ANJOLETTE, F.A.P.; LEITE, F.P.; BORDON, K.C.F.; AZZOLINI, A.E.C.S.; PEREIRA, J.C.; PEREIRA-CROTT, L.S.; ARANTES, E.C. Biological characterization of compounds from *Rhinella schneideri* poison that act on the complement system. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases** (Online), v. 21, 1-12, 2015.
- ARAVALLI, R.N.; STEER, C.J.; CRESSMAN, E.N. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 48, p. 2047–2063, 2008.
- ASHKENAZI, A. Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, 420-30, 2002.
- BALDO, E.C.F.; ANJOLETTE, F.A.P.; ARANTES, E.C.; BALDO, M.A. Toad poison and drug Discovery. *In: Toxins and Drug Discovery*, 1^a ed., editora Springer, p. 1-22, 2015.
- BALDO, M.A. Caracterização estrutural e estudo do perfil neurofarmacológico de substâncias isoladas do veneno de *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae). Tese (Doutorado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. 2015.
- BALDO, M.A.; LIBERATO, J.L.; GODOY, L.D.; SANTOS, W.F.; ARANTES, E.C. New perspective for therapy against seizures using molecules from *Rhinella schneideri* toad poison. **Toxicon**, v. 60, 95-248, 2012.
- BATISTA, R.C.; DE-CARVALHO, C.B.; FREITAS, E.B.; CUNHA FRANCO, S.C.; BATISTA, C.C.; COELHO, W.A.; FARIA, R.G. Diet of *Rhinella schneideri* (Werner, 1894) (Anura: Bufonidae) in the Cerrado, Central Brazil. **Herpetology Notes**, v. 4, p. 017-021, 2011.
- BEDFORD, P.G.C. Toad venom toxicity and its clinical occurrence in small animals in the United Kingdom. **Vet. Rec.**, v.94, n.26, p.613-614, 1974.

BERS, D. M. Digitalis and Na/Ca exchange: old dog learns new mitochondrial tricks. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 49, n. 5, p. 713-4, 2010.

BICUDO, P. L. Envenenamentos em animais domésticos sobre causados por serpentes, artrópodes e sapos. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo, Sarvier, p.437-449, 2003.

BLECHACZ, B.; MISHRA, L. Hepatocellular carcinoma biology. **Recent Results Cancer Res.**, 190, p. 1-20, 2013.

BOATRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 15, 725-31, 2003.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol. Immunol.**, Oxford, v.39, n.11, p.615-647, 2003.

BRACHT, A.; IWAMOTO, E. L. I. O estudo do metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de tecido animal. In: Métodos de laboratório em bioquímica. 1ª Ed, Manole, São Paulo, 2003, cap. 9, p. 227-246, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, pp.248-54, 1976.

BRAYLAN, R.C.; BENSON, N.A.; NORSE, V.; KRUTH, H.S. Correlated analysis of cellular DNA membrane antigens, and light scatter of human lymphoid cells. **Cytometry**. 2(5), p. 337-343, 1982.

BRAZIL, V.; VELLARD, J. Contribuição ao estudo dos Batrachios. **Memórias do Instituto de Butantan**, v. 3, p. 7-70, 1926.

BUDIHARDJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, 15:269-90, 1999.

CAIN, K.; SKILLETER., D.N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (Eds.). **Biochemical Toxicology**. Oxford: IRL Press, p.217-254, 1987.

CÂMARA, R.L.B.; ROSELINO, J.E.S.; COLLI, B.O. *Swelling* mitocondrial em amostras teciduais de gatos submetidos à oclusão da artéria cerebral média. **Acta Cir. Bras.**, vol.16, suppl.1 São Paulo, 2001.

CARLOTTI JUNIOR, C.G.; COLLI, B.O.; KAZUO, J.Y. Avaliação da isquemia cerebral pela respiração mitocondrial: modelo experimental. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, vol.59, n.2B, pp. 365-371, 2001.

ÇAVAS, T. C.; KONEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**, 22, 263–268, 2007.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv.Enzymol.**, New York, v.17, p.65-134, 1956.

CHI, H. T; HUNG M D.Z.; HU, W.H.; YANG, D.Y. Prognostic implications of hyperkalemia in toad toxin intoxication. **Human & Experimental Toxicology**, v.17, p.343-346, 1998.

CHOI, J. Y.; CHO, H.-J.; HWANG, S.-G.; KIM, W.-J.; KIM, J.-I.; UM, H.-D.; PARK, J. K. Podophyllotoxin acetate enhances g-ionizing radiation-induced apoptotic cell death by stimulating the ROS/p38/caspase pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 70, p. 111-118, 2015.

CIANCIO, G.; POLLACK, A.; TAUPIER, M.A. Measurement of cell-cycle phase-specific cell death using Hoechst 33342 and propidium iodide: preservation by ethanol fixation. **J. Histochem. Cytochem.**, 36(9):1147-52, 1988.

CLARKE, B.T. The Natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potencial medical applications. **Biol. Rev.**, United Kingdom, v.72, p. 366-379, 1996.

CORY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat. Rev. Cancer**, v.2, p. 647-656, 2002.

CRISMAN, H.A.; STEINKAMP, J.A. Rapid simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cell from large mammalian cell populations. **J. Cell Biol.**, 59: 766, 1973.

CUNHA-FILHO, G. A., et al. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Toxicon**, v. 56, p. 338-49, 2010.

DAVID, J. A. O. Estudo de *Mytella falcata* (mollusca, bivalvia) como indicadora de efeitos genotóxicos e citotóxicos no estuário de Santos, SP. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências do campus de Rio Claro, 2007.

DENIZOT, F; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods**, 89(2):271-7, 1986.

DIEHL, J.A. Cycling to cancer with cyclinD1. **Cancer Biol. Ther.**, 1, 226–231, 2002.

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: 2068–2083, 2003.

EASTMAN, A. Cell Cycle Checkpoints and Their Impact on Anticancer Therapeutic Strategies. **Journal of Cellular Biochemistry**, 91:223–231, 2004.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, 35, p.495–516, 2007.

EMAUS, R.K.; GRUNWALD, R.; LEMASTERS, J.J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat liver mitochondria: spectral and metabolic properties. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.850, p.436-448, 1986.

FAN, L.; MA, Y.; LIU, Y.; ZHENG, D.; HUANG, G. Silymarin induces cell cycle arrest and apoptosis in ovarian cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 743, p. 79-88, 2014.

FAVALORO, B.; ALLOCATI, N.; GRAZIANO, V.; DI ILIO, C.; DE LAURENZI, V. Role of apoptosis in disease. **Aging**, 4(5), 330-49, 2012.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERO, M.L.; RIVKIN, M.; TASCH, M.; PORTER, P.; CAROW, C.E.; FIRPO, E.; POLYAK, K.; TSAI, L.H.; BROUDY, V.; PERLMUTTER, R.M.; KAUSHANSKY, K.; ROBERTS, J.M. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. **Cell**, 85,733–744, 1996.

FORNARI-BALDO, E.C.; ANJOLETTE, F.A.P.; ARANTES, E.C.; BALDO, M.A. Toad poison and drug Discovery. *In: Toxins and Drug Discovery*. Springer Netherlands. No prelo.

FORNARI-BALDO, E.C.; SILVA, C.P.; SAMPAIO, S.V.; ARANTES, E.C. Evaluation of the cytotoxic activity of *Rhinella schneideri* toad poison on tumor cells and on healthy mononuclear cells. **Toxicon**, v. 60, 103-103, 2012.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**,14, 144-149,2008.

FROST, Darrel R. 2016. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.6 (1 July 2016). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, 25:4798-811, 2006.

GAO, H.; POPESCU, R.; KOPPB, B.; WANG, Z. Bufadienolides and their antitumor activity. **Nat. Prod. Rep.**, 28, 953, 2011.

GHAVAMI, S. et. al. Brevinin 2R(1) Semi-selectively Kills Cancer Cells By A Distinct Mechanism, Witch Involves Lysosomal-mitochondrial Death Pathway. **J. Cell. Mol. Med.**, 12, 1005, 2005.

GOLIAS, C.H.; CHARALABOPOULOS, A.; CHARALABOPOULOS, K. Cell proliferation and cell cycle control: A mini review. **Int. J. Clin. Pract.**, 58, 1134–1141, 2004.

GOTTLIEB, R. A. Mitochondrial and apoptosis. **Biol. Signals Recept.**,10:147-61, 2001.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 53(3), p.335-343, 2007.

GUAN, J.; ZHAO, X.H.; JIANG, B.S.; CHEN, Z.W.; QIN, Q.Y. Preliminary study on the antitumor mechanism of cinobufacini injection. **Journal of Bengbu Medical College**, v. 18, p. 78–81, 1993.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine, third ed. Oxford University Press, New York., 1999.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, p. 57, 2000.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, 407:770-76, 2000.

HISSIN, P.J.; HILF, R. A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.74, p.214-226, 1976.

<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAA-IEAJ/a-celula-apoptotica-aula-13-biologia-celular-ii-cederj> (acessado em 20/11/2014)

<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/tabelaestados.asp?UF=BR> (acessado em 20/11/2014)

HUANG, W. W. et al. Bufalin induces G(0)/G(1) phase arrest through inhibiting the levels of cyclin D, cyclin E, CDK2 and CDK4, and triggers apoptosis via mitochondrial signaling pathway in T24 human bladder cancer cells. **Mutat. Res.**, v. 732, n. 1-2, p. 26-33, 2012.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death And Anti-Death: Tumour Resistance To Apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 277-288, 2002.

IMBERTI, R.; NIEMINEM, A. L.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J. J. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide:protection by fructose, cyclosporine A and trifluoperazine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 265, 392-400, 1993.

INCA, 2016. *Incidência de câncer no Brasil*. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. **Instituto Nacional de Câncer** (acessado em 20/06/2016).

INCA. Fisiopatologia do câncer. In: Políticas Públicas de Saúde. 2. ed. Rio de Janeiro. p. 49-77, 2002.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil, 2014. Disponível em www.ibge.gov.br (acessado em 10/06/2016).

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil, 2014. Disponível em www.inca.gov.br/estimativa. Acessado em 15/02/2014.

JARED, C.; ANTONIAZZI, MM. Anfíbios: biologia e seus venenos. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad, Jr. V. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo: Sarvier, 2009.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H.; THEOBALD, N. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research**, 498: 61-77, 2001.

KELLEY, R.K.; VENOOK, A.P. Sorafenib in hepatocellular carcinoma: Separating the hype from the hope. **J. Clin. Oncol.**, v.26, p.5845–5848, 2008.

KELLY, R.A.; SMITH, T.W. Tratamento farmacológico da insuficiência cardíaca. In: Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 9ª edição, MacGraw-Hill, 1996.

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

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239-57, 1972.

KIECHLER, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clin. Chim. Acta**, v. 326, p. 27–45, 2002.

KNASMULLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; DARROUDI, F.; HUBER, W.W.; HOELZL, C.; BICHLER, J.; MAJER, B. J. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxins; current state of knowledge. **Toxicology** 198 (1–3), 315–328. 2004.

KNASMULLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUD, F.; NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, 402:185-202. 1998.

KNOWLES, B. B.; HOWE, C. C.; ADEN, D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. **Science**, 209: 497–499. 1980.

KNOWLES, R.P. Toad poisoning in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.163, p.1202, 1968.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 495, p. 12-15, 2001.

KRAMMER, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, 407:789-95, 2000.

KROEMER, G.; REED, J. C. Mitochondrial control of cell death. **Nat. Med.**, 6:513-16, 2000.

KUMAR V.; ABBAS A.K.; FAUSTO N. "In: Patologia – Bases patológicas das doenças". 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 281-356, 2005.

LAMBERTON, J.A.; MORTON, T.C. The epoxy lactone ring of the coumarin micromelin: Formation of a new epimer. **Aust. J. Chem.**, 38, 1025, 1985.

LEE, S.; LEE, Y.; CHOI, Y.J.; HAN, K.S.; CHUNG, H.W. Cyto-/genotoxic effects of the ethanol extract of ChanSu, a traditional Chinese medicine, in human cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, p. 372–376, 2014.

LEMASTERS, J.J. Mechanisms of hepatic toxicity V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *The American Journal of Physiology*, Washington, v. 276, n. 1, p. G1-G6, 1999.

LEMASTERS, J.J.; DIGIUSEPPI, J.; NIEMINEM, A.L.; HERMAN, B.B. Free calcium and mitochondrial membrane potential preceding cell death hepatocytes. **Nature**, v.325, p.78-81, 1987.

LEWIS, R.J.; GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature Review Drug Discovery**. v. 2, 790-802, 2003.

LI, C.; HASHIMI, S.M.; CAO, S.; MELLICK, A.S.; DUAN, W.; GOOD, D.; WEI, M.Q. The Mechanisms of Chansu in Inducing Efficient Apoptosis in Colon Cancer Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-11, 2013.

LI, D.; QU, X.; HOU, K. PI3K/Akt is involved in bufalin-induced apoptosis in gastric cancer cells. **Anticancer Drugs**, v. 20, p. 59-64, 2009.

LIU, B.R.; XU, X.L.; LIU, W.C.; MENG, X.Z. Effects of four extracts of traditional Chinese medicinal materials on the proliferation of human lung cancer A549 cell line. **Chinese Pharmacological Bulletin**, v. 18, p. 94–96, 2002.

LIU, T.; BROWN, D. A.; O'ROURKE, B. Role of mitochondrial dysfunction in cardiac glycoside toxicity. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 49, n. 5, p. 728-36, 2010.

LLOVET, J.M.; RICCI, S.; MAZZAFERRO, V.; HILGARD, P.; GANE, E.; BLANC, J.-F.; DE OLIVEIRA, A.C.; SANTORO, A.; RAOUL, J.-L.; FORNER, A. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. **N. Engl. J. Med**, 359, p.378–390, 2008.

LU, C; NAN, K.; NIE, Y.; HAI, Y.; JIAO, M. Delisheng, a Chinese medicinal compound, exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HepG2 cells trough extrinsic and intrinsic pathway. **Mol. Biol. Rep.**, 37:3407-3412, 2010.

MACHADO, A. E. D. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quim. Nova**, 23, 237, 2000.

MAMELAK, A. N. et. al. Phase I single dose study of intracavitary-administered iodine-131-TM-601 in adults with recurrent high-grade glioma. **J. Clin. Oncol.**, 24, 3644, 2006.

MASSAGUE, J. G1 cell-cycle control and cancer. **Nature**, 432, 298–306, 2004.

MATSUMOTO, S. T. Estudos sobre a influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de recursos hídricos da região de Franca/SP. 2004. 216 f. Tese (Doutorado em Genética), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2004.

MAURILLO, L.; POETA, G. D. ; VENDITTI, A.; BUCCISANO, F.; BATTAGLIA, A.; SANTINELLI, S. Quantitative analysis of FAS and bcl-2 expression in hematopoietic precursors. **Haematologica**, Pavia, v.86, n.3, p.237-243, 2001.

MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters**, n. 99, p. 157-168, 1998.

McHUGH, P.; TURINA, M. Apoptosis and Necrosis: A Review for Surgeons. **Surgical Infections (Larchmt)**, 7(1), p.53-68, 2006.

MEBS, D. Venomous and Poisonous Animals: A Handbook for Biologists, Toxicologists and Toxinologists, Physicians and Pharmacists. Boca Raton, FL: CRC Press, 2002.

MEBS, D., et al. Studies on the poisonous skin secretion of individual red bellied toads, *Melanophryniscus montevidensis* (Anura, Bufonidae), from Uruguay. **Toxicon**, v. 46, p. 641-650, 2005.

MELO, J. U. S. et al. O estresse oxidativo na regeneração hepática em ratos. **Ver. Col. Bras. Cir.**, v.35, n.6, 2008.

MENG, Z.; YANG, P.; SHEN, Y.; BEI, W.; ZHANG, Y.; GE, Y.; NEWMAN, R.A.; COHEN, L.; LIU, L.; THORNTON, B.; CHANG, D.Z.; LIAO, Z.; KURZROCK, R. Pilot study of huachansu in patients with hepatocellular carcinoma, nonsmall-cell lung cancer, or pancreatic cancer. **Cancer**, 115(22), p. 5309–5318, 2009.

MIAO, Q. et al. Anticancer Effects of Bufalin on Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells: Roles of Apoptosis and Autophagy. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 1, p. 1370-82, 2013.

MINGATTO, F.E., et al. The critical role of mitochondrial energetic impairment in the toxicity of nimesulide to hepatocytes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 303, n.2, p. 601-607, 2002.

MORTARI, M.R.; CUNHA, A.O.S.; FERREIRA, L.B.; SANTOS, W.F. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: From basic research to therapeutic application. **Pharmacology & Therapeutics**, 114, p. 171-183, 2007.

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

MURAD, A.M.; KATZ, A. Oncologia Bases Clínicas do Tratamento. Guanabara; Rio de Janeiro, p. 41, 1996.

NAHLE, Z.; POLAKOFF, J.; DAVULURI, R. V.; MCCURRACH, M. E.; JACOBSON, M. D.; NARITA, M.; ZHANG, M. Q.; LAZEBNIK, Y.; BAR-SAGI, D.; LOWE, S. W.

Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. **Nature Cell Biology**, v. 4, p. 859-864, 2002.

NAISMITH, J. H.; SPRANG, S. R. Modularity in the TNF-receptor family. **Trends Biochem. Sci.**, 23:74-79, 1998.

NIKOLETOPOULOU, V.; MARKAKI, M.; PALIKARAS, K.; TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1833, 3448–3459, 2013.

NOGAWA, T.; KAMANO, Y.; YAMASHITA, A.; PETTITL, G. R. Isolation and structure of five new cancer cell growth inhibitory bufadienolides from the Chinese traditional drug Chan Su. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1148–1152, 2001.

OLIVEIRA, H. C., et al., Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 19, p.278-280, 2005.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Quim. Nova**, 25, 976, 2002.

PABLA, N.; DONG, Z. Curtailing side effects in chemotherapy: a tale of PKC δ in cisplatin treatment. **Oncotarget**, v. 3, 107-111, 2012.

PARK, J.W.; LEE, S.Y.; YANG, J.Y.; RHO, H.W.; PARK, B.H.; LIM, S.N.; KIM, J.S.; KIM, H.R. Effect of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) on the dimerization of lipoprotein lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1344 (2): 132–8, 1997.

PEC, M. K.; AGUIRRE, A.; MOSER-THEIR, K.; FERNANDEZ, J. J.; SOUTO, M. L.; DORTA, J.; DIAZ-GONZALEZ, F.; VILLAR, J. Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by marine terpenoid dehydrothysiferol. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 1451-1461, 2003.

PEDERSEN, P.L.; GREENAWALT, J.W.; REYNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G.L.; SOPER, J.W.; BUSTAMANTE, E. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. **Meth. Cell. Biol.**, v. 20, p.411- 481, 1978.

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

PIETENPOL, J.A.; STEWART, Z.A. Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis. **Toxicology**, 181/182, p. 475-481, 2002.

QI, F.; LI, A.; INAGAKI, Y.; KOKUDO, N.; TAMURA, S.; NAKATA, M.; TANG, W. . Antitumor activity of extracts and compounds from the skin of the toad *Bufo bufo gargarizans* Cantor. **International Immunopharmacology**, 11, 342–349, 2011.

QIN, T.J.; ZHAO, X.H.; YUN, J.; ZHANG, L.X.; RUAN, Z.P.; PAN, B.R. Efficacy and safety of gemcitabine-oxaliplatin combined with huachansu in patients with advanced

gallbladder carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, 14(33), p. 5210-5216, 2008.

RAJDEV, S.; REYNOLDS, I. J. Calcium green-5N, a novel fluorescent probe for monitoring high intracellular free Ca^{2+} concentrations associated with glutamate excitotoxicity in cultured rat brain neurons. **Neuroscience Letters**. Amsterdam, v. 162, p. 149–152, 1993.

RAMENGHI, U.; BONISSONI, S.; MIGLIARETTI, G.; DEFRANCO, S.; BOTTAREL, F.; GAMBARUTO, C. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. **Blood**, Washington, v.95, n.10, p.3176-82, 2000.

REED, J.C.; GREEN, D.R. Apoptosis: Physiology and Pathology. Cambridge University Press, p.37-40, 2011.

RIMASSA, L.; SANTORO, A. Sorafenib therapy in advanced hepatocellular carcinoma: The SHARP trial. **Expert Rev. Anticancer Ther**, v. 9, p.739–745, 2009.

RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. Colon cancer: genetics and apoptotic events. **Biol. Chem.**, 385:449-64, 2004.

RUSSEL, F.E.; SOUNDERS, P.R. Animal Toxins: A collection of papers presented at the First International Symposium on Animal Toxins. New Jersey, p. 393, 1966.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste de micronúcleo em células humanas in vitro. . In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 201-220, 2003.

SBH. 2015. *Brazilian amphibians – List of species*. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br>. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Captured on 22 de novembro de 2015.

SCHULER, M.; MAURER, U.; GOLDSTEIN, J. C. p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation. **Cell. Death. Differ.**, 10:451-60, 2003.

SCHULTZ, D. R., HARRINGTON W. J. JR. Apoptosis: Programmed Cell Death at a Molecular Level. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, 32(6), p.345-369, 2003.

SCIANI, J.M.; DE-SA-JUNIOR, P.L.; FERREIRA, A.K.; PEREIRA, A.; ANTONIAZZI, M.M.; JARED, C.; PIMENTA, D.C. Cytotoxic and antiproliferative effects of crude amphibian skin secretions on breast tumor cells. **Biomedicine & Preventive Nutrition** 3, 10–18, 2013.

SHERR, C.J.; ROBERTS, J.M. CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev.**, 13, 1501–1512, 1999.

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, n.1, p.184-191, 1988.

SLUSE, F.E.; JARMUSZKIEWICZ, W. Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. **Braz J Med Biol Res.**,(6):733-47, 1998.

SPENCE, R. A. J.; JONHSTON, P. G. Em *Oncology*; Jonhston, P. G., ed; Oxford University Press: Oxford, p. 1-14, 121-132, 2001.

SU, Y.H.; HUANG, X.Q.; ZHANG, D.Z.; ZHANG, Y.N.; XIE, J.M.; LINH, C.Q. HPLC separation and determination of bufadienolide in cinobufacini injection. **Chinese Traditional Patent Medicine**, 25, p.24–27, 2003.

SUDA, T.; TAKAHASHI, T.; GLODTEIN, P.; NAGATA, S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosisfactor family. **Cell.**, Cambridge, v.75, n.6, p.1169-78, 1993.

SUN, C et. al. Tumor-targeted drug delivery and MRI contrast enhancement by chlorotoxin-conjugated iron oxide nanoparticles. **Nanomed**, 3, 495, 2008.

TAKAI, N.; KIRA, N.; ISHII, T.; YOSHIDA, T.; NISHIDA, M.; NISHIDA, Y.; NASU, K.; NARAHARA, H. Bufalin, a Traditional Oriental Medicine, Induces Apoptosis in Human Cancer Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, p. 399-402, 2012.

TEMPONE, A. G., et al. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. **Toxicon**, v. 52, p. 13-21, 2008.

TENNANT, J.R. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. **Transplantation**, v.2, p. 685-694, 1964.

THOMPSON, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, 267,p.1456-62, 1995.

THORE, A. Thechnical aspects of bioluminescent firefly luciferase assay of ATP. **Science Tools**, Stockholm, v. 26, n. 2, p. 30- 34, 1979.

TIAN, H. Y. et al. New bufadienolides and C(23) steroids from the venom of Bufo bufo gargarizans. **Steroids**, v. 75, n. 12, p. 884-90, 2010.

TICE, R. The Single Cell/ Comet Assay: A Microgel Eletroforetic Technique for the Detection of DNA Damage and Repair in Individual Cell. In: Phillips, D. H.; Vennit, S.(Eds.). **Environmental Mutagenesis**, 315- 339, 1995.

TICE, R.R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, n.3, p.206-221, 2000.

TOLEDO, R. C; JARED, C.; Review: Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Biochem. Physiol.**, v.111A, n.1, p.1-29, 1995.

UMBUZEIRO, G. A.; ROUBICEK, D. A.; Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima, 327-344, 2003.

VAN HEERDE, W. L.; ROBERT-OFFERMAN, S.; DUMONT, E.; HOFSTRA, L.; DOEVENDANS, P. A.; SMITS, J. F. M.; DAEMEN, M. J. A.P.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. Marques of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. **Cardiovascular Research**, v. 45, p. 549-559, 2000.

VANDER HEIDEN, M. G. V.; THOMPSON, C. B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? **Nat. Cell. Biol.**, 1:E 209-16, 1999.

VASCONCELOS, S.M.L.; SILVA, M.A.M.; GOULART, M.O.F. Pró-antioxidantes e antioxidantes de baixo peso molecular oriundos da dieta: estrutura e função. **Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.**, v. 31, n. 3, p. 95-118, 2006.

VAUX, D.L.; KORSMEYER, S.J. Cell death in development. **Cell**, v. 96, p. 245-54, 1999.

WALLACE, K.B.; STARKOV, A.A. Mitochondrial targets of drug toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 40, p.353-388, 2000.

WANG, J. K. et al. Cardiac glycosides provide neuroprotection against ischemic stroke: discovery by a brain slice-based compound screening platform. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 103, n. 27, p. 10461-6, 2006.

WETZEL, E.B.; GREEN, D.R. Apoptosis: checkpoint at the mitochondria frontier. **Mut. Res.**, 434:243-51, 1999.

WU, P.L., et al. Kalanchosides A-C, new cytotoxic bufadienolides from the aerial parts of *kalanchoe gracilis*. **Organic Letters**, v. 8, p. 5207–5210, 2006.

www.ibge.gov.br (acessado em 20/11/2014)

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.R.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.** 68, 251–305. 1980.

XIE, X.; HUANG, X.; LI, J.; LV, X.; HUANG, J.; TANG, S.; SUN, Y. Efficacy and safety of Huachansu combined with chemotherapy in advanced gastric cancer: A meta-analysis. **Medical Hypotheses**, 81(2), p. 243–250, 2013.

XIE, X.B. et al. Critical role of heat shock protein 27 in bufalin-induced apoptosis in human osteosarcomas: a proteomic-based research. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. 47375, 2012.

XU, Z. W. et al. Cardiotonic steroids attenuate ERK phosphorylation and generate cell cycle arrest to block human hepatoma cell growth. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 125, n. 3-5, p. 181-91, 2011.

YE, M., et al. Microbial Hydroxylation of Bufalin by *Cunninghamella blakesleana* and *Mucor spinosus*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 626–628, 2005.

ZELNIK, R.; ZITI, L.M.; GUIMARÃES, C.V. A Chromatographic study of the bufadienolides from the venom of the parotid glands of *Bufo Paracnemis* Lutz. **J. Chromatography**, v.16, p.9-14, 1963.

ZHANG, D. M. et al. Bufotalin from Venenum Bufonis inhibits growth of multidrug resistant HepG2 cells through G2/M cell cycle arrest and apoptosis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 692, n. 1-3, p. 19-28, 2012.

ZHANG, D. M.; LIU, J. S.; DENG, L.J.; CHEN, M.F.; YIU, A.; CAO, H.H.; TIAN, H.Y.; FUNG, K.P.; KURIHARA, H.; PAN, J.X.; YE, W.C. Arenobufagin, a natural bufadienolide from toad venom, induces apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway: **Carcinogenesis**, v. 34, p. 1331-42, 2013.

ZHANG, L.S.; NAKAYA, K.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y. Induction by bufalin of differentiation of human leukemia cells HL60, U937, and ML1 toward macrophage/monocyte-like cells and its potent synergistic effect on the differentiation of human leukemia cells in combination with other inducers. **Cancer Res.**, v. 52, p. 4634-41, 1992.

ZHIVOTOVSKY, B.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. **Cell Death Differ.**, v 6(7), p. 644-651, 1999.

ZHOU, D.; WEI, A.; CAO, C.; RUAN, J. DICO, a novel nonaromatic B-ring flavonoid, induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatoma cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 322-329, 2013.

ZHU, X.Y.; LIU, L.M. Research progress on the antitumor mechanism of Cinobufacini injection and its active ingredient. **Tumor Journal of World**, 5, p.272-5, 2006.

ZORATTI, M; SZABO, I, The mitochondrial permeability transition. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1241, p. 139-176, 1995.

ZUO, X.; CUI, Y.; QIN, S.; CHEN, H.; WANG, J. Effect of cinobufacini on tumor cell cycle and expression of bcl-2 protein. **Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and West Medicine**, v. 6, p. 567-568, 2003b.

ZUO, X.; QIN, S.; WANG, J.; CUI, Y.; CHEN, H.Y. Research on the effect of cinobufacini on human gastric neoplasm cell line MGC-80-3. **Chinese Clinical Oncology**, v. 1, p. 33-37, 2003a.

Anexos

ANEXO I. Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo 13.1.765.53.2), intitulado "Estudo das atividades antineoplásicas, citotóxicas e genotóxicas de toxinas isoladas do veneno de *Rhinella schneideri*", de autoria de **Elisa Corrêa Fornari Baldo e Eliane Candiani Arantes**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 07/10/2013.

Colaboradores: Daniel Junqueira Dorta
Lusânia Maria Gregg Antunes
Maria Regina Torqueti
Suely Vilela Sampaio

This is to certify that the work (Protocol number 13.1.765.53.2), entitled: "Estudo das atividades antineoplásicas, citotóxicas e genotóxicas de toxinas isoladas do veneno de *Rhinella schneideri*", by **Elisa Corrêa Fornari Baldo and Eliane Candiani Arantes** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in an ordinary meeting of CEUA, October, 7 2013.

Ribeirão Preto, 08 de outubro de 2013.

Presidente da CEUA

Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Vanessa Bombonato Garcia

ANEXO II. Certificado de Regularidade do Biotério Central emitido pelo IBAMA para utilização de diferentes venenos animais.

7/17/2016

IBAMA - Serviços On-Line - Certificado de Regularidade

Ministério do Meio Ambiente
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

CADASTRO TÉCNICO FEDERAL
CONSULTA PÚBLICA A CERTIFICADO DE REGULARIDADE - CR

Registro n.º: 1508748
Data da consulta: 17/07/2016
CR emitido em: 18/05/2016
CR válido até: 18/08/2016

Dados básicos

CNPJ:	03.025.530/0026-62
Razão social:	FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP
Nome fantasia:	FMRP - CRIADOURO CIENTÍFICO DA USP
Data de abertura:	21/05/1952

Endereço

Logradouro: AV. BANDEIRANTES 3900	Complemento: CAMPUS DA USP
N.º: 3900	Município: RIBEIRÃO PRETO
Bairro: MONTE ALEGRE	UF: SP
CEP: 14049-900	

Cadastro Técnico Federal de Atividades Potencialmente Poluidoras e Utilizadoras de Recursos Ambientais – CTF/APP

Categoria	Detalhe
20 - Uso de Recursos Naturais	45 - criação científica de fauna silvestre para fins de pesquisa
20 - Uso de Recursos Naturais	41 - utilização do patrimônio genético natural - coleta de material biológico com finalidade científica ou didática

Conforme dados disponíveis na presente data, a pessoa jurídica acima possui Certificado de Regularidade em conformidade com as obrigações cadastrais e de prestação de informações ambientais sobre as atividades desenvolvidas sob controle e fiscalização do Ibama, por meio do CTF/APP.

O certificado de regularidade emitido pelo CTF/APP não desobriga a pessoa inscrita de obter licenças, autorizações, permissões, concessões, alvarás e demais documentos exigíveis por instituições federais, estaduais, distritais ou municipais para o exercício de suas atividades.

O Certificado de Regularidade do CTF/APP não habilita o transporte e produtos e subprodutos florestais e faunísticos.

Fechar