

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do efeito neuroprotetor/neurotóxico de peptídeos de
baixo peso molecular provenientes de venenos das serpentes
Bothrops atrox, *Bothrops pirajai* e *Bothrops jararaca* em mitocôndrias
de cérebro de rato**

Danilo Avelar Sampaio Ferreira

**Ribeirão Preto
2010**

Danilo Avelar Sampaio Ferreira

**Avaliação do efeito neuroprotetor/neurotóxico de peptídeos de
baixo peso molecular provenientes de venenos das serpentes
Bothrops atrox, *Bothrops pirajai* e *Bothrops jararaca* em mitocôndrias
de cérebro de rato**

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

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos

**Ribeirão Preto
2010**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, Danilo Avelar Sampaio

Avaliação do efeito neuroprotetor/neurotóxico de peptídeos de baixo peso molecular provenientes de venenos das serpentes *Bothrops atrox*, *Bothrops pirajai* e *Bothrops jararaca* em mitocôndrias de cérebro de rato. Ribeirão Preto, 2010.

66 p.: il. ; 30cm.

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

Orientador: dos Santos, Antonio Cardozo.

1. Venenos de serpentes.
2. Neuroproteção.
3. Neurotoxicidade.
4. Estresse oxidativo.
5. Mitocôndrias.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Danilo Avelar Sampaio Ferreira

Avaliação do efeito neuroprotetor/neurotóxico de peptídeos de baixo peso molecular provenientes de venenos das serpentes *Bothrops atrox*, *Bothrops pirajai* e *Bothrops jararaca* em mitocôndrias de cérebro de rato

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família
(meu pai, minha mãe, meu irmão e minha cunhada,
minha sogra e minha cunhada Fernanda),
aos meus amigos, colegas de laboratório,
ao meu orientador (Prof. Antonio),
à minha co-orientadora (Neife),
aos meus irmãos, em Cristo,
e à Deus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, criador de todas as coisas, da sabedoria... Pelo sustento, por ser a minha força e a minha inspiração.

Aos meus pais, Alberto e Fátima, e ao meu irmão, Daniel, porque sem uma boa base familiar NINGUÉM consegue ir muito longe em seus objetivos... E, graças ao meu suporte familiar, à educação que me deram, por me mostrarem a importância de tudo na vida, é que hoje eu estou conseguindo galgar mais esse degrau em minha carreira... Amo muito vocês!!!!

À minha noiva, e, mui brevemente, esposa, Julliane, pela força de todas as horas, pelo carinho, pela atenção, pela paciência, pelo companheirismo... Enfim, pelo nosso amor!!!

À minha sogra, Nariman, pelo suporte, carinho, apoio e atenção, desde os tempos de Faculdade até hoje... Se não fosse você, também, talvez hoje eu não teria chegado até aqui.

Às minhas cunhadas, Fernanda e Maise, pelo carinho e pela boa companhia durante todos esses anos... Vocês também são minha família...

Ao meu sogro, Seu Euro, pelo apoio, pelo incentivo e pela companhia...

Às minhas tias Arlete e Fafá, pelo suporte estrutural e pelo incentivo constante... E ao Jean, marido de Tia Fafá, também por ter sido um grande apoio durante minha vinda para o Sudeste... Muito obrigado, pessoal!!!

Aos meus tios e tias, Edmundo e Nalvinha, Beto e Maria, Jorge, Cristina, Eliana, Carlos; e aos meus primos Izabela, Vinicius, Luciano, Fabiano, Roberta, Alan, Katy, Monique, Sara, Gian, Higo, Esther, Thalya, Thalyne e Thátyla, porque a família deve ser a nossa base, SEMPRE...

À minha querida prima/irmã, Luane, pelo carinho, apoio... Amo você, Lu!!!

Aos meus pastores, Argeu e Edina, João André e Nádia, Antonio e Ana Cláudia, Danilo e Mônica e Carlinhos e Elaine; aos meus líderes, Lucas e Vivian; aos meus queridos irmãos e ex-discipuladores, Fabinho e Giu, Rondy, Tia Dina; e aos irmãos do Ministério Pedra Forte, em Itagibá-BA, e da Comunidade Cristã de Ribeirão Preto, pelos novos laços de irmandade desenvolvidos e pela cobertura espiritual... Amo vocês também!!!!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio, pela oportunidade que me deu, por ter me recebido tão bem e pelo suporte acadêmico-científico... E à sua esposa, Dr^a. Neife, muito importante para que esse título fosse concluído... Sem a sua ajuda, talvez eu não conseguiria o êxito. Muito obrigado!!!

Às minhas colegas de Laboratório, Dr^a. Nádia, MSc. Maria Augusta (Magu), Ana Carolina (Aninha) e Márcia (Mââârrrrrrrcia), e ao recém-chegado colega, Roberto (Seu Batista)... Vocês também foram fundamentais...

Ao Prof. Dr. Carlos Curti e ao Dr. Cezar Rangel Pestana, do Laboratório de Bioquímica, por terem me ensinado muito... E aos técnicos Cris Polizello (nível superior), Dona Nadir e Alcides, pelo apoio e pela ajuda...

Aos amigos, também da Bioquímica, Vágner, Zé, Everton, Fernando, Roberta e Verônica, pela companhia durante esse tempo...

Aos professores Dr. Marcelo Baruffi, Dr^a. Eliane Braga, Dr. Andreimar Soares e Dr^a. Regina Queiroz, pelo apoio e experiências a mim concedidos...

À Farmacêutica Edna Barizon, do Laboratório de Hormônios do SAC, pela amizade e por ter proporcionado meu contato com o Prof. Antonio... Muito obrigado, Edna!

Aos funcionários do Serviço de Análises Clínicas (SAC), Zé Luís Morato, Maria Emília, Luciana, Analúza, Ana Paula, Eleni, Cláudia, Luisa, Carmem, Marta, Luciane e Lélis, pela amizade e pelos primeiros contatos com a USP...

Aos vigilantes, Sr. Antonio, Henrique, Paulo (do Bloco M) e Clóvis, pelo apoio, pela amizade e pela segurança de todos da Faculdade...

Às secretárias Ana, Rosana e Rossana, da Pós-graduação, e Sandra, Wânia Tavares e Wânia, pelo apoio sempre marcante... Vocês são nota 10!!!

Aos amigos Cris Bregge, Carol Marroni, Fernando e Flávia, da Físico-química, Lorena e Sandrinha, da Hemato, Danilo Menaldo, Carol Petri e Norival, da Toxinologia, Camilo e André Baldoni, da Assistência Farmacêutica, e aos amigos que marcaram bons momentos meus nesses últimos anos, os colegas do 3º SINPOSPq (2008) e da APG (gestão 2009/2010), porque as amizades também são fundamentais para o nosso bom desempenho...

E, por fim, aos amigos/irmãos, que me suportaram nesses últimos anos...
Vocês são demais... Kleiton, João Paulo, João Henrique, Sabino, Jhimmy, Fabrício,
Ciro, Felipe, Daniel e Maurício, valeu pela amizade, "os cara"!!!!

Muito obrigado a todos vocês que passaram pela minha e que permaneceram...

Com certeza, vocês contribuíram para que um dia eu fosse alguém tão bem
formado, como hoje eu posso dizer que sou... Que Deus os abençoe muito!!!!

EPÍGRAFE

*“... Não desampares a sabedoria, e ela te guardará;
ama-a, e ela te protegerá.” Pv. 4:6*

*“O temor do SENHOR é o princípio do saber,
mas os loucos desprezam a sabedoria e o ensino.” Pv. 1:7*

RESUMO

FERREIRA, D. A. S. **Avaliação do efeito neuroprotetor/neurotóxico de peptídeos de baixo peso molecular provenientes de venenos das serpentes *Bothrops atrox*, *Bothrops pirajai* e *Bothrops jararaca* em mitocôndrias de córtex cerebral de ratos.** 2010. 66f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

As doenças neurodegenerativas (DN), incluindo doença de Alzheimer e doença de Parkinson, estão entre as principais causas de mortalidade e morbidade nos países ocidentais. Não há ainda um tratamento definitivo para estas neuropatias, mas os estudos têm apontado para mecanismos comuns de toxicidade, que incluem disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e apoptose. Assim, as mitocôndrias constituem alvos importantes para futuras estratégias de neuroproteção visando tratar, prevenir ou retardar a neurodegeneração. A biodiversidade da fauna brasileira representa uma fonte promissora e ainda pouco explorada de novas moléculas com (i) atividade neuroprotetora e, portanto, potencial para originar novos fármacos para o tratamento destas doenças; ou ainda com (ii) atividade neurotóxica, podendo ser utilizadas como ferramentas de estudo de mecanismos de neurotoxicidade. O presente estudo teve por objetivo investigar o possível potencial neuroprotetor e/ou neurotóxico de peptídeos de baixo peso molecular, obtidos a partir do veneno de diferentes espécies de serpentes do gênero *Bothrops* por meio da investigação dos efeitos destes compostos na função mitocondrial de cérebro de rato. Duas das frações estudadas (obtidas a partir do veneno da *B. atrox* e da *B. jararaca*) apresentaram um interessante potencial protetor contra o intumescimento osmótico mitocondrial e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), eventos associados à transição de permeabilidade mitocondrial e à morte celular. Por outro lado, outra fração, obtida a partir do veneno da *B. pirajai*, apresentou potencial neurotóxico. Estes achados podem ser úteis para estudos mecanísticos e também no estabelecimento de futuras estratégias de tratamento das doenças neurodegenerativas, tendo as mitocôndrias como alvos terapêuticos (terapia alvo).

Palavras chave: venenos de serpentes; neuroproteção; neurotoxicidade; estresse oxidativo, mitocôndrias.

ABSTRACT

FERREIRA, D. A. S. **Evaluation of neuroprotective/neurotoxic effects of low-molecular-mass peptides from the venoms of the snakes *Bothrops atrox*, *Bothrops pirajai* and *Bothrops jararaca* in rat brain mitochondria.** 2010. 66f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

The neurodegenerative diseases, including Alzheimer's and Parkinson's diseases, are among the main causes of morbidity and mortality in Western countries. A definitive treatment for these neuropathies has not yet been found, but studies have indicated common mechanisms of toxicity, including mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptosis. Therefore, mitochondria represent important targets for the future neuroprotective strategies aimed to treat, prevent or delay the neurodegeneration. The Brazilian fauna biodiversity represents a promising and under explored source of new molecules with (i) neuroprotective activity and potential to originate new drugs for the treatment of these diseases; or yet, with (ii) neurotoxic activity, representing tools to study neurotoxicity mechanisms. The present study aimed to investigate the possible neuroprotective and/or neurotoxic potential of low-molecular-mass peptides extracted from the venom of different species of *Bothrops* genus snakes by investigating their effects on rat brain mitochondrial function. Two of the studied fractions (from *B. atrox* and *B. jararaca* venoms) presented an interesting protective potential against both the mitochondrial swelling and reactive oxygen species (ROS) production, events associated with mitochondrial permeability transition and cell death. On the other hand, other fraction (from *B. pirajai* venom) presented a neurotoxic potential. These findings might be useful for mechanistic studies and also for the establishment of future strategies of neurodegenerative diseases treatment, using mitochondria as therapeutic targets (targeted therapy).

Keywords: serpent venom; neuroprotection; neurotoxicity; oxidative stress; mitochondria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito da fração peptídica (p. V) do veneno de <i>B. atrox</i> sobre a indução do intumescimento osmótico mitocondrial	16
Figura 2. Inibição do intumescimento osmótico mitocondrial pela fração peptídica (p. V) do veneno da <i>B. atrox</i>	17
Figura 3. Efeito da fração peptídica (p. V) do veneno da <i>B. atrox</i> sobre o potencial de membrana mitocondrial	17
Figura 4. Efeito da fração peptídica (p. V) do veneno da <i>B. atrox</i> sobre o consumo de oxigênio no estado 3 da respiração mitocondrial	18
Figura 5. Efeito da fração peptídica (p. V) do veneno da <i>B. atrox</i> sobre o consumo de oxigênio no estado 4 da respiração mitocondrial	19
Figura 6. Efeito da fração peptídica (p. V) do veneno da <i>B. atrox</i> sobre a razão do controle respiratório (RCR)	19
Figura 7. Efeito da fração peptídica (p. V) do veneno da <i>B. atrox</i> sobre a produção de H ₂ O ₂ (peróxido de hidrogênio)	21
Figura 8. Efeito da fração peptídica (p. V) do veneno da <i>B. atrox</i> sobre a produção de H ₂ O ₂ (peróxido de hidrogênio)	21
Figura 9. Efeito da fração peptídica (p. V) do veneno da <i>B. pirajai</i> sobre a indução do intumescimento osmótico mitocondrial	22
Figura 10. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da <i>B. pirajai</i> sobre o potencial de membrana mitocondrial	23
Figura 11. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da <i>B. pirajai</i> sobre o consumo de oxigênio no estado 3 da respiração mitocondrial	24
Figura 12. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da <i>B. pirajai</i> sobre o consumo de oxigênio no estado 4 da respiração mitocondrial	24
Figura 13. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da <i>B. pirajai</i> sobre a razão do controle respiratório (RCR)	25

Figura 14. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da <i>B. pirajai</i> sobre a razão do consumo de ADP pelo consumo de O ₂ (ADP/O)	25
Figura 15. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da <i>B. pirajai</i> sobre a produção de H ₂ O ₂ (peróxido de hidrogênio)	27
Figura 16. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da <i>B. pirajai</i> sobre a produção de H ₂ O ₂ (peróxido de hidrogênio)	27
Figura 17. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da <i>B. pirajai</i> sobre a produção de H ₂ O ₂ (peróxido de hidrogênio)	28
Figura 18. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da <i>B. jararaca</i> sobre a indução do intumescimento osmótico mitocondrial	29
Figura 19. Inibição do intumescimento osmótico mitocondrial pela fração peptídica (p. V) do veneno da <i>B. jararaca</i>	29
Figura 20. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da <i>B. jararaca</i> sobre o potencial de membrana mitocondrial	30
Figura 21. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da <i>B. jararaca</i> sobre o consumo de oxigênio no estado 3 da respiração mitocondrial	31
Figura 22. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da <i>B. jararaca</i> sobre o consumo de oxigênio no estado 4 da respiração mitocondrial	32
Figura 23. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da <i>B. jararaca</i> sobre a razão do controle respiratório (RCR)	32
Figura 24. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da <i>B. jararaca</i> sobre a razão do consumo de ADP pelo consumo de O ₂ (ADP/O)	33
Figura 25. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da <i>B. jararaca</i> sobre a produção de H ₂ O ₂ (peróxido de hidrogênio)	34
Figura 26. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da <i>B. jararaca</i> sobre a produção de H ₂ O ₂ (peróxido de hidrogênio)	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações (5,0; 10,0 e 20,0 µg/mL) da fração peptídica (p. V) do veneno de <i>Bothrops atrox</i> sobre a respiração mitocondrial de cérebro de rato	20
Tabela 2. Efeito de diferentes concentrações (5,0; 10,0 e 20,0 µg/mL) da fração peptídica (p. V) do veneno de <i>Bothrops pirajai</i> sobre a respiração mitocondrial de cérebro de rato	26
Tabela 3. Efeito de diferentes concentrações (5,0; 10,0; 20,0 e 50,0 µg/mL) da fração peptídica (p. V) do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> sobre a respiração mitocondrial de cérebro de rato	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A β – beta-amilóide
- ADP – adenosina difosfato
- ANT - transportador de nucleotídeo de adenosina
- APAF-1 – fator ativador de proteases pró-apoptóticas (apoptosis protease-activating factor-1)
- ATP - trifosfato de adenosina
- BSA – albumina bovina sérica
- CCCP - carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona
- CsA – ciclosporina A
- DA – doença de Alzheimer
- DCF-DA – diclorofluoresceína diacetato
- DH - doença de Huntington
- DN – doenças neurodegenerativas
- DNA – ácido desoxiribonucléico
- DNP – 2,4-dinitrofenol
- DP – doença de Parkinson
- DMSO – dimetilsulfóxido
- EAL – esclerose amiotrófica lateral
- EGTA – ácido etileno glicol-bis(P-aminoetil éter)-N, N, N', N'-tetracético
- ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
- HEPES – ácido N-(2-hydroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfônico
- H (solução H) – solução de homogeneização
- H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
- H₃PO₄ – ácido orto-fosfórico
- KCl – cloreto de potássio
- KH₂PO₄ – Fosfato de potássio monobásico
- MgCl₂ – cloreto de magnésio
- m.m.i – membrana mitocondrial interna
- MnSOD – superóxido dismutase manganês-dependente
- MPP⁺ - 1-metil-4-fenilpiridinium

NaOH – hidróxido de sódio
NMDA - N-metil-D-aspartato
NOS - óxido nítrico sintase
 $O_2^{\bullet -}$ - ânion radical superóxido
 OH^{\bullet} - radical hidroxila
P.A. – para análise
Pi – fosfato inorgânico
PTPMM – poro de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial
RCR – razão de controle respiratório
rpm – rotações por minuto
Rot – rotenona
SEC - Size-exclusion chromatography
SMAC - segundo ativador mitocondrial de caspases
SNC – sistema nervoso central
SOD – superóxido dismutase
Suc – succinato
t-bth – *tert*-butilhidroperóxido
TBA – ácido tiobarbitúrico
TNA – transportador de nucleotídeo de adenosina
TNFRI – receptor I para o fator de necrose tumoral
TPMM – transição da permeabilidade da membrana mitocondrial

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Doenças Neurodegenerativas.....	2
1.2. Mitocôndria e excitotoxicidade.....	3
1.3. Mitocôndrias, Estresse Oxidativo e Doenças Neurodegenerativas.....	4
1.4. Mitocôndrias e Morte Celular por Apoptose.....	5
1.5. Mitocôndrias e Apoptose Neuronal.....	5
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1. Animais.....	10
3.2. Reagentes.....	10
3.3. Venenos de serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	10
3.4. Isolamento de mitocôndrias do córtex cerebral de rato.....	11
3.5. Determinação da Proteína Mitocondrial.....	12
3.6. Intumescimento osmótico mitocondrial (<i>swelling</i>).....	12
3.7. Potencial de Membrana Mitocondrial.....	12
3.8. Respiração mitocondrial.....	13
3.9. Produção de Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂).....	13
3.10. Análise Estatística.....	14
4. RESULTADOS	16
4.1. Efeitos da fração peptídica (p. V) do veneno de <i>B. atrox</i> sobre o Intumescimento Osmótico Mitocondrial.....	16
4.2. Efeitos da fração peptídica (p. V) do veneno da <i>B. atrox</i> sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial.....	17

4.3. Efeitos da fração peptídica (p. V) do veneno de <i>B. atrox</i> sobre a Respiração Mitochondrial.....	18
4.4. Efeitos da fração peptídica (p. V) do veneno da <i>B. atrox</i> sobre a Produção de Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) pelas mitocôndrias.....	20
4.5. Efeitos da fração peptídica (p. V) do veneno da <i>B. pirajai</i> no Intumescimento Osmótico Mitochondrial.....	22
4.6. Efeitos da fração (p. V) do veneno da <i>B. pirajai</i> no Potencial de Membrana	22
4.7. Efeitos da fração peptídica (p. V) do veneno da <i>B. pirajai</i> na Respiração Mitochondrial.....	23
4.8. Efeitos da fração peptídica (p. V) do veneno da <i>B. pirajai</i> sobre a produção mitocondrial de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	26
4.9. Efeitos da fração peptídica (p. V) do veneno da <i>B. jararaca</i> sobre o Intumescimento Osmótico Mitochondrial.....	28
4.10. Efeitos da fração peptídica (p.V) do veneno da <i>B. jararaca</i> sobre o Potencial de Membrana Mitochondrial.....	30
4.11. Efeitos da fração peptídica (p.V) do veneno da <i>B. jararaca</i> sobre a Respiração Mitochondrial.....	30
4.12. Efeitos da fração peptídica (p.V) do veneno da <i>B. jararaca</i> sobre a produção mitocondrial de Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	34
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÕES.....	40
7. REFERÊNCIAS.....	42

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças Neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas (DN) estão entre as principais causas de mortalidade e morbidade nos países ocidentais. Com o prolongamento da expectativa média de vida e o avanço da tecnologia médica, as patologias do cérebro estão ganhando cada vez mais importância e atualmente afetam cerca de 10% da população com mais de 65 anos. Estas doenças se caracterizam por uma diminuição no número de células de determinadas populações de neurônios: na doença de Alzheimer (DA), observa-se uma diminuição no número de neurônios colinérgicos, principalmente no hipocampo e na amígdala; na doença de Parkinson (DP) a perda se dá principalmente nos neurônios dopaminérgicos da substância negra e dos gânglios basais. A perda neuronal se reflete clinicamente pelo aparecimento de sintomatologia específica, como alteração dos processos envolvidos na memória e na fala (DA) e dificuldades na coordenação dos movimentos (DP) (Przedborski, Vila *et al.*, 2003). O cérebro é particularmente vulnerável ao dano oxidativo, devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos insaturados facilmente oxidáveis, alta taxa de consumo de oxigênio, e à relativa escassez de enzimas antioxidantes em comparação com outros órgãos (Nunomura, Honda *et al.*, 2006; Petrozzi, Ricci *et al.*, 2007). Achados relacionados a várias doenças neurodegenerativas sugerem a existência de características comuns de toxicidade, incluindo a ocorrência do estresse oxidativo associado à disfunção mitocondrial e à morte celular por apoptose (Andersen, 2004; Bossy-Wetzel, Schwarzenbacher *et al.*, 2004; Calabrese, Lodi *et al.*, 2005; Zhao, 2005; Petrozzi, Ricci *et al.*, 2007).

O metabolismo energético fosforilativo desempenha um papel importante na indução da morte celular presente nas desordens neurodegenerativas e a melhoria da função mitocondrial tem sido proposta como potencial estratégia terapêutica por vários autores. Assim, a mitocôndria se apresenta como um importante alvo para futuras estratégias de neuroproteção com finalidade de tratamento, prevenção ou retardamento da neurodegeneração (Lin e Beal, 2006; Paliwal, Rai *et al.*, 2007; Swerdlow, 2007).

1.2. Mitocôndria e excitotoxicidade

Para manterem as suas funções, as células devem continuamente produzir energia na forma de ATP (trifosfato de adenosina), o qual é utilizado na síntese de hormônios, enzimas e neurotransmissores (dopamina, noradrenalina, serotonina e acetilcolina). As duas vias principais de geração de ATP são a glicólise anaeróbia, no citoplasma, e a fosforilação oxidativa, na mitocôndria; sendo esta última 17 vezes mais eficaz. As mitocôndrias são as organelas que produzem a maior parte do ATP necessário para a função normal e a sobrevivência dos neurônios (Trushina e McMurray, 2007).

Comumente se encontra na DP uma redução de 35% do complexo I da cadeia respiratória nos neurônios dopaminérgicos da substância negra. É interessante notar que apenas 5% dos neurônios dessa região são dopaminérgicos e que eles são altamente dependentes do metabolismo aeróbio, o que faz com que essas células sejam vulneráveis à disfunção mitocondrial. O impedimento da fosforilação oxidativa e a geração de radicais livres podem afetar o potencial transmembrana mitocondrial. A queda do potencial de membrana mitocondrial é um evento precoce no processo de morte celular programada (apoptose) (Muqit, Gandhi *et al.*, 2006; Michel, Alvarez-Fischer *et al.*, 2007).

A inibição da fosforilação oxidativa pode levar à parcial despolarização da membrana celular, permitindo o influxo de sódio e cálcio, o que ativaria mais facilmente o receptor ionotrópico ativado pelo ácido glutâmico, NMDA (N-metil-D-aspartato), que é voltagem-dependente. Este fato pode ser atribuído principalmente à falência das bombas iônicas ligadas à membrana (Endres e Dirnagl, 2002). A despolarização celular conduz à liberação do glutamato na fenda sináptica, através da excitocitose mediada pelo cálcio. O excesso de glutamato extracelular se liga aos receptores das células adjacentes. Os receptores do glutamato, que podem ser ionotrópicos ou metabotrópicos, são ativados, atuando respectivamente através de canais iônicos ou proteína-G acoplada a um sistema de segundos mensageiros. A subsequente ativação neuronal permite o excesso de entrada de cálcio. A elevada concentração intracelular de cálcio atua como mediador de sistemas de segundo mensageiro, os quais levam à ativação de enzimas proteolíticas, xantinas oxidases, fosfolipases e óxido nítrico sintase (NOS); geram radicais livres; acarretam comprometimento energético; iniciam o processo de apoptose e provocam liberação

adicional de glutamato. Assim, a inibição dos receptores do glutamato ou dos canais de sódio e cálcio pode interromper a continuidade deste ciclo excitotóxico (Endres e Dirnagl, 2002; Bosel, Gandor *et al.*, 2005).

Estudos recentes em animais mostraram que toxinas mitocondriais provocam um padrão de degeneração neuronal semelhante ao encontrado na Doença de Huntington (DH), e que essa degeneração é bloqueada por antagonistas do NMDA. Os antagonistas do NMDA também bloqueiam a degeneração neuronal induzida pela neurotoxina 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP⁺), usada em modelos experimentais de DP (Greenamyre, Mackenzie *et al.*, 1999; Oliveira, Jekabsons *et al.*, 2007).

1.3. Mitocôndrias, Estresse Oxidativo e Doenças Neurodegenerativas

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são comumente geradas na respiração mitocondrial, durante a redução do oxigênio molecular à água, e o acúmulo de ERO, designado estresse oxidativo, causa danos a ácidos nucléicos, lipídeos, carboidratos e proteínas (Halliwell e Gutteridge, 2003; Trushina e McMurray, 2007).

O estresse oxidativo promove a degeneração celular em consequência dos efeitos citotóxicos das ERO, tais como radical hidroxila (OH[•]), ânion superóxido (O₂^{•-}) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Gutteridge, 1994; Halliwell e Gutteridge, 2003; Barbosa, Medeiros *et al.*, 2006). Devido aos seus efeitos potencialmente lesivos, e sendo os neurônios particularmente susceptíveis ao ataque por espécies radiculares, as ERO e os processos oxidativos em que essas estão envolvidas têm sido associados a várias lesões neuronais, observadas, por exemplo, na isquemia cerebral, na esclerose lateral amiotrófica e na doença de Parkinson (Clemens e Panetta, 1994; Ebadi, Srinivasan *et al.*, 1996; Robberecht e Van Den Bosch, 1998). Como a lesão oxidativa é provavelmente a principal causa da degeneração celular e o envelhecimento é o principal fator de risco da maioria dos casos de doença de Alzheimer (DA), estudos têm sugerido que o estresse oxidativo também desempenhe um papel importante na patogenia e na progressão desta doença (Kontush e Schekatolina, 2004; Zecca, Youdim *et al.*, 2004; Balaban, Nemoto *et al.*, 2005; Moreira, Smith *et al.*, 2005). Vários estudos forneceram evidências de que o acúmulo extracelular anormal da proteína beta amiloide (A β) constitui uma das principais características neuropatológicas da DA (Selkoe, 1993), e que esta

proteína pode induzir estresse oxidativo e peroxidação lipídica associados ao acúmulo de H_2O_2 (Behl, Davis *et al.*, 1994).

1.4. Mitocôndrias e Morte Celular por Apoptose

A apoptose desempenha importante papel na homeostase dos diferentes tecidos e o descontrole deste processo está associado a várias doenças, incluindo neoplasias, doenças auto-imunes e neurodegenerativas. O processo apoptótico pode ser disparado por uma variedade de estímulos que promovem a ativação de proteases, denominadas caspases. Em células de mamíferos, a apoptose ocorre preferencialmente por duas vias: extrínseca e intrínseca ou mitocondrial. A via extrínseca é iniciada pela ativação dos receptores de morte, tais como Fas, TNFR1, DR3, DR4, DR5 e DR6 (Shi, 2002; Yan e Shi, 2005). A via intrínseca é iniciada pela ação de diferentes sinais de estresse intracelular (irradiações, agentes quimioterápicos, vírus, bactérias e ausência de fatores de crescimento celular), todos eles tendo a mitocôndria como ponto de convergência. A ativação da via mitocondrial promove a liberação de citocromo c e SMAC (segundo ativador mitocondrial de caspases) para o citosol, resultando na ativação de APAF-1 que, na presença de ATP, induz a formação do complexo multimérico chamado “apoptosomo” (Shi, 2002; Yan e Shi, 2005). A regulação da via mitocondrial é realizada pelos membros da família Bcl-2, proteínas citoplasmáticas capazes de integrar sinais de sobrevivência ou morte celular gerados nos meios intra e extracelular. Esta família se subdivide em duas classes: proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 e A1), que protegem a célula da morte, e pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bid, BIM, Bok, Bik, etc), que sensibilizam ou conduzem a célula à apoptose (Danial e Korsmeyer, 2004).

1.5. Mitocôndrias e Apoptose Neuronal

As células do sistema nervoso diferem em muitos aspectos daquelas dos tecidos proliferativos, principalmente devido ao fato de que os neurônios devem sobreviver durante toda a vida do organismo para que a função do circuito neuronal seja mantida. Muitos neurônios sofrem apoptose durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) (Buss e Oppenheim, 2004). Uma produção inicial em

excesso, seguida da morte de alguns neurônios, é parte de um processo adaptativo que resulta em um número ótimo de neurônios, suficiente para formar os circuitos entre as células nervosas, de forma precisa com suas especificações funcionais (Mattson, 2006).

Em condições normais, muitos neurônios permanecem viáveis e mantêm suas funções por toda a vida do indivíduo. No entanto, muitas pessoas não completam sua vida sem que ocorra a morte de um número excessivo de uma ou mais populações de neurônios. Desta forma, a morte dos neurônios corticais e do hipocampo resulta em sintomas da doença de Alzheimer (DA); a morte dos neurônios dopaminérgicos do cérebro intermediário é responsável pela doença de Parkinson (DP); a doença de Huntington (DH) resulta da morte de neurônios do estriato, região que controla os movimentos corporais; e a morte de neurônios motores da medula espinhal é encontrada em pacientes com esclerose amiotrófica lateral (EAL) (Mattson, 2000).

Os fatores genéticos e ambientais que causam a apoptose dos neurônios diferem em condições fisiológicas e em condições patológicas, mas apesar disso, muitos dos eventos bioquímicos que executam o processo de morte celular são comuns em ambas as situações. Um ponto chave deste processo é a mitocôndria (Kroemer, 1998; Vercesi, Kowaltowski *et al.*, 2006). As alterações que ocorrem na mitocôndria da célula em apoptose, incluem aumento da produção de radicais livres, abertura de poros na membrana mitocondrial e liberação de citocromo c. Estas alterações mitocondriais são eventos centrais no processo de morte celular, uma vez que, agentes como a superóxido dismutase manganês-dependente (MnSOD) e a ciclosporina A (CsA), conhecidas por sua ação direta na mitocôndria suprimindo o estresse oxidativo e a formação do poro de membrana, também previnem a morte neuronal em vários modelos experimentais (Keller, Guo *et al.*, 1998; Fatokun, Stone *et al.*, 2007).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Avaliar o potencial neurotóxico e/ou neuroprotetor de frações peptídicas provenientes do veneno de algumas espécies de serpentes do gênero *Bothrops* por meio da investigação dos efeitos destes peptídeos em mitocôndrias de cérebro de rato, a fim de:

(i) delinear os mecanismos de toxicidade mitocondrial possivelmente envolvidos na morte neuronal das doenças neurodegenerativas,

(ii) identificar possíveis compostos capazes de proteger contra a toxicidade mitocondrial e com potencial para gerar novas estratégias de tratamento das doenças neurodegenerativas.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (200-220g). Os procedimentos experimentais do presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP (processo n° 08.1.1124.53.5).

3.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram do mais elevado grau de pureza disponível comercialmente. Para o preparo das soluções foi utilizada água do Tipo I (ultra pura) obtida em sistema de purificação RiOs-DI 3 (Millipore, Bedford, USA), seguido de purificação em sistema Milli-Q Gradient (Millipore, Bedford, USA).

3.3. Venenos de serpentes do gênero *Bothrops*

Os peptídeos das serpentes *B. atrox* (p. V), *B. pirajai* (p. V) e *B. jararaca* (p. V) utilizados nesse estudo foram fornecidos pelo Laboratório de Toxinologia da FCFRP-USP de responsabilidade da Prof^ª. Dra. Suely Vilela Sampaio. A denominação utilizada para as frações peptídicas (p. V) se refere à ordem de eluição das mesmas (picos I, II, III, IV e V) após separação por cromatografia de exclusão molecular (size-exclusion chromatography, SEC), na qual as últimas frações a serem eluídas correspondem àquelas de menor peso molecular (3,5 to 6,5 kDa).

Foram avaliados, *in vitro*, os efeitos de diferentes concentrações destas frações na função mitocondrial do cérebro de rato, através da avaliação dos seguintes parâmetros: intumescimento osmótico mitocondrial, potencial de membrana mitocondrial, consumo de oxigênio e produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

3.4. Isolamento de mitocôndrias do córtex cerebral de rato

O isolamento das mitocôndrias foi realizado por procedimento de centrifugação diferencial por gradiente de densidade com Percoll (Anderson e Sims, 2000), com algumas modificações. Os animais (2 por experimento) foram mortos por decapitação. Os cérebros foram removidos, imersos em solução de homogeneização (H) contendo sacarose 300 mM, HEPES 5 mM, EGTA 200 μ M, pH 7,2; os córtices foram separados e cortados em pequenos fragmentos e em seguida homogeneizados em Potter (4 ciclos, 700 rpm). O homogenato foi então centrifugado a 3000 rpm (760 g), durante 10 min. O sobrenadante obtido foi centrifugado a 13500 rpm (15893 g) por 20 min. As centrifugações foram realizadas a 4°C em centrífuga Hitachi himac CF15D2, operando com rotor RT 15A5. Neste intervalo de tempo, o gradiente Percoll foi montado, da maior para a menor concentração (23, 15, 10 e 3%) em um tubo de centrífuga transparente, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, gotejando-se lentamente pela parede do tubo e tomando-se o cuidado de manter sempre em uma cuba com gelo. O precipitado obtido na última centrifugação foi retomado em 2 mL de solução H e gotejado sobre o gradiente Percoll e então centrifugado a 22716 rpm (45000 g) por 5 min. A interface abaixo de 23% foi coletada cuidadosamente, com uma pipeta Pasteur e transferida para outro tubo e retomada em 4 mL da solução de Percoll 15% e centrifugado a 21736 rpm (41200 g). Estas duas últimas centrifugações foram realizadas em centrífuga BECKMAN COULTER™, Allegra™ 64R, operando com rotor F0630. O precipitado foi retomado em cerca de 5 mL de solução de isolamento contendo 50 μ L de uma solução digitonina 100mg/mL e em seguida centrifugado a 13500 rpm (15893 g). O precipitado obtido foi retomado com 2 mL da solução de isolamento, centrifugado a 9000 rpm (7064 g) e o precipitado retomado com 1 mL da solução de isolamento contendo manitol 210 mM, sacarose 70 mM, EGTA 1 mM, BSA 1 mg/mL e HEPES 5 mM, pH 7,4 (Sims e Anderson, 2008). Em seguida, a fração mitocondrial foi submetida à determinação de proteína, pelo método do Biureto, descrito a seguir (Cain e Skilleter, 1987). Todos os estudos com mitocôndrias foram realizados em um período máximo de 5 horas após o isolamento.

3.5. Determinação da Proteína Mitocondrial

Foi empregado método previamente descrito (Cain e Skilleter, 1987), no qual o sulfato de cobre é adicionado a uma solução protéica, em um meio fortemente alcalino produzindo uma coloração violeta, resultante do complexo formado entre os íons cúpricos e as ligações peptídicas das proteínas. Solução de ácido cólico a 5% em NaOH 5M (100 μ L) foi utilizada para solubilizar as proteínas da suspensão mitocondrial (10 μ L). O reagente de biureto, composto de sulfato de cobre 0,15%, tartarato de sódio e potássio 0,6% e 30% v/v de solução de NaOH 10%, foi utilizado como reativo de cor (1,5 mL). O volume final foi completado para 3,0 mL com água. Uma solução (100 μ L) de albumina bovina sérica 10 mg/mL foi submetida ao mesmo procedimento e utilizada como padrão de referência. A cor foi monitorada em espectrofotômetro Femto 600 Plus operando a 540 nm.

3.6. Intumescimento osmótico mitocondrial (*swelling*)

A suspensão mitocondrial (1mg/mL) foi incubada na presença/ausência de diferentes concentrações das frações peptídicas, em um meio composto de: manitol 210 mM, sacarose 70 mM, HEPES 5 mM, pH 7,2, acrescido de succinato de potássio 7,5 μ M e rotenona 4 μ M, pH 7,2. O intumescimento osmótico mitocondrial foi estimado pela diminuição da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro Hitachi modelo U 3000, sob agitação constante e temperatura ambiente. Foi avaliada a capacidade das frações de veneno de induzir o intumescimento osmótico mitocondrial (na ausência de fosfato inorgânico 0,9 mM) ou inibir o intumescimento osmótico mitocondrial (na presença de fosfato inorgânico 0,9 mM) (Kobayashi, Kuroda *et al.*, 2003; Zhao, Zhao *et al.*, 2004).

3.7. Potencial de Membrana Mitocondrial

O potencial elétrico da membrana mitocondrial interna foi avaliado pelo monitoramento da captação da rodamina 123 de acordo com método previamente descrito (Emaus, Grunwald *et al.*, 1986). As mitocôndrias (1 mg/mL de proteína) foram avaliadas em temperatura ambiente, na presença/ausência de diferentes concentrações das frações peptídicas em meio constituído de manitol 300 mM,

KH_2PO_4 10 mM, KCl 10 mM, MgCl_2 5 mM, pH 7,2, acrescido de 5 μM de rotenona e 5 μM de rodamina 123. A formação do potencial de membrana foi induzida com 10 μM de succinato de potássio (100s). Transcorridos 400 segundos, a reação foi iniciada com 0,4 μmol de ADP. O desacoplador CCCP (carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona) (0,5 μM) foi utilizado (aos 500s) para despolarizar a membrana mitocondrial interna. A análise foi realizada em espectrofotômetro de fluorescência Hitachi modelo F-2500, operando em 505 nm (excitação) e 535 nm (emissão), com fenda 5,0 nm.

3.8. Respiração mitocondrial

O consumo de oxigênio foi monitorado a 30°C, em um monitor biológico de oxigênio equipado com um eletrodo polarográfico do tipo Clark e uma câmara com agitação magnética (YSI modelo 5300 A). As mitocôndrias (1 mg de proteína mitocondrial) foram energizadas com succinato de potássio 10 μM (+ rotenona 5 μM) em um meio de respiração contendo manitol 300 mM, KH_2PO_4 10 mM, KCl 10 mM, MgCl_2 5 mM, pH 7,2 e incubadas (volume final 1,6 mL) na presença/ausência de diferentes concentrações das frações peptídicas. Foi monitorado consumo de oxigênio no estado basal (estado 4, sem adição de ADP) e no estado 3, o qual foi ativado com 0,4 μmol de ADP (Santos, Uyemura *et al.*, 1997). A capacidade fosforilativa, representada pela Razão de Controle Respiratório (RCR) e pela razão ADP/O foi determinada a partir do traçado polarográfico, de acordo com método previamente descrito (Chance e Williams, 1956).

3.9. Produção de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

A suspensão mitocondrial (1,0 mg de proteína/mL) foi incubada a 30°C em meio de reação composto por manitol 300 mM, KH_2PO_4 10mM, MgCl_2 5 mM, pH 7,2. Em seguida, foram adicionadas rotenona 5 μM e DCF-DA (diclorofluoresceína diacetato) 1 μM . A incubação foi feita na presença/ausência das frações peptídicas (10,0 $\mu\text{g/mL}$). Após 100s de reação, succinato a 10 mM foi adicionado. Foi feito um controle positivo com um indutor de estresse oxidativo, terc-butilhidroperóxido (t-bth) 1 mM. A intensidade da fluorescência foi monitorada a 505/535 nm como comprimentos de excitação e emissão, respectivamente (Cathcart, Schwiers *et al.*,

1983). Os cálculos foram feitos da subtração da fluorescência final da inicial e demonstrados em porcentagem, comparando ou com o controle negativo (0%) ou controle positivo (100%).

3.10. Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas empregando-se teste t não paramétrico, Mann Whitney test (para comparação de 2 grupos), com a utilização do Programa “GraphPad Prism version 5.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA”. Adotou-se $p < 0,05$ como nível de significância.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos da fração peptídica (p. V) do veneno de *B. atrox* sobre o Intumescimento Osmótico Mitochondrial (Figs. 1 e 2)

As concentrações testadas (5,0; 10,0 e 20,0 $\mu\text{g/mL}$) não induziram o intumescimento osmótico das mitocôndrias isoladas de cérebro de rato (**Fig. 1**). Estes resultados foram comparados ao controle negativo (sem adição de fosfato inorgânico - Pi) e ao controle positivo (com adição de fosfato após 100s).

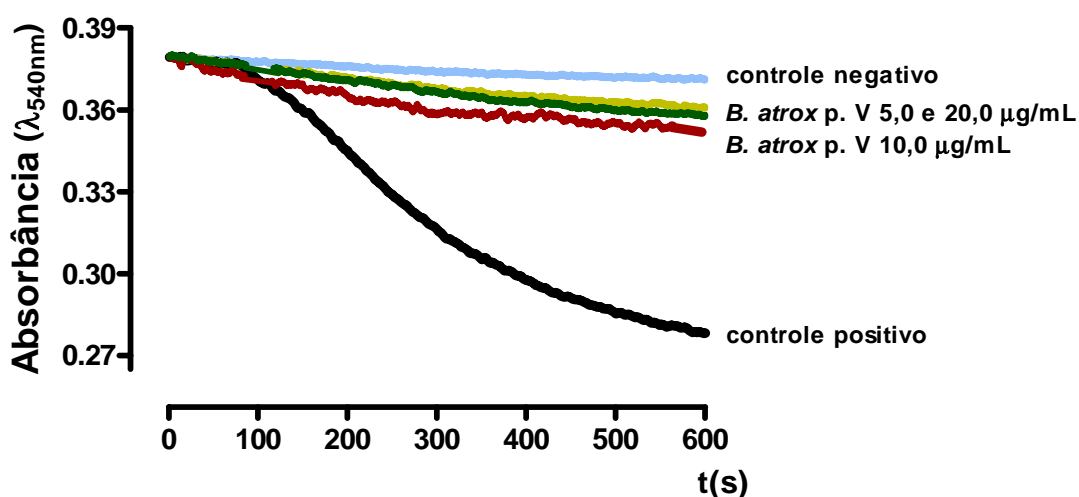


Figura 1. Efeito da fração peptídica (p. V) do veneno da *B. atrox* sobre a indução do intumescimento osmótico mitochondrial. As diferentes concentrações da fração peptídica foram adicionadas em substituição ao fosfato (Pi). Os traços são representativos de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

Por outro lado, a fração p. V do veneno da *B. atrox* foi capaz de inibir o intumescimento mitocondrial induzido por fosfato (Pi) (**Fig.2**). Essa capacidade de inibição foi bastante similar nas três concentrações testadas (5,0; 10,0 e 20,0 $\mu\text{g/mL}$), aproximando-se do controle negativo.

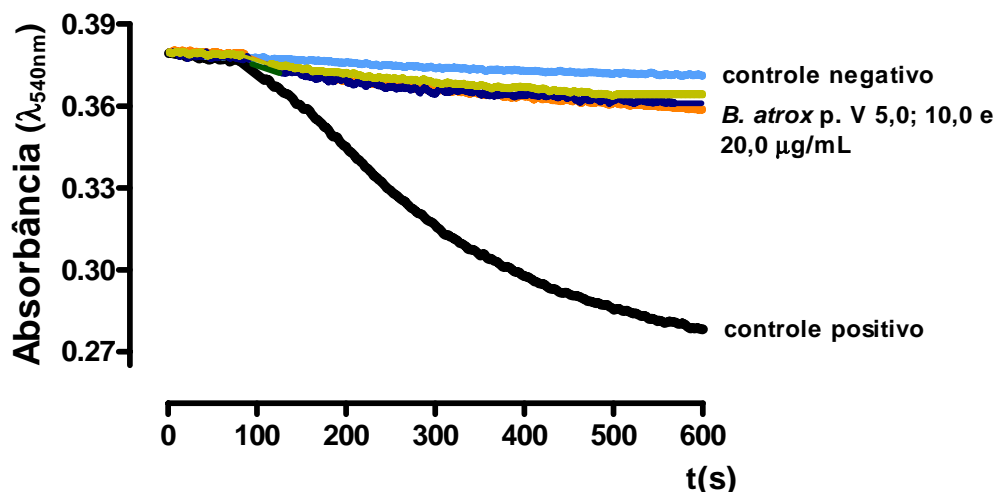


Figura 2. Inibição do intumescimento osmótico mitocondrial pela fração peptídica (p. V) do veneno da *B. atrox*. Os traços são representativos de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4.2. Efeitos da fração peptídica (p. V) do veneno da *B. atrox* sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial (Fig. 3)

O potencial de membrana mitocondrial não foi afetado por nenhuma das concentrações testadas. Os traçados representativos das concentrações 5,0; 10,0 e 20,0 µg/mL foram semelhantes entre si e semelhantes ao controle.

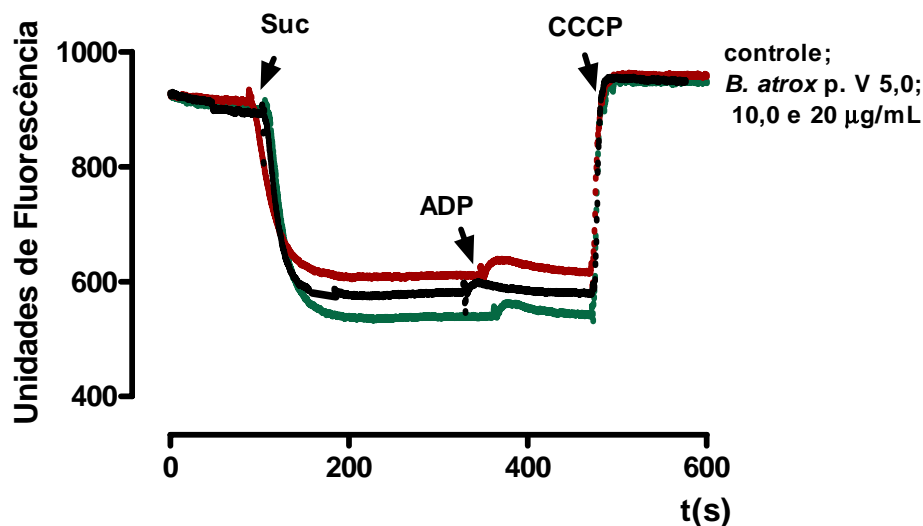


Figura 3. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. atrox* sobre o potencial de membrana mitocondrial. Suc, succinato; ADP, adenosina difosfato; CCCP, carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona. Os traços são representativos de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4.3. Efeitos da fração peptídica (p. V) do veneno de *B. atrox* sobre a Respiração Mitocondrial (Figs. 4, 5 e 6)

Nenhuma das concentrações testadas (5,0; 10,0 e 20,0 $\mu\text{g/mL}$) alterou significativamente ($p < 0,05$) o consumo de oxigênio no estado 3 (**Fig. 4**) e no estado 4 (**Fig. 5**); no entanto, a discreta redução do consumo de oxigênio no estado 3 e o discreto aumento do consumo de oxigênio mitocondrial no estado 4 induzidos pela maior concentração (20,0 $\mu\text{g/mL}$) contribuíram para uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da razão do controle respiratório mitocondrial (RCR) quando comparado ao controle (**Fig. 6**). As médias e os valores de desvio padrão dos parâmetros relacionados aos efeitos desta fração peptídica na respiração mitocondrial (consumo de oxigênio no estado 3; consumo de oxigênio no estado 4 e razão do controle respiratório) estão relacionados na Tabela 1.

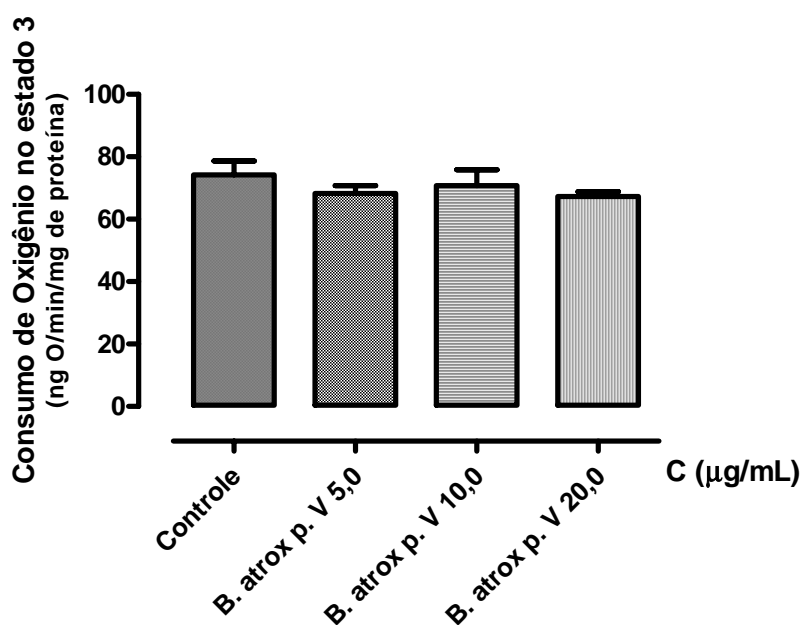


Figura 4. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. atrox* sobre o consumo de oxigênio no estado 3 da respiração mitocondrial. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. * $p < 0,05$. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

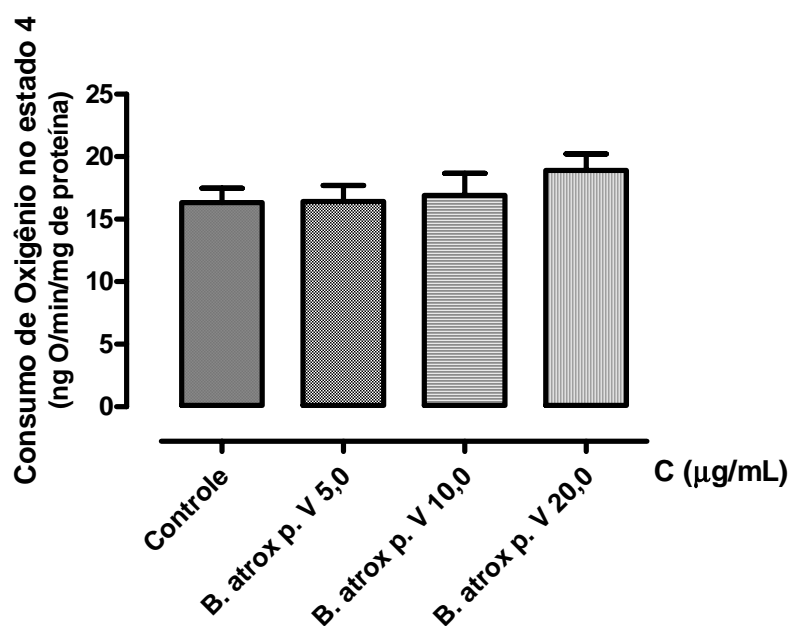


Figura 5. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. atrox* sobre o consumo de oxigênio no estado 4 da respiração mitocondrial. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. * $p < 0,05$. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

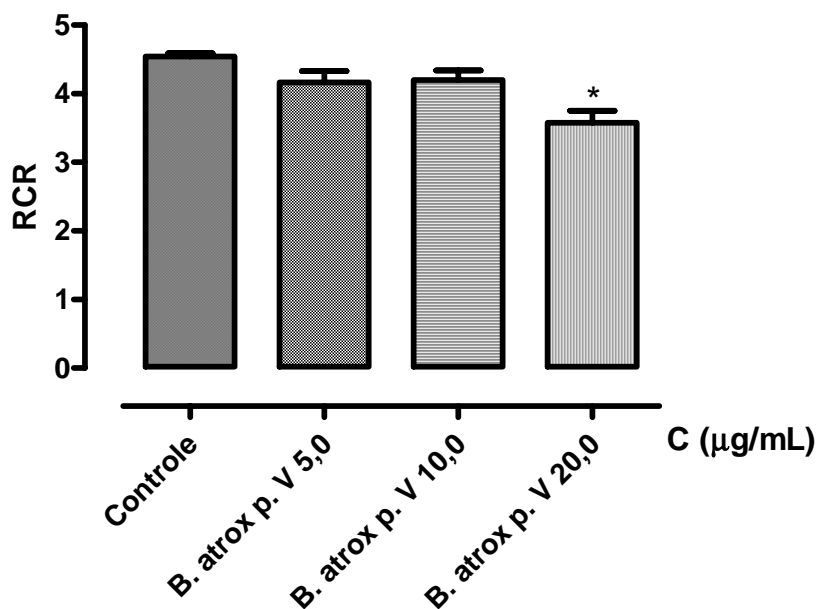


Figura 6. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. atrox* sobre a razão do controle respiratório (RCR). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. * $p < 0,05$. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

Tabela 1. Efeitos de diferentes concentrações (5,0; 10,0 e 20,0 µg/mL) da fração peptídica (p. V) do veneno de *Bothrops atrox* sobre a respiração mitocondrial de cérebro de rato

PARÂMETRO	Controle	5,0 µg/mL	10,0 µg/mL	20,0 µg/mL
Consumo de O₂ no estado 3				
(ng de O/min/mg de proteína)	74,18 ± 4,50	68,27 ± 2,54	70,79 ± 5,06	67,27 ± 1,54
Consumo de O₂ no estado 4				
(ng de O/min/mg de proteína)	16,33 ± 1,15	16,44 ± 1,27	16,91 ± 1,78	18,89 ± 1,34
RCR	4,54 ± 0,05	4,16 ± 0,17	4,20 ± 0,14	3,57 ± 0,18*

*significativo para $p < 0,05$; RCR, Razão de Controle Respiratório

4.4. Efeitos da fração peptídica (p. V) do veneno da *B. atrox* sobre a Produção de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) pelas mitocôndrias (Figs. 7 e 8)

A concentração testada (10,0 µg/mL) inibiu significativamente a produção mitocondrial de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) induzida pelo t-butilhidroperóxido, quando comparada aos controles positivo e negativo. Na Figura 7 são apresentados os traçados representativos do monitoramento da reação durante 600 segundos e na Figura 8 são apresentados os resultados relativos à leitura líquida entre 600 s e 0s, considerando-se a leitura do controle positivo como 100%.

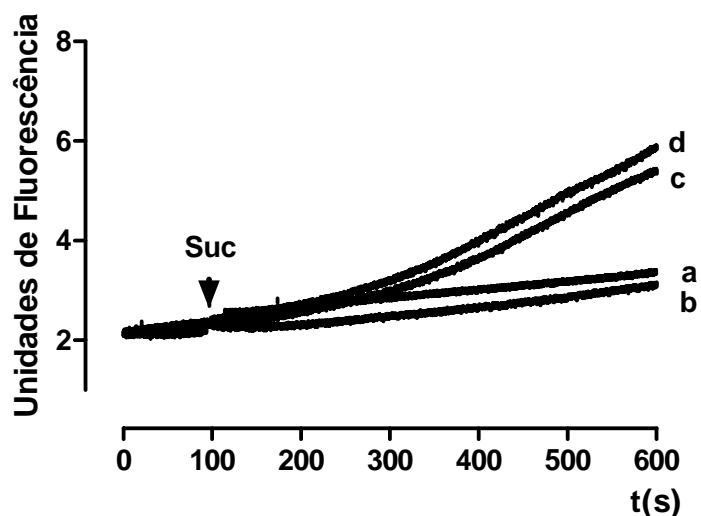


Figura 7. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. atrox* sobre a produção de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio). Suc. Succinato; a. controle negativo (sem t-bth); b. *B. atrox* p. V 10,0 $\mu g/mL$ (sem t-bth); c. *B. atrox* p. V 10,0 $\mu g/mL$ + t-bth; d. controle positivo (com t-bth). O traçado é representativo de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

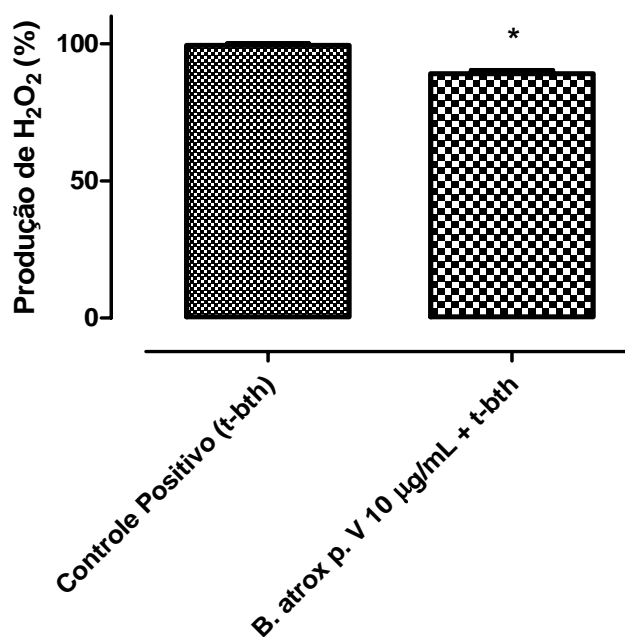


Figura 8. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. atrox* sobre a produção de H_2O_2 induzida por t-bth. t-bth, t-butil hidorperóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. * $p < 0,05$. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4.5. Efeitos da fração peptídica (p. V) do veneno da *B. pirajai* no Intumescimento Osmótico Mitochondrial (Fig. 9)

As concentrações 5,0, 10,0 e 20,0 $\mu\text{g/mL}$ da fração peptídica (p. V) do veneno da *B. pirajai* induziram significativamente o intumescimento das mitocôndrias isoladas de cérebro de rato. Nas concentrações menores (1,0 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$), embora haja uma tendência de indução, as alterações não foram significativas (Fig.9).

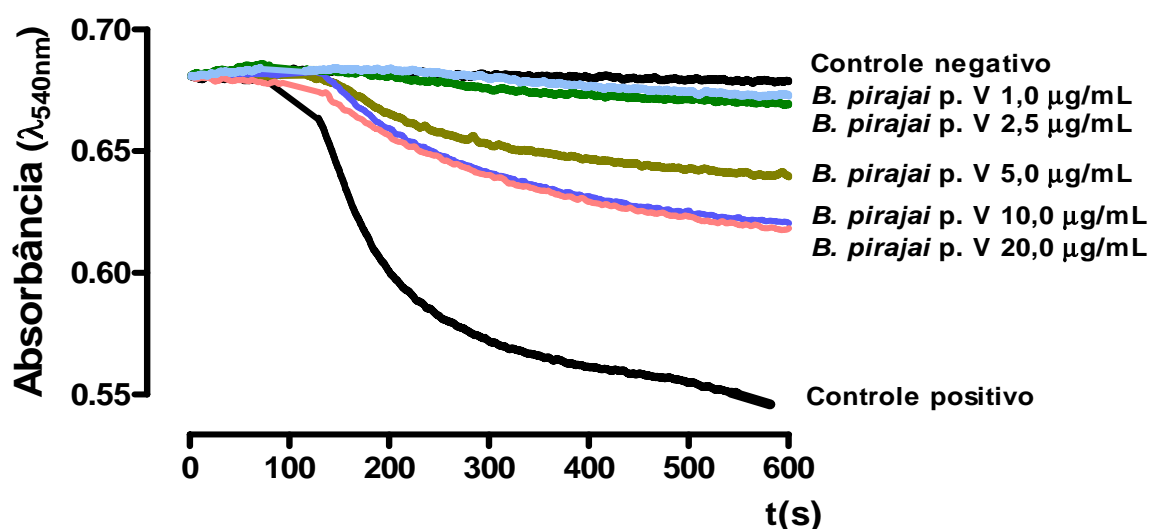


Figura 9. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. pirajai* no intumescimento osmótico mitocondrial comparado com controle positivo (com adição de fosfato após 100s) e com o controle negativo (sem Pi). As diferentes concentrações da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. pirajai* foram adicionadas em substituição ao Pi. Os traços são representativos de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4.6. Efeitos da fração (p. V) do veneno da *B. pirajai* no Potencial de Membrana (Fig. 10)

O potencial de membrana mitocondrial (Fig.10) não foi alterado por nenhuma das concentrações (5,0; 10,0 e 20,0 $\mu\text{g/mL}$) da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. pirajai*.

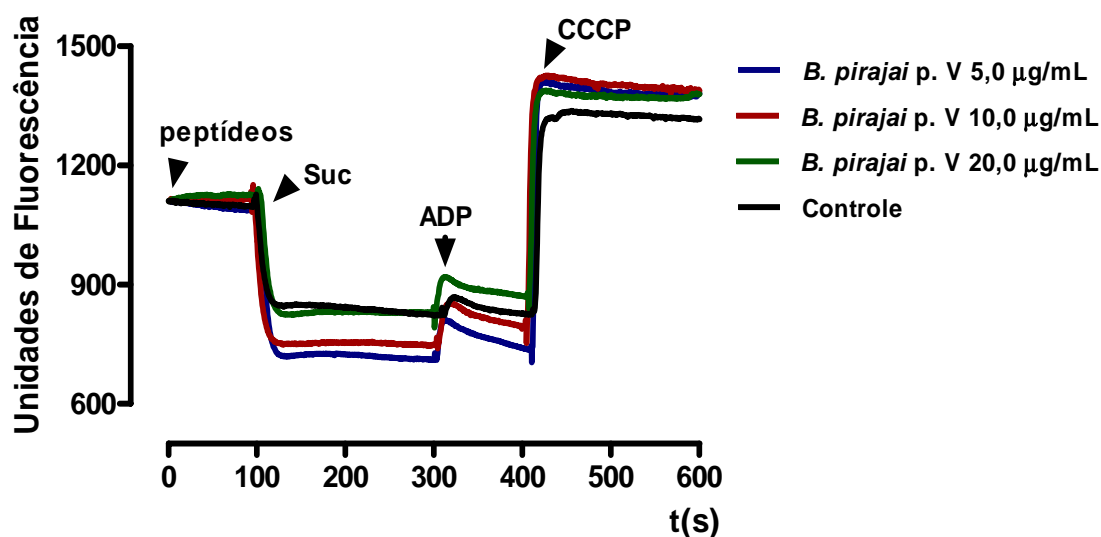


Figura 10. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. pirajai* sobre o potencial de membrana mitocondrial. Suc. succinato; ADP. adenosina difosfato; CCCP, carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona. O traçado é representativo de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4.7. Efeitos da fração peptídica (p. V) do veneno da *B. pirajai* na Respiração Mitocondrial (Figs. 11, 12, 13 e 14)

As concentrações 10,0 e 20,0 µg/mL não alteraram significativamente o consumo de oxigênio no estado 3 (Fig. 11). No estado 4 (Fig. 12) apenas a concentração de 20,0 µg/mL provocou alteração significativa no consumo de oxigênio. O aumento do consumo de oxigênio mitocondrial no estado 4, induzido pela maior concentração testada (20,0 µg/mL), provocou diminuição significativa na razão do controle respiratório mitocondrial (RCR) (Fig. 13). A razão ADP/O não foi alterada significativamente por nenhuma das concentrações testadas (Fig. 14). As médias e os valores de desvio padrão dos parâmetros relacionados aos efeitos da desta fração na respiração mitocondrial (consumo de oxigênio no estado 3; consumo de oxigênio no estado 4 e razão do controle respiratório) estão relacionados na Tabela 2.

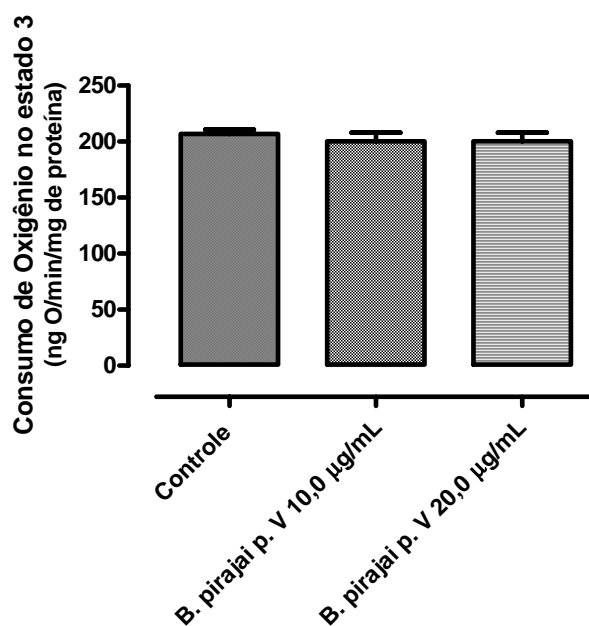


Figura 11. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. pirajai* sobre o consumo de oxigênio no estado 3 da respiração mitocondrial. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

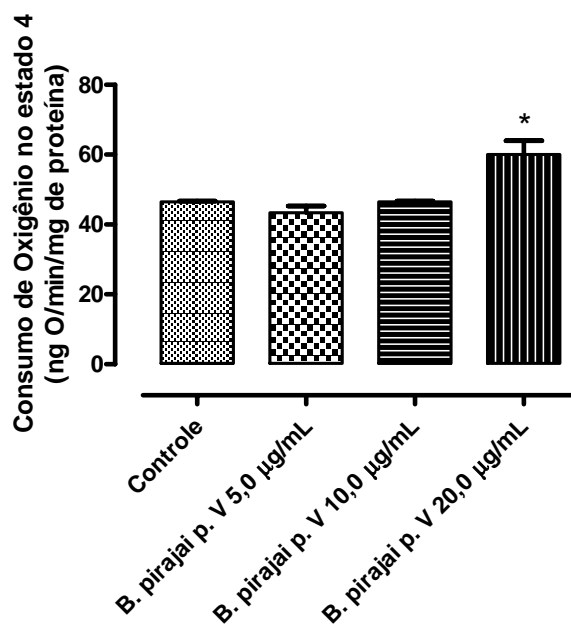


Figura 12. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. pirajai* sobre o consumo de oxigênio no estado 4 da respiração mitocondrial. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. * $p < 0,05$. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

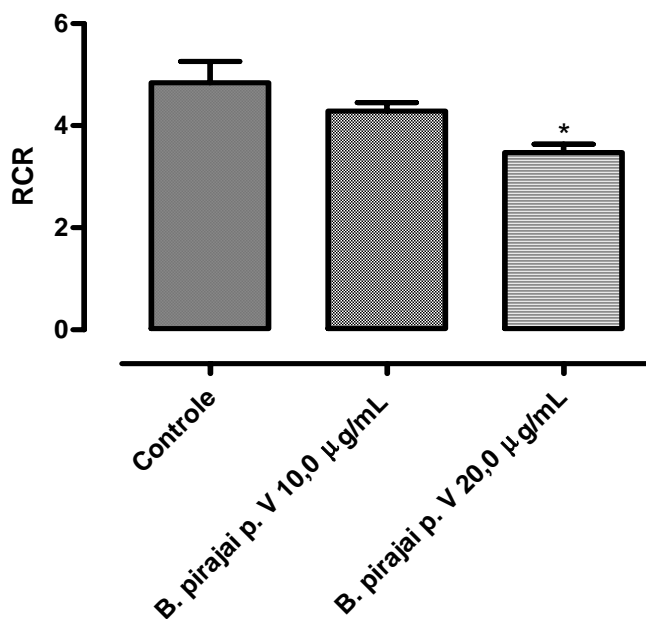


Figura 13. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. pirajai* sobre a razão do controle respiratório (RCR). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. * $p < 0,05$. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

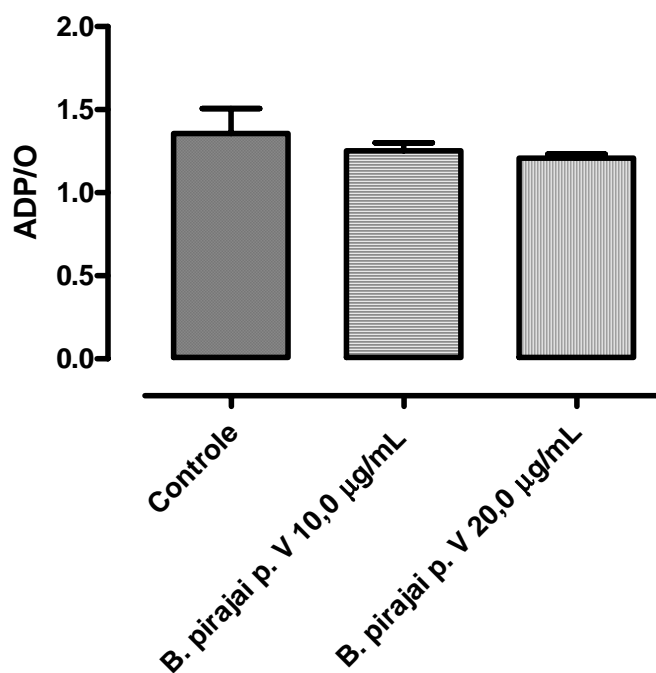


Figura 14. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. pirajai* sobre a razão do consumo de ADP pelo consumo de Oxigênio (ADP/O). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

Tabela 2. Efeitos de diferentes concentrações (5,0; 10,0 e 20,0 µg/mL) da fração peptídica (p. V) do veneno de *Bothrops pirajai* sobre a respiração mitocondrial de cérebro de rato

PARÂMETRO	Controle	5,0 µg/mL	10,0 µg/mL	20,0 µg/mL
Consumo de O₂ no estado 3				
(ng de O/min/mg de proteína)	206,92 ± 6,68	180,22 ± 6,68	200,25 ± 13,35	200,25 ± 13,35
Consumo de O₂ no estado 4				
(ng de O/min/mg de proteína)	46,65 ± 0,08	43,39 ± 3,34	46,65 ± 0,08	60,07 ± 6,68*
RCR	4,84 ± 0,82	4,16 ± 0,17	4,28 ± 0,29	3,47 ± 0,28*
ADP/O	1,35 ± 0,30	1,39 ± 0,05	1,25 ± 0,09	1,20 ± 0,04

* significativo para $p < 0,05$; RCR, Razão de Controle Respiratório

4.8. Efeitos da fração peptídica (p. V) do veneno da *B. pirajai* sobre a produção mitocondrial de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Figs. 15, 16 e 17)

A concentração testada (10,0 µg/mL) induziu discretamente a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) quando comparado ao controle negativo. Na Figura 15 são apresentados os traçados relativos ao monitoramento da reação por 600 segundos; nas Figuras 16 e 17 são apresentados os valores relativos à leitura líquida entre 600s e 0s, convertidos em porcentagem, considerando-se 100% a leitura do controle positivo e 0% a leitura do controle negativo.

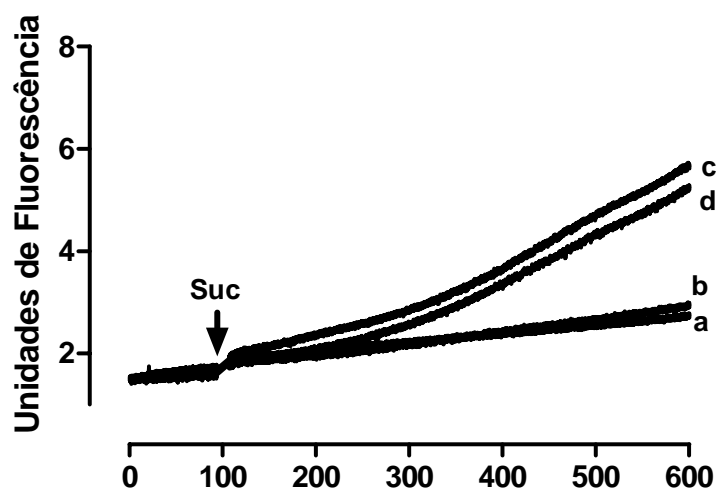


Figura 15. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. pirajai* sobre a produção de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio). Suc. Succinato; a. controle negativo (sem t-bth); b. *B. pirajai* p. V 10,0 $\mu\text{g/mL}$ (sem t-bth); c. *B. pirajai* p. V 10,0 $\mu\text{g/mL}$ + t-bth; d. controle positivo (com t-bth). O traçado é representativo de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

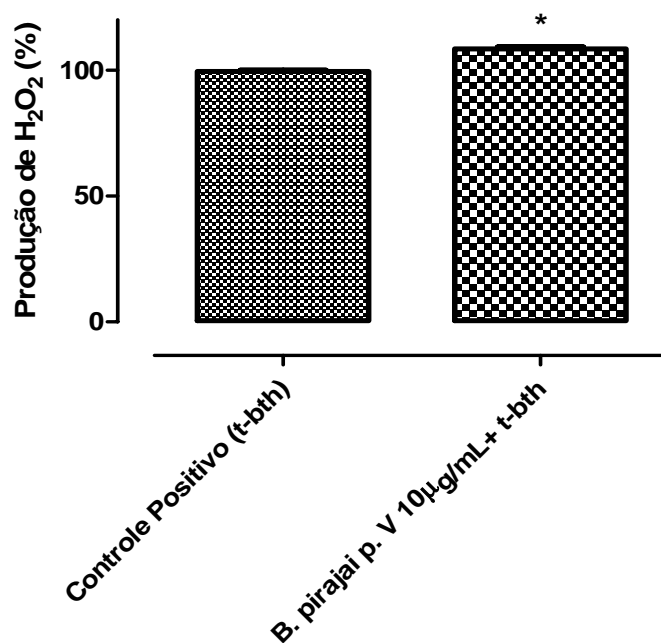


Figura 16. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. pirajai* sobre a produção de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. * $p < 0,05$. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

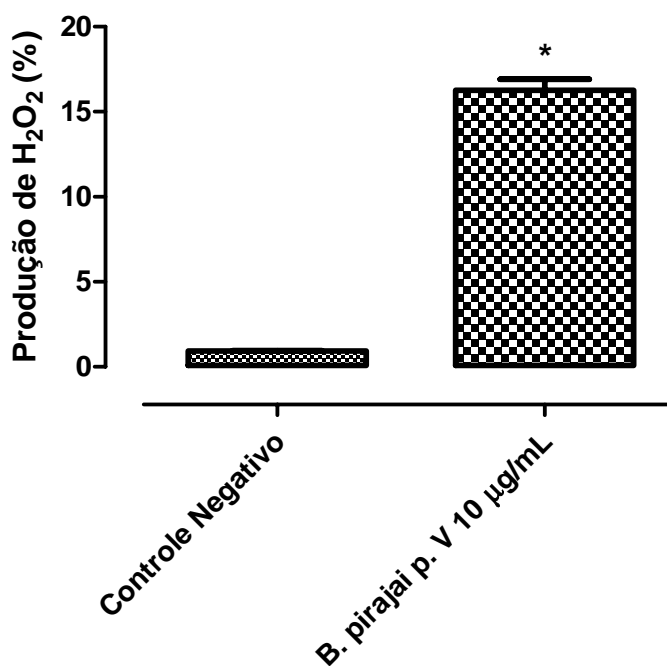


Figura 17. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. pirajai* na produção de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. * $p < 0,05$. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4.9. Efeitos da fração peptídica (p. V) do veneno da *B. jararaca* sobre o Intumescimento Osmótico Mitocondrial (Figs. 18 e 19)

Esta fração não induziu significativamente o intumescimento das mitocôndrias isoladas de cérebro de rato em nenhuma das concentrações testadas (5,0; 20,0 e 50,0 µg/mL) (**Fig.18**). Além disso, esta fração foi capaz de inibir o intumescimento osmótico mitocondrial induzido por fosfato (Pi) em todas as concentrações testadas (**Fig. 19**).

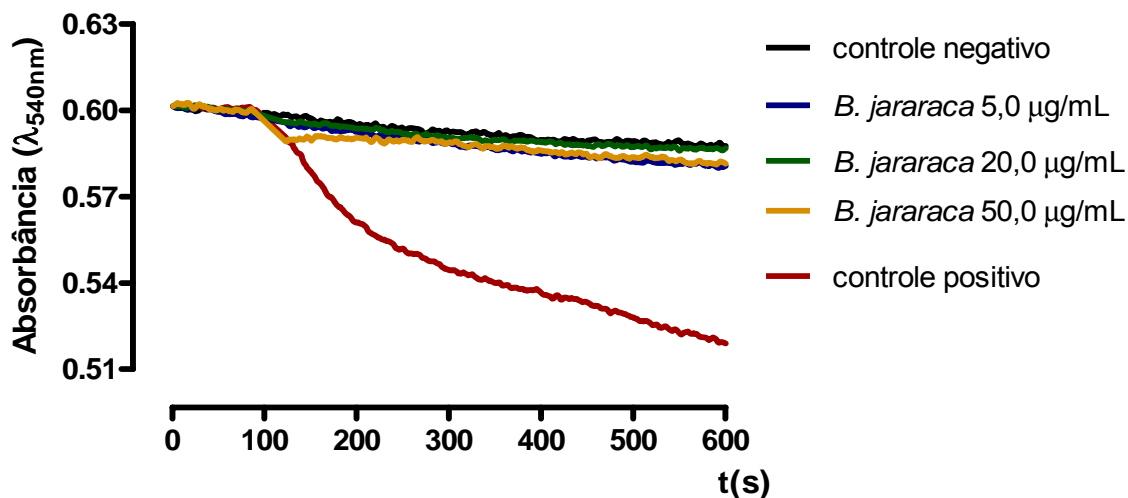


Figura 18. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. jararaca* sobre o intumescimento osmótico mitocondrial comparado com controle positivo (com adição de fosfato após 100s) e com o controle negativo (sem Pi). As diferentes concentrações da fração peptídica foram adicionadas em substituição ao fosfato (Pi). Os traços são representativos de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

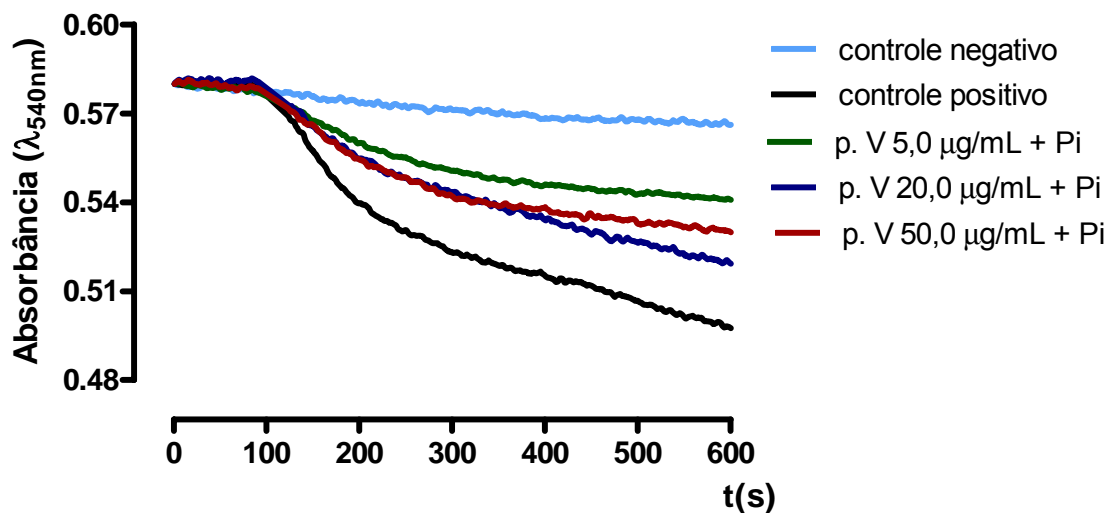


Figura 19. Inibição do intumescimento osmótico mitocondrial pela fração peptídica (p. V) do veneno da *B. jararaca* comparado com controle positivo (com adição de fosfato após 100s) e com controle negativo (sem Pi).

4.10. Efeitos da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. jararaca* sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial

As concentrações menores (5,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$) desta fração inibiram discretamente o potencial de membrana mitocondrial, enquanto que nas concentrações maiores (20,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$) a maior turbidez do meio provavelmente interferiu na leitura da fluorescência, diminuindo-a.

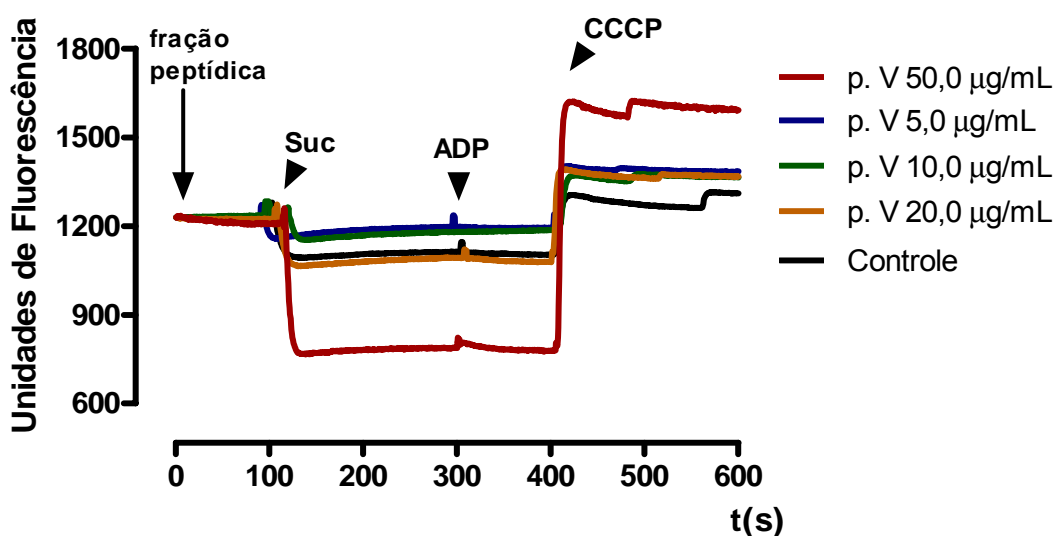


Figura 20. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. jararaca* sobre o potencial de membrana mitocondrial. Suc. succinato; ADP. adenosina difosfato; CCCP, carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona. O traçado é representativo de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4.11. Efeitos da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. jararaca* sobre a Respiração Mitocondrial (Figs. 21, 22, 23 e 24)

As concentrações de 20,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$ da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. jararaca* alteraram, significativamente ($p < 0,05$), o consumo de oxigênio no estado 3 (**Fig. 21**), porém as concentrações 5,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$ não tiveram nenhum efeito significativo. No estado 4 (**Fig. 22**) nenhuma das concentrações (5,0, 10,0, 20,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$) apresentou alteração estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Em função do aumento do consumo de oxigênio no estado 3 causado pelas

concentrações de 20,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$, a razão do controle respiratório mitocondrial (RCR) apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) nestas concentrações; as demais concentrações (5,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$) não apresentaram variação significativa ($p < 0,05$) (**Fig. 23**). A razão do consumo de ADP pelo consumo de oxigênio (ADP/O) apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, também somente nas concentrações 20,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$ (**Fig. 24**). As médias e os valores de desvio padrão dos parâmetros relacionados aos efeitos da toxina da *B. jararaca* na respiração mitocondrial (consumo de oxigênio no estado 3; consumo de oxigênio no estado 4 e razão do controle respiratório) estão descritos na Tabela 3.

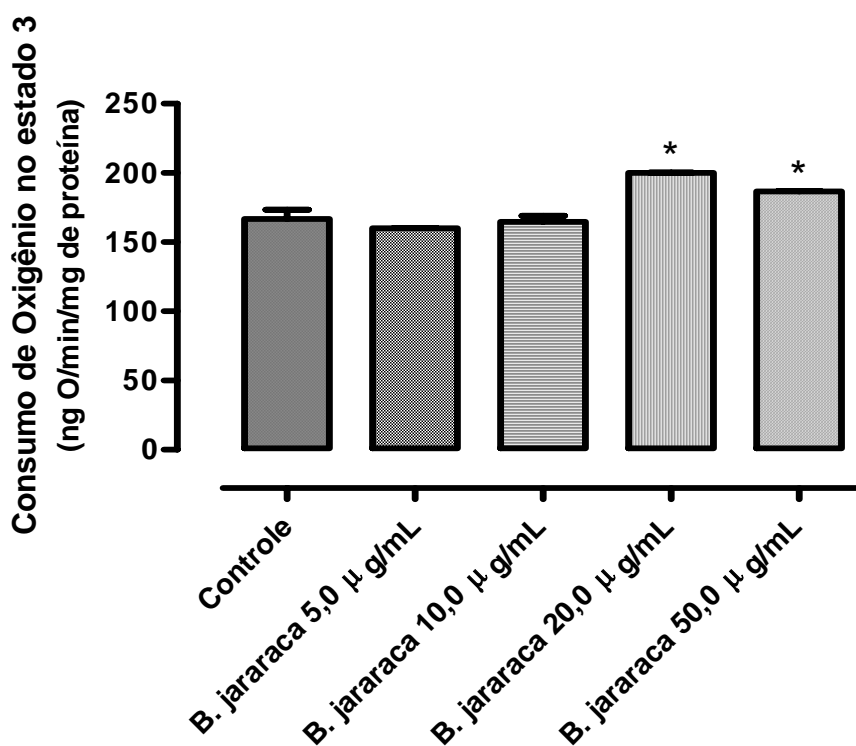


Figura 21. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. jararaca* sobre o consumo de oxigênio no estado 3 da respiração mitocondrial. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. * $p < 0,05$. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

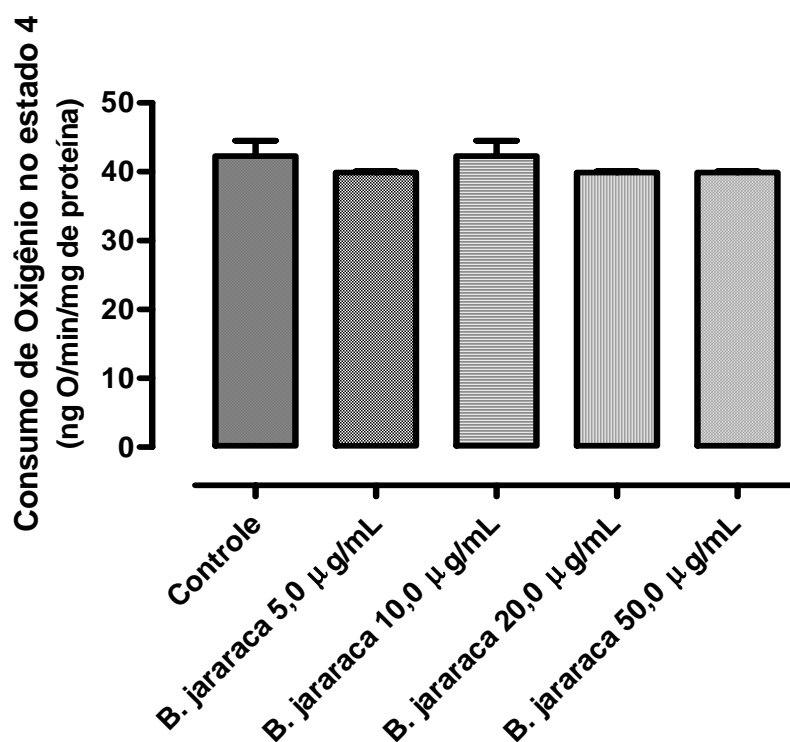


Figura 22. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. jararaca* sobre o consumo de oxigênio no estado 4 da respiração mitocondrial. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. * $p < 0,05$. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

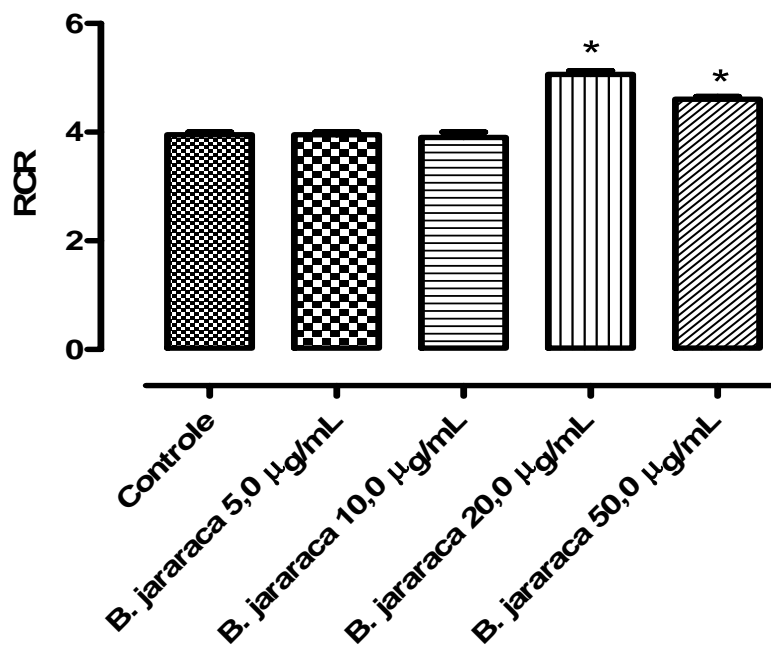


Figura 23. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. jararaca* sobre a razão do controle respiratório (RCR). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. * $p < 0,05$. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

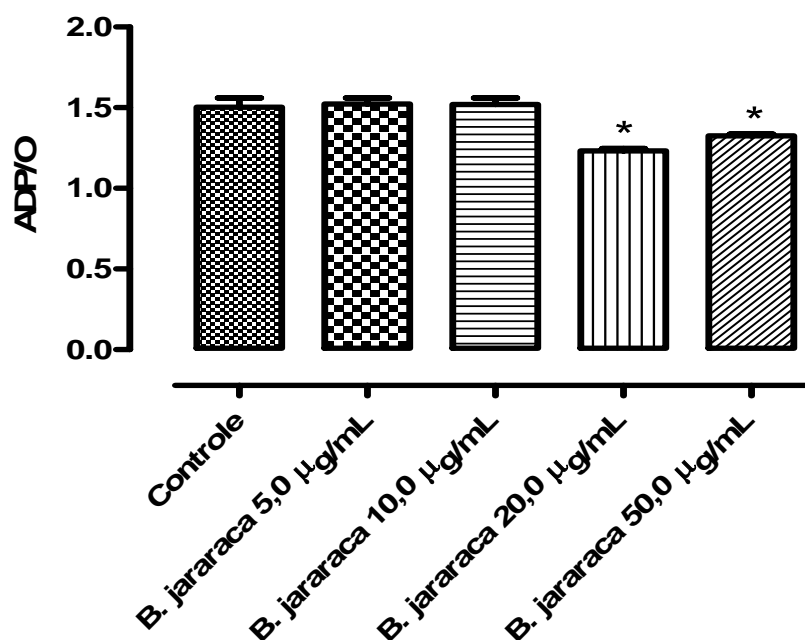


Figura 24. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. jararaca* sobre a razão do consumo de ADP pelo consumo de O₂ (ADP/O). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. *p < 0,05. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

Tabela 3. Efeito de diferentes concentrações (5,0; 10,0; 20,0 e 50,0 µg/mL) da fração peptídica (p.V) do veneno da isolada do veneno de *Bothrops jararaca* sobre a respiração mitocondrial de cérebro de rato.

PARÂMETRO	Controle	5,0 µg/mL	10,0 µg/mL	20,0 µg/mL	50,0 µg/mL
Consumo de O₂ no estado 3 (ng de O/min/mg de proteína)	166,87 ± 13,35	160,13 ± 0,13	164,65 ± 8,9	200,20 ± 0,05*	186,83 ± 0,13*
Consumo de O₂ no estado 4 (ng de O/min/mg de proteína)	42,27 ± 4,45	40,05 ± 0,02	42,27 ± 4,45	40,05 ± 0,02	40,05 ± 0,02
RCR	3,95 ± 0,10	4,00 ± 0,02	3,90 ± 0,20	5,00 ± 0,02*	4,66 ± 0,02*
ADP/O	1,50 ± 0,12	1,56 ± 0,02	1,52 ± 0,08	1,24 ± 0,02*	1,33 ± 0,02*

* significativo para p < 0,005; RCR, Razão de Controle Respiratório

4.12. Efeitos da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. jararaca* sobre a produção mitocondrial de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) (Figs. 25 e 26)

Houve uma diminuição significativa da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na concentração testada (50,0 $\mu\text{g/mL}$), quando comparada ao controle positivo (Figs. 25 e 26).

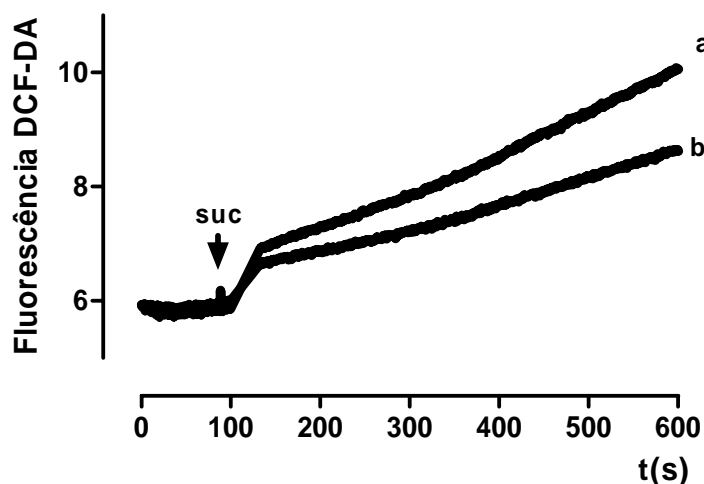


Figura 25. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. jararaca* sobre a produção de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio). Suc. Succinato; a. controle positivo (com t-bth); b. 50,0 $\mu\text{g/mL}$ + t-bth. O traçado é representativo de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

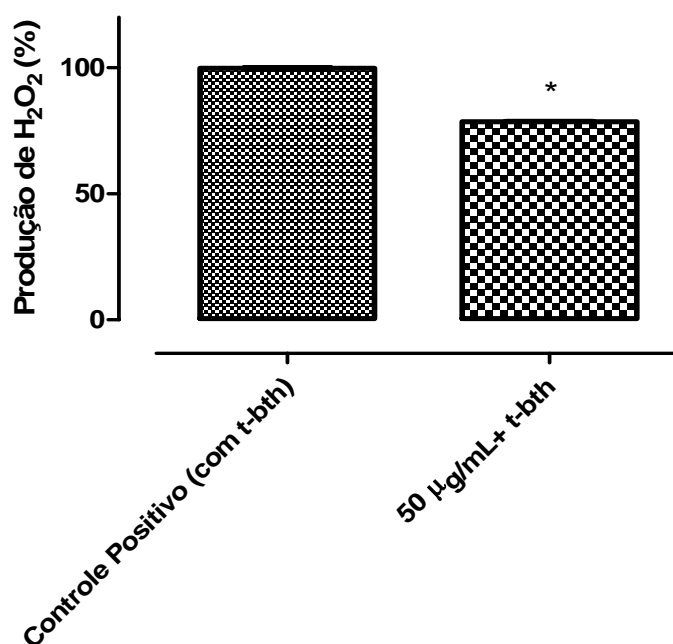


Figura 26. Efeito da fração peptídica (p.V) do veneno da *B. jararaca* sobre a produção de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio). t-bth. terc-butilhidroperóxido. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes; cada experimento foi realizado em triplicata. * $p < 0,05$. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Muitos estudos têm sido conduzidos no sentido de identificar peptídeos neuroprotetores e neuroativos naturais derivados de diferentes espécies de animais e plantas com vistas ao tratamento das doenças neurodegenerativas (Jones, Cartier *et al.*, 2001; Lewis e Garcia, 2003; Massensini, Romano-Silva *et al.*, 2003; Tsetlin e Hucho, 2004).

No presente estudo são avaliados, pela primeira vez, os efeitos de peptídeos de baixo peso molecular (p. V) extraídos dos venenos de *B. atrox*, *B. pirajai* e *B. jararaca* na função e no estresse mitocondrial. A fração p. V do veneno da *B. atrox* apresentou o efeito mais destacável (protetor), pois além de não alterar a função mitocondrial, mostrou-se capaz de (i) prevenir o intumescimento osmótico induzido por fosfato/cálcio, bem como de (ii) inibir a produção de H₂O₂ induzida por terc-butil hidroperóxido. A fração p. V do veneno da *B. jararaca* também inibe o intumescimento osmótico mitocondrial, mas só inibe a produção de H₂O₂ quando em elevada concentração e ainda apresenta efeito deletério sobre a função mitocondrial (potencial de membrana e respiração). A fração p. V do veneno da *B. pirajai* apresentou efeito tóxico pronunciado, afetando a respiração, induzindo a geração de H₂O₂ e o intumescimento osmótico mitocondrial.

O intumescimento osmótico mitocondrial é um evento decorrente da transição de permeabilidade de membrana mitocondrial (TPMM) e constitui uma forma bastante usual de avaliar a ocorrência da TPMM (Haworth e Hunter, 1979; Hunter e Haworth, 1979b; a). A disfunção mitocondrial está associada à elevada formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), indução da lesão oxidativa, e abertura do poro de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial (PTPMM) (Azbill, Mu *et al.*, 1997; Kristal e Dubinsky, 1997; Robertson, 2004).

O cérebro é altamente susceptível à lesão oxidativa devido ao fato de possuir (i) uma capacidade antioxidante reduzida, (ii) maior demanda de oxigênio, quando comparado a outros órgãos (Halliwell e Gutteridge, 1999), e (iii) alto conteúdo de ácidos graxos insaturados facilmente peroxidáveis (Nunomura, Honda *et al.*, 2006; Petrozzi, Ricci *et al.*, 2007), o que pode contribuir para lesão mitocondrial e degeneração neuronal (Ohtsuki, Matsumoto *et al.*, 1995; Calderon-Cortes, Cortes-Rojo *et al.*, 2008).

As mitocôndrias são essenciais para a função neuronal devido à capacidade glicolítica limitada deste tipo de células, o que as torna altamente dependentes da fosforilação oxidativa para suprir a sua demanda energética. No caso da doença de Alzheimer (DA), a desordem mitocondrial e o reduzido conteúdo de DNA mitocondrial são sinais patológicos precoces, precedendo o aparecimento de emaranhados neurofibrilares, especificamente nos mesmos neurônios vulneráveis à neurodegeneração (Parks, Smith *et al.*, 2001; Moreira, Santos *et al.*, 2002). Vários estudos mostraram que na presença de peptídeos beta-amilóides (β a) neurotóxicos as mitocôndrias isoladas têm o potencial de membrana reduzido, ocorre o intumescimento da matriz e prejuízo da respiração na presença de cálcio (Parks, Smith *et al.*, 2001; Moreira, Santos *et al.*, 2002).

O estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial são achados também na doença de Parkinson, tanto em humanos quanto em modelos experimentais, e sugere-se que a transição de permeabilidade da membrana mitocondrial esteja envolvida nesta doença (Packer, Miesel *et al.*, 1996).

Além das mitocôndrias serem as principais fontes de energia celular, são também as principais mediadoras de morte celular, tanto por necrose quanto por apoptose. Uma das formas de ocorrência destes efeitos é através da TPMM, quando a membrana mitocondrial interna se torna excessivamente permeável a íons e outros solutos, resultando em intumescimento osmótico, colapso do potencial de membrana interna, deficiência energética e morte celular. Os principais fatores que induzem a TPMM são níveis elevados de cálcio intracelular e estresse oxidativo. Caracteristicamente, a TPMM é inibida pela Ciclosporina A. Muitas desordens agudas e crônicas do SNC (sistema nervoso central) estão associadas aos mesmos eventos, incluindo estresse oxidativo, distúrbios na homeostase do cálcio e disfunção mitocondrial. Em conjunto, estes fatores contribuem para a indução de TPMM e acredita-se que este evento seja um dos principais responsáveis pela morte neuronal característica das doenças neurodegenerativas (Norenberg e Rao, 2007).

Em nosso estudo utilizamos o inibidor clássico (Ciclosporina A - CsA) da TPMM e desta forma caracterizamos o intumescimento osmótico induzido (e inibido) em nossos experimentos como sendo relacionado à abertura do PTPMM.

Como dito anteriormente, a fração peptídica proveniente do veneno de *B. atrox* apresentou um efeito protetor bastante destacável, pois, além de não alterar a função mitocondrial mostrou-se capaz de inibir eventos sabidamente associados à

morte neuronal das DN: estresse oxidativo e TPMM. A TPMM é um fenômeno bem documentado, o qual é mediado pela abertura de poros específicos (PTPMM) na membrana mitocondrial, que além da difusão de solutos com peso molecular menor que 1,5 kDa (1500 daltons), também promovem a liberação de fatores pró-apoptóticos, incluindo citocromo c, um sinalizador chave da via intrínseca (mitocondrial) da apoptose (Zoratti e Szabo, 1995; Zaidan, Nilsson *et al.*, 2004; Kroemer, Galluzzi *et al.*, 2007; Morota, Mansson *et al.*, 2009; Sayeed, Parvez *et al.*, 2009). Assim, a fração peptídica (p. V) do veneno da *B. atrox* é potencialmente capaz de inibir a apoptose induzida pela via mitocondrial. O fato de que esta fração tenha inibido a geração de H₂O₂, está de acordo e explica a inibição da TPMM, evento induzido por acúmulo de cálcio e estresse oxidativo. Como já descrito acima, o efeito protetor desta fração contra a TPMM foi comparado ao efeito inibitório da CsA, um inibidor clássico deste evento. Todas as concentrações avaliadas desta fração protegeram contra o intumescimento osmótico de forma tão eficaz quanto a CsA.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A fração peptídica proveniente do veneno da *B. pirajai* é potencialmente neurotóxica, capaz de induzir estresse oxidativo e de afetar a função mitocondrial.

A fração peptídica proveniente do veneno da *B. jararaca* apresenta atividade protetora contra o estresse oxidativo e o intumescimento osmótico, porém afeta a função mitocondrial.

A fração peptídica proveniente do veneno da *B. atrox* é potencialmente neuroprotetora e seu mecanismo de ação provavelmente envolve inibição da TPMM. Dada a importância da TPMM na morte neuronal de várias DN, a prevenção deste fenômeno é uma estratégia interessante para o tratamento destas neuropatias e, portanto, esta fração peptídica pode ser útil para o desenvolvimento de futuros fármacos com a finalidade de prevenir a neurodegeneração ou retardar a sua progressão.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ANDERSEN, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* [S.I.], v. 10 Suppl, p. S18-25, Jul 2004.

ANDERSON, M. F.; SIMS, N. R. Improved recovery of highly enriched mitochondrial fractions from small brain tissue samples. *Brain Res Brain Res Protoc* [S.I.], v. 5, n. 1, p. 95-101, Feb 2000.

AZBILL, R. D. *et al.* Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res* [S.I.], v. 765, n. 2, p. 283-90, Aug 15 1997.

BALABAN, R. S. *et al.* Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* [S.I.], v. 120, n. 4, p. 483-95, Feb 25 2005.

BARBOSA, L. F. *et al.* Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? *Oxidative damage and neurodegeneration. What have we learned from transgenic and knockout animals?* São Paulo, 2006.

BEHL, C. *et al.* Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* [S.I.], v. 77, n. 6, p. 817-27, Jun 17 1994.

BOSEL, J. *et al.* Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J Neurochem* [S.I.], v. 92, n. 6, p. 1386-98, Mar 2005.

BOSSY-WETZEL, E. *et al.* Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* [S.I.], v. 10 Suppl, p. S2-9, Jul 2004.

BUSS, R. R.; OPPENHEIM, R. W. Role of programmed cell death in normal neuronal development and function. *Anat Sci Int* [S.I.], v. 79, n. 4, p. 191-7, Dec 2004.

CAIN, K.; SKILLETER, D. N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, k.; MULLOCK, B. (Eds). . *Biochemical toxicology. A practical approach* [S.I.], p. 217-54, 1987.

CALABRESE, V. *et al.* Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci* [S.I.], v. 233, n. 1-2, p. 145-62, Jun 15 2005.

CALDERON-CORTES, E. *et al.* Changes in mitochondrial functionality and calcium uptake in hypertensive rats as a function of age. *Mitochondrion* [S.I.], v. 8, n. 3, p. 262-72, Jun 2008.

CATHCART, R. *et al.* Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem* [S.I.], v. 134, n. 1, p. 111-6, Oct 1 1983.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* [S.I.], v. 17, p. 65-134, 1956.

CLEMENS, J. A.; PANETTA, J. A. Neuroprotection by antioxidants in models of global and focal ischemia. *Ann N Y Acad Sci* [S.I.], v. 738, p. 250-6, Nov 17 1994.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. *Cell* [S.I.], v. 116, n. 2, p. 205-19, Jan 23 2004.

EBADI, M. *et al.* Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* [S.I.], v. 48, n. 1, p. 1-19, Jan 1996.

EMAUS, R. K. *et al.* Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 850, n. 3, p. 436-48, Jul 23 1986.

ENDRES, M.; DIRNAGL, U. Ischemia and stroke. *Adv Exp Med Biol* [S.I.], v. 513, p. 455-73, 2002.

FATOKUN, A. A. *et al.* Cell death in rat cerebellar granule neurons induced by hydrogen peroxide in vitro: mechanisms and protection by adenosine receptor ligands. *Brain Res* [S.I.], v. 1132, n. 1, p. 193-202, Feb 9 2007.

GREENAMYRE, J. T. *et al.* Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem Soc Symp* [S.I.], v. 66, p. 85-97, 1999.

GUTTERIDGE, J. M. Hydroxyl radicals, iron, oxidative stress, and neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* [S.I.], v. 738, p. 201-13, Nov 17 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Oxidative stress and disorders of the nervous system: general principles and ageing, nutrition, disease and therapy: a role for antioxidants?*. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. England: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford University Press* [S.I.], 2003.

HAWORTH, R. A.; HUNTER, D. R. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys* [S.I.], v. 195, n. 2, p. 460-7, Jul 1979.

HORTON, K. L. *et al.* Mitochondria-penetrating peptides. *Chem Biol* [S.I.], v. 15, n. 4, p. 375-82, Apr 2008.

HUNTER, D. R.; HAWORTH, R. A. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys* [S.I.], v. 195, n. 2, p. 453-9, Jul 1979a.

_____. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release. *Arch Biochem Biophys* [S.I.], v. 195, n. 2, p. 468-77, Jul 1979b.

JONES, R. M. *et al.* Composition and therapeutic utility of conotoxins from genus *Conus*. Patent status 1996-2000. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* [S.I.], v. 11, n. 4, p. 603-623, Apr 2001.

KELLER, J. N. *et al.* Increased sensitivity to mitochondrial toxin-induced apoptosis in neural cells expressing mutant presenilin-1 is linked to perturbed calcium homeostasis and enhanced oxyradical production. *J Neurosci* [S.I.], v. 18, n. 12, p. 4439-50, Jun 15 1998.

KOBAYASHI, T. *et al.* Calcium-induced mitochondrial swelling and cytochrome c release in the brain: its biochemical characteristics and implication in ischemic neuronal injury. *Brain Res* [S.I.], v. 960, n. 1-2, p. 62-70, Jan 17 2003.

KONTUSH, K.; SCHEKATOLINA, S. Vitamin E in neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* [S.I.], v. 1031, p. 249-62, Dec 2004.

KRISTAL, B. S.; DUBINSKY, J. M. Mitochondrial permeability transition in the central nervous system: induction by calcium cycling-dependent and -independent pathways. *J Neurochem* [S.I.], v. 69, n. 2, p. 524-38, Aug 1997.

KROEMER, G. The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ* [S.I.], v. 5, n. 6, p. 547, Jun 1998.

KROEMER, G. *et al.* Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* [S.I.], v. 87, n. 1, p. 99-163, Jan 2007.

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

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* [S.I.], v. 443, n. 7113, p. 787-95, Oct 19 2006.

MASSESSINI, A. R. *et al.* Sodium channel toxins and neurotransmitter release. *Neurochem Res* [S.I.], v. 28, n. 10, p. 1607-11, Oct 2003.

MATTSON, M. P. Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. *Brain Res* [S.I.], v. 886, n. 1-2, p. 47-53, Dec 15 2000.

_____. Neuronal life-and-death signaling, apoptosis, and neurodegenerative disorders. *Antioxid Redox Signal* [S.I.], v. 8, n. 11-12, p. 1997-2006, Nov-Dec 2006.

MICHEL, P. P. *et al.* Role of activity-dependent mechanisms in the control of dopaminergic neuron survival. *J Neurochem* [S.I.], v. 101, n. 2, p. 289-97, Apr 2007.

MOREIRA, P. I. *et al.* Effect of amyloid beta-peptide on permeability transition pore: a comparative study. *J Neurosci Res* [S.I.], v. 69, n. 2, p. 257-67, Jul 15 2002.

_____. Oxidative stress and neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* [S.I.], v. 1043, p. 545-52, Jun 2005.

MOROTA, S. *et al.* Evaluation of putative inhibitors of mitochondrial permeability transition for brain disorders - Specificity vs. toxicity. *Exp Neurol* [S.I.], Apr 5 2009.

MUQIT, M. M. *et al.* Mitochondria in Parkinson disease: back in fashion with a little help from genetics. *Arch Neurol* [S.I.], v. 63, n. 5, p. 649-54, May 2006.

NORENBERG, M. D.; RAO, K. V. The mitochondrial permeability transition in neurologic disease. *Neurochem Int* [S.I.], v. 50, n. 7-8, p. 983-97, Jun 2007.

NUNOMURA, A. *et al.* Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases. *J Biomed Biotechnol* [S.I.], v. 2006, n. 3, p. 82323, 2006.

OHTSUKI, T. *et al.* Mitochondrial lipid peroxidation and superoxide dismutase in rat hypertensive target organs. *Am J Physiol* [S.I.], v. 268, n. 4 Pt 2, p. H1418-21, Apr 1995.

OLIVEIRA, J. M. *et al.* Mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: the bioenergetics of isolated and in situ mitochondria from transgenic mice. *J Neurochem* [S.I.], v. 101, n. 1, p. 241-9, Apr 2007.

PACKER, M. A. *et al.* Exposure to the parkinsonian neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) and nitric oxide simultaneously causes cyclosporin A-sensitive mitochondrial calcium efflux and depolarisation. *Biochem Pharmacol* [S.I.], v. 51, n. 3, p. 267-73, Feb 9 1996.

PALIWAL, R. *et al.* Cell-selective mitochondrial targeting: progress in mitochondrial medicine. *Curr Drug Deliv* [S.I.], v. 4, n. 3, p. 211-24, Jul 2007.

PARKS, J. K. *et al.* Neurotoxic Abeta peptides increase oxidative stress in vivo through NMDA-receptor and nitric-oxide-synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition in vitro. *J Neurochem* [S.I.], v. 76, n. 4, p. 1050-6, Feb 2001.

PETROZZI, L. *et al.* Mitochondria and neurodegeneration. *Biosci Rep* [S.I.], v. 27, n. 1-3, p. 87-104, Jun 2007.

PRZEDBORSKI, S. *et al.* Neurodegeneration: what is it and where are we? *J Clin Invest* [S.I.], v. 111, n. 1, p. 3-10, Jan 2003.

ROBBERECHT, W.; VAN DEN BOSCH, L. The pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Research Communications* [S.I.], v. 23, n. 2, p. 67-75, Sep-Oct 1998.

ROBERTSON, C. L. Mitochondrial dysfunction contributes to cell death following traumatic brain injury in adult and immature animals. *J Bioenerg Biomembr* [S.I.], v. 36, n. 4, p. 363-8, Aug 2004.

SANTOS, A. C. *et al.* Hg(II)-induced renal cytotoxicity: in vitro and in vivo implications for the bioenergetic and oxidative status of mitochondria. *Mol Cell Biochem* [S.I.], v. 177, n. 1-2, p. 53-9, Dec 1997.

SAYEED, I. *et al.* Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism for better neuroprotective effects of allopregnanolone over progesterone. *Brain Res* [S.I.], v. 1263, p. 165-73, Mar 31 2009.

SELKOE, D. J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* [S.I.], v. 6, p. 487-498, 1993.

SHI, Y. Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure* [S.I.], v. 10, n. 3, p. 285-8, Mar 2002.

SIMS, N. R.; ANDERSON, M. F. Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation. *Nat Protoc* [S.I.], v. 3, n. 7, p. 1228-39, 2008.

SWERDLOW, R. H. Treating neurodegeneration by modifying mitochondria: potential solutions to a "complex" problem. *Antioxid Redox Signal* [S.I.], v. 9, n. 10, p. 1591-603, Oct 2007.

TRUSHINA, E.; MCMURRAY, C. T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neuroscience* [S.I.], v. 145, n. 4, p. 1233-48, Apr 14 2007.

TSETLIN, V. I.; HUCHO, F. Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *FEBS Lett* [S.I.], v. 557, n. 1-3, p. 9-13, Jan 16 2004.

VERCESI, A. E. *et al.* Mitochondrial Ca²⁺ transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. *Front Biosci* [S.I.], v. 11, p. 2554-64, 2006.

YAMADA, Y. *et al.* MITO-Porter: A liposome-based carrier system for delivery of macromolecules into mitochondria via membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 1778, n. 2, p. 423-32, Feb 2008.

YAMADA, Y.; HARASHIMA, H. Mitochondrial drug delivery systems for macromolecule and their therapeutic application to mitochondrial diseases. *Adv Drug Deliv Rev* [S.I.], v. 60, n. 13-14, p. 1439-62, Oct-Nov 2008.

YAN, N.; SHI, Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* [S.I.], v. 21, p. 35-56, 2005.

Z Aidan, E. *et al.* Increased mitochondrial permeability in response to intrastriatal N-methyl-D-aspartate: detection based on accumulation of radiolabel from [3H]deoxyglucose. *Neurochem Res* [S.I.], v. 29, n. 3, p. 609-16, Mar 2004.

ZECCA, L. *et al.* Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* [S.I.], v. 5, n. 11, p. 863-73, Nov 2004.

ZHAO, B. Natural antioxidants for neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* [S.I.], v. 31, n. 1-3, p. 283-93, 2005.

ZHAO, K. *et al.* Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *J Biol Chem* [S.l.], v. 279, n. 33, p. 34682-90, Aug 13 2004.

ZORATTI, M.; SZABO, I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* [S.l.], v. 1241, n. 2, p. 139-76, Jul 17 1995.