

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



JULIANA MINARDI NASCIMENTO

CARACTERIZAÇÃO DA DNase DA PEÇONHA DA SERPENTE

***Bothrops alternatus*: COMPARAÇÃO COM A DNase ÁCIDA DE**

MAMÍFEROS ENVOLVIDA EM APOPTOSE

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Juliana Minardi Nascimento
Stephen Hyslop
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Stephen Hyslop

Co-orientadora: Profa. Dra. Carla Beatriz Collares-Buzato

Campinas, 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

N17c

Nascimento, Juliana Minardi

Caracterização da Dnase da peçonha da serpente *Bothrops alternatus*: comparação com a Dnase ácida de mamíferos envolvida em apoptose / Juliana Minardi Nascimento. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadores: Stephen Hyslop, Carla Beatriz Collares Buzato.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Desoxirribonucleases de Sítio Específico do Tipo II.
2. Purificação. 3. Apoptose. 4. Citotoxicidade. I.
Hyslop, Stephen. II. Collares-Buzato, Carla Beatriz. III.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Characterization of a Dnase from *Bothrops alternatus* snake venom: comparison with mammalian acid Dnases involved in apoptosis.

Palavras-chave em inglês: Type II Site-specific deoxyribonucleases; Purification; Apoptosis; Cytotoxicity.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Stephen Hyslop, Patrícia Aline Boer, Roger Frigério Castilho, Carmen Veríssima Ferreira, Soraya Soubhi Smaili.

Data da defesa: 29/02/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

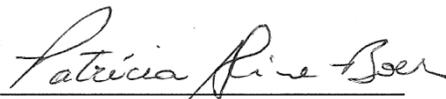
Campinas, 29 de fevereiro de 2008

BANCA EXAMINADORA

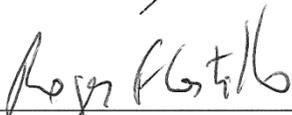
Prof. Dr. Stephen Hyslop (Orientador)


Assinatura

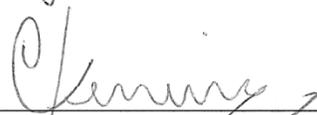
Profa. Dra. Patrícia Aline Boer


Assinatura

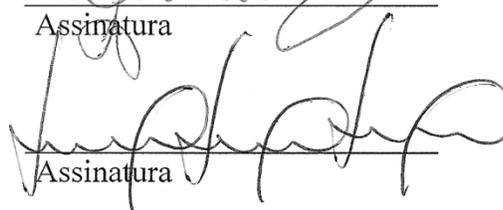
Prof. Dr. Roger Frigério Castilho


Assinatura

Profa. Dra. Carmem Veríssima Ferreira


Assinatura

Profa. Dra. Soraya Soubhi Smaili


Assinatura

Profa. Dra. Patrícia da Silva Melo

Assinatura

Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo

Assinatura

Profa. Dra. Catarina de Fátima Pereira Teixeira

Assinatura

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Carlos e Neide, por todo amor e compreensão ao longo destes anos, por permitirem que seus filhos acreditassem em seus sonhos e buscassem seus objetivos. Obrigada por me darem a vida e me ensinarem a viver.

Aos meus irmãos, Tiago e Marina, pelo amor incondicional, pelas risadas, cumplicidade e amizade de vocês.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e a minha família, que acreditaram em mim e me permitiram sonhar com o mundo, livre para acreditar que eu poderia abraçá-lo, agradeço por todo apoio incondicional, pela paciência nas crises e em todas as etapas da minha vida. Obrigada por existirem na minha vida, por fazerem de mim o que hoje sou, amo profundamente todos vocês.

A Deus por sua força, pela minha vida e saúde.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Stephen Hyslop, por abrir as portas de seu laboratório, pela confiança depositada em mim em realizar um doutorado direto, e por ter a certeza de que tudo um dia daria certo afinal, bastava fé e trabalho. Obrigada por acreditar em minha capacidade, por me ajudar a crescer e por tanto me ensinar em pesquisa.

À Profa. Dra. Carla B. Collares Buzato, fundamental co-orientadora que me apresentou um novo mundo de idéias, agradeço pela acolhida em seu laboratório, pelas sugestões, pela grande paciência e compreensão, e pela confiança em meu trabalho e capacidade de pesquisa.

À Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles que durante a graduação iniciou a minha jornada dentro da pesquisa, agradeço pelo apoio e pelo exemplo de conduta. À Profa. Dra. Eneida de Paula agradeço pelos conselhos, por me mostrar o conceito de grupo, principalmente não me permitindo desistir do ensino. Muito obrigada.

As minhas amigas-irmãs Su e Cau (Érika e Claudia para os não-iniciados), obrigada pelo carinho de vocês, pelas conversas, pelas risadas e pelos choros, pelas confidências, cumplicidade e amizade, por todos os momentos que dividimos, seja acampando na praia ou em nosso dia-a-dia ao longo destes quase 10 anos. Amo muito vocês duas e espero tê-las para sempre em minha vida.

Aos meus grandes amigos do coração Anne, Bispo, Má e Sil, obrigada por fazerem parte da minha vida em momentos tão importantes, por não me entenderem e mesmo assim estarem ao meu lado, e, principalmente obrigada por acreditarem em mim quando eu mesma deixei de acreditar. Ao lado ou distante, mesmo que em outro país, eu sei que posso sempre contar com vocês, nós sempre iremos compreender o que o outro está sentindo com o olhar, eu amo vocês “pra sempre”.

À minha segunda família - meia-dúzia, Ana, Cíntia, Gra, Sil e Su obrigada pelos anos de convivência e aprendizado, de conversas na cozinha e bolos da madrugada, vocês tornaram a minha vida durante a graduação e pós, longe de casa, mas em família. Amo vocês todas.

Aos meus amigos, em especial à Ana Flávia e à Bárbara, obrigada pelas viagens, pelas baladas, pelas conversas, pelos sermões e desabafos. O mundo é tão mais colorido com amigos por perto.

Aos companheiros de trabalho no Laboratório de Farmacologia Bioquímica: Adriana, Ágatha, Alessandra, André, Cássia, Christiane, Delano, Elionai, Erika, Fernanda, Gilberto, Gustavo, Igor, Isabele, Lourdes, Kiara, Mariana, Pamela, Paula, Rafael, Renata, Thomaz, e aqueles quais eu me esqueci de mencionar, mas que ainda assim estarão em minhas lembranças. A todos que em algum momento dentro destes cinco anos, participaram da minha jornada, contribuindo com a troca de conhecimentos, com o aprendizado de novas técnicas, “com os experimentos-que-não-dão-certo”, com as conversas jogadas fora e os cafezinhos na copa, obrigada por tornarem meus dias mais agradáveis.

Em especial quero agradecer as minhas amigas Chris e Ki, pela amizade que se fortalece a cada dia, pelas viagens e loucuras, escapulidas das sextas-feiras à noite e por agüentarem todas as minhas reclamações e todo o meu mau humor sem se abalarem, principalmente neste último ano de estresse, adoro muito vocês.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Células: Carol, Elisa, Junia, Carlinha e Ricardo, por me acolherem neste seletivo grupo, por serem tão adoráveis e alegres e compartilharem conhecimentos ao longo destes anos, além claro, de me dispensarem da limpeza semanal, muito obrigada pessoal. Adorei conviver com vocês, vocês trouxeram mais alegria aos meus dias.

Aos colegas e amigos do Departamento de Bioquímica, em especial ao Laboratório de Biomembranas, com meus companheiros de conversas, bandeirão e churrascos Beth, Bispo, Cíntia, Cleyton, Dani Morango, Dani Japinha, Josi, Léo, Luciana, Nonô e Paulinho adorei compartilhar estes momentos, a amizade, rir muito e aprender muito com vocês.

Aos colaboradores Prof. Dr. Alexandre Nowill, do CIPOI-FCM e Prof. Dr. Marcos Eberlin, do Laboratório Thomsom, do Instituto de Química, UNICAMP, por abrirem suas portas e permitirem a troca de experiências e a multidisciplinaridade, muito importantes para a realização deste trabalho.

Aos professores da minha banca de qualificação Dr. Sérgio Marangoni, Dra. Luciana Le Sueur Maluf e Dra. Patrícia Aline Boer, obrigada pelas valiosas sugestões.

Aos professores da minha banca de defesa, Profa. Dra. Carmem Veríssima Ferreira, Prof. Dr. Roger Frigério Castilho, Profa. Dra. Patrícia Aline Boer, Profa. Dra. Soraya Soubhi Smaili, Profa. Dra. Patrícia da Silva Melo, Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araujo, Profa. Dra. Catarina de Fatima Pereira Teixeira agradeço pelo aceite em contribuir com a confecção desta tese.

Aos professores que estimularam minha capacidade de aprender, aos que incentivaram meus questionamentos e aqueles que apenas estiveram ali, obrigada por ensinar.

Aos técnicos José Ilton, Emanuela, Aline, Rafaela e Maiara, do Departamento de Farmacologia, meus sinceros agradecimentos por sempre estarem prontos a atender meus pedidos. À técnica Marta do Departamento de Histologia e Embriologia, pelas dicas preciosas. Aos técnicos Márcio, Paulo Baldasso, Maribel, Erika, Dona Cida por me acudirem sempre. Sem o trabalho de vocês nenhum trabalho é possível.

Aos alunos, docentes e funcionários do Departamento de Farmacologia, na Faculdade de Ciências Médicas, do Departamento de Histologia e Embriologia, e do Departamento de Bioquímica no Instituto de Biologia, da UNICAMP, que direta e indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho. Obrigada pelo convívio.

Ao Instituto de Biologia, UNICAMP, por permitir a minha completa formação.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, pelo meu doutoramento. Agradecimento especial à Andreia pela eficiência, simpatia e desembaraços burocráticos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelas bolsas de estudos, à FAPESP e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro, sem os quais este trabalho não poderia se realizar.

Aos que, por descuido, esqueci de mencionar e todos que direta ou indiretamente colaboraram para a execução deste trabalho.

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.

Ricardo Reis (1933)

Vou arriscando então, aqui e ali.
Enganar-me-ei provavelmente em detalhes dos mais importantes.
Mas é preciso desculpar.
Meu amigo nunca dava explicações.
Julgava-me talvez semelhante a ele.
Mas, infelizmente, não sei ver carneiro através de caixa.
Sou um pouco como as pessoas grandes.
Acho que envelheci.

Saint-Exupéry – “O Pequeno Príncipe” (1943)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
SUMÁRIO	ix
ABREVIATURAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABELAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
PREFÁCIO	xx
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO GERAL	2
Toxinologia de <i>Bothrops alternatus</i>	2
Enzimas que atuam em ligações fosfatos e ácidos nucleicos	5
OBJETIVOS	10
CAPÍTULO 2	11
Avaliação da ação da peçonha de <i>Bothrops alternatus</i> em células epiteliais renais MDCK em cultura	12
INTRODUÇÃO	12
MATERIAIS E MÉTODOS	15
Reagentes e peçonha	15
Cultura de células	15
Incubação com a peçonha de <i>B. alternatus</i>	16
Medida de resistência elétrica transepitelial	17
Marcação de proteínas juncionais e F-actina	18
Viabilidade celular	20
Produção de H ₂ O ₂	21
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	22
Microscopia de luz	22
Avaliação de apoptose com Anexina V-FITC	23
Fragmentação de DNA e eletroforese em gel de agarose	24
Análise estatística	25
RESULTADOS	26
DISCUSSÃO	46
CAPÍTULO 3	55
Purificação e caracterização da DNase ácida da peçonha de <i>Bothrops alternatus</i>	56
INTRODUÇÃO	56
Desoxirribonuclease II (DNase II)	56
DNase II de peçonhas	62

MATERIAIS E MÉTODOS	64
Reagentes.....	64
Peçonha e antivenenos	64
Quantificação de proteínas	65
Purificação da DNase II.....	65
Atividades enzimáticas.....	67
Eletroforese.....	70
Caracterização imunológica	72
Caracterização estrutural.....	74
RESULTADOS	76
Purificação da DNase II.....	76
Caracterização físico-química da DNase II purificada de <i>B. alternatus</i>	88
Caracterização imunológica da DNase II	95
DISCUSSÃO	104
CAPÍTULO 4	109
DNase II: uma enzima de <i>Bothrops alternatus</i> com atividade apoptótica sobre células MDCK em cultura	110
INTRODUÇÃO	110
Morte celular – apoptose e necrose	110
Peçonhas e apoptose	114
DNase II e apoptose	118
MATERIAIS E MÉTODOS	122
Reagentes.....	122
Peçonha.....	123
Quantificação de proteínas	123
Purificação da DNase II.....	123
Cultura de células.....	123
Viabilidade celular.....	124
Avaliação de apoptose com Anexina V– FITC.....	125
Avaliação da via de morte celular	126
Fragmentação de DNA e eletroforese em gel de agarose	129
Microscopia de luz	130
Análise estatística.....	131
RESULTADOS	132
Atividade de caspases após tratamento com DNase II	144
DISCUSSÃO	151
CAPÍTULO 5	155
CONCLUSÕES GERAIS	156
CAPÍTULO 6	157
REFERÊNCIAS	158
ANEXOS	177
<i>Publicações resultantes da tese:</i>	177

ABREVIATURAS

Ac-DEVD-CHO	N-Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-al
Ac-DEVD-pNa	N-Acetil-Asp-Glu-Val-Asp- <i>p</i> -nitroanilina
Ac-IETD-CHO	N-Acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-al
Ac-IETD-pNa	N-Acetil-Ile-Glu-Thr-Asp- <i>p</i> -nitroanilina
Ac-LEDH-pNa	N-Acetil-Leu-Glu-His-Asp- <i>p</i> -nitroanilina
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ANOVA	Teste de análise de variância
Apaf-1	Fator ativador de apoptose (<i>Apoptosis protease activating factor 1</i>)
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina de soro bovina
CAD	DNase ativada por caspase (<i>Caspase-activated DNase</i>)
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CHO	Células de ovário de hamster Chinês
CLSM	Microscopia de varredura confocal a laser (<i>Confocal laser scanning microscopy</i>)
ConA	Concanavalina A
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DBa	DNase II de <i>Bothrops alternatus</i>
DD	Domínio de morte (<i>Death domain</i>)
DED	Domínio efetor de morte (<i>Death effector domain</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase II	Desoxirribonuclease II
DO	Absorbância
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FADD	Proteína associada a Fas com domínio de morte (<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>)
Fas	Proteína da superfamília TNF, membro 6
FasL	Ligante de Fas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineethanesulfônico
HL-60	Células de leucemia promielóide humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (<i>High performance liquid chromatography</i>)
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
IgG	Imunoglobulina G

kDa	kilodaltons
L-AAO	L-aminoácido oxidase
LDH	Lactato desidrogenase
L-DNase II	DNase II derivada de LEI (Inibidor de elastase de leucócito)
MDCK	Células renais de cão da linhagem Madin-Darby
MEM	Meio essencial mínimo de Eagle
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico
MilliQ	Água ultrapura (~18 MΩ)
MPAC	Células de ducto pancreático de camundongo (<i>Mouse pancreatic duct cells</i>)
MTT	Brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
PBS	Tampão fosfato-salina
PC-PLC	Fosfolipase C fosfatidilcolina-específica
p-DNase II	DNase II de suínos
PEG	Polietilenoglicol
PET	Tereftalato de polietileno
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PVDF	Membrana polivinilideno difluoreto
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SEC	Cromatografia de exclusão molecular (<i>Size exclusion chromatography</i>)
SFB	Soro fetal bovino
SP-Sepharose	Sulfoxi-pentil Sepharose
TBE	Tampão Tris-borato EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TEnd	Células endoteliais murinas
TNF-α	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>)
TRADD	Proteína adaptadora do receptor de TNF via domínio de morte (<i>TNFRSF1A-associated via death domain</i>)
TRITC	Isotiocianato de tetrametil rodamina
Triton X-100	Polietileno glicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil éter
Tween 20	Polioxietileno (20) sorbato monolaurato
UV	Ultravioleta
VEC	Células endoteliais vasculares
Z-LEDH-FMK	Z-Leu-Glu(O-ME)-His-Asp(O-Me) fluorometil cetona

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.1: <i>Bothrops alternatus</i> (urutu).....	4
Figura 1.2: Distribuição geográfica de <i>Bothrops alternatus</i> na América do sul.	5
Figura 1.3: Possíveis locais de ação das enzimas de degradação de ácidos nucleicos na estratégia de imobilizar presas	9

Capítulo 2

Figura 2.1: Viabilidade das células MDCK após tratamento com a peçonha de <i>B. alternatus</i>	27
Figura 2.2: Redução da resistência elétrica transepitelial (R_T) através das monocamadas de MDCK após incubação com peçonha de <i>B. alternatus</i>	28
Figura 2.3: Rearranjo do citoesqueleto em células MDCK após tratamento com peçonha de <i>B. alternatus</i>	30
Figura 2.4: Rearranjo do citoesqueleto em células MDCK após tratamento com peçonha de <i>B. alternatus</i>	31
Figura 2.5: Distribuição celular das junções celulares, ocludina e E-caderina, em monocamadas de células MDCK incubadas com a peçonha de <i>B. alternatus</i>	33
Figura 2.6: Células MDCK coradas com azul de toluidina.	35
Figura 2.7: Células MDCK coradas pela reação de Feulgen.	36
Figura 2.8: Análise morfométrica de células MDCK tratadas com peçonha de <i>B. alternatus</i> e coradas com (a) azul de toluidina para detectar alterações na morfologia celular e (b) reação de Feulgen para detectar mudanças na morfologia nuclear.	37
Figura 2.9: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das monocamadas de MDCK em cultura.	39
Figura 2.10: Dupla marcação das células MDCK com faloidina e DAPI, após tratamento com a peçonha de <i>B. alternatus</i> (10 ou 100 $\mu\text{g/mL}$) por 3 h.	40
Figura 2.11: Perfil eletroforético de DNA extraído de células MDCK em cultura incubadas com a peçonha de <i>B. alternatus</i>	41
Figura 2.12: Citometria de fluxo das células aderentes e não aderentes de monocamadas controle e tratadas com a peçonha de <i>B. alternatus</i>	42
Figura 2.13: Produção temporal de H_2O_2 após exposição de monocamadas de células MDCK à peçonha de <i>B. alternatus</i>	44
Figura 2.14: Efeito protetor da catalase (a,b), da superóxido dismutase (SOD; c,d) e do L-NAME (e,f) sobre a redução na viabilidade das células MDCK induzidas pela peçonha de <i>B. alternatus</i>	45

Capítulo 3

Figura 3.1: Esquema de clivagem dupla do DNA (barras vermelhas) pela DNase II, e a formação de fragmentos com terminais 3'-fosfato livres.....	57
Figura 3.2: Modelo da forma madura da DNase II α baseada no alinhamento com fosfolipase D proposto por CYMERMAN <i>et al.</i> (2005).....	59
Figura 3.3: Modelo esquemático da reação catalisada por DNase II. I a IV são as principais reações catalizadas pela enzima.....	60

Figura 3.4: Árvore filogenética da família de DNases II.....	61
Figura 3.5: Cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap® SP-Sepharose (10 mL) da peçonha de <i>B. alternatus</i>	78
Figura 3.6: Cromatografia de afinidade em coluna HiTrap® heparina-Sepharose (5 mL)..	80
Figura 3.7: Cromatografia de gel filtração em coluna Superdex 75.....	82
Figura 3.8: Cromatografia de afinidade em coluna ConA-Sepharose.....	84
Figura 3.9: Cromatografia de gel filtração em coluna BioSuite UHR SEC 250.....	86
Figura 3.10: Esquema das etapas cromatográficas utilizadas na purificação da DNase II.	87
Figura 3.11: Cromatografia de fase reversa em coluna SOURCE 15 RPC.....	89
Figura 3.12: 2D-PAGE da DNase II purificada	91
Figura 3.13: Estimativas da massa molecular e do pI da DNase II.	92
Figura 3.14: Espectro de massa MALDI-MS da amostra obtida no pico I da BioSource UHR SEC.....	93
Figura 3.15: Imunorreatividade de IgGs totais de antiveneno botrópico purificadas com a DNase II da peçonha de <i>B. alternatus</i>	95
Figura 3.16: <i>Western blotting</i> da DNase II com antiveneno botrópico comercial e com anticorpo anti-DNase II humana	97
Figura 3.17: Efeito do pH, estabilidade térmica e concentração de sal do tampão na atividade enzimática da DNase II.....	99
Figura 3.18: Atividade da DNase II sobre diversos substratos.....	100
Figura 3.19: Atividade endonucleolítica da DNase II sobre DNA circular de plasmídeos.	100
Figura 3.20: Efeito da concentração de DNA na atividade da DNase II de <i>B. alternatus</i> , e determinação dos parâmetros cinéticos.	102
Figura 3.21: Influência de cátions bivalentes na atividade da DNase II	103
Capítulo 4	
Figura 4.1: Vias intracelulares de ativação de caspases e indução da apoptose.	112
Figura 4.2: Esquema da ação de componentes de peçonhas ofídicas na morte celular apoptótica.....	117
Figura 4.3: Vias apoptóticas descritas por COUNIS e TORRIGLIA (2000) envolvendo DNases	119
Figura 4.4: Alterações em células MDCK após incubação com DNase de <i>B. alternatus</i> (DBa), fotografadas em microscópio de contraste de fase.....	135
Figura 4.5: Células MDCK tratadas com DNase II por 24 h e coradas com azul de toluidina e pela reação de Feulgen.....	137
Figura 4.6: Análise eletroforética da fragmentação de DNA em células MDCK tratadas com DNase II de <i>B. alternatus</i> ou H ₂ O ₂ 1 e 2 mM	138
Figura 4.7: Viabilidade de células MDCK após incubação com DNase II de <i>B. alternatus</i> (DBa).....	141
Figura 4.8: Análise por citometria de fluxo de células MDCK tratadas com DNase II de <i>B. alternatus</i>	143
Figura 4.9: Atividade de caspases 3, 8 e 9 em células MDCK tratadas com DNase II.	146
Figura 4.10: Atividade de caspases 3, 8 e 9 após tratamento das células MDCK com DNase II e inibidores de caspases.....	148
Figura 4.11: <i>Western blotting</i> das proteínas envolvidas em apoptose.	150
Figura 4.12: Esquema hipotético da ação apoptótica da DNase II de <i>B. alternatus</i> em células MDCK.	154

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 2.1: Resumo dos anticorpos utilizados.	20
---	----

Capítulo 3

Tabela 3.1: Resumo dos anticorpos utilizados.	73
---	----

Tabela 3.2: Purificação e rendimento da DNase II de <i>B. alternatus</i>	87
--	----

Tabela 3.3: Composição de aminoácidos da DNase de <i>B. alternatus</i> comparada com outras DNases II.	94
--	----

Tabela 3.4: Influência de diferentes reagentes na atividade da DNase II.....	103
---	-----

Capítulo 4

Tabela 4.1: Resumo de resultados obtidos por diferentes grupos descrevendo a degradação de DNA durante a apoptose.	121
--	-----

Tabela 4.2: Resumo dos anticorpos utilizados.	129
---	-----

RESUMO

As peçonhas de serpentes *Bothrops* são responsáveis por diversos danos locais (na região da mordida) e sistêmicos durante o envenenamento. Dentre as manifestações sistêmicas, a insuficiência renal aguda é um dos mais importantes efeitos tóxicos causados por acidentes botrópicos. Esta tese teve como objetivos: 1) investigar a ação da peçonha bruta de *B. alternatus* em células epiteliais renais MDCK; 2) proceder a purificação e caracterização de uma DNase ácida presente nesta peçonha; e 3) determinar a possível ação apoptótica desta DNase sobre células MDCK em cultura. Com relação às ações *in vitro* do peçonha bruta de *B. alternatus*, observamos modificações no citoesqueleto, nas junções intercelulares e sobre a morte celular das células MDCK tratadas com 10 ou 100 µg/mL de peçonha bruta. Dentre as modificações observadas, houve uma diminuição da resistência transpitelial, uma redistribuição de algumas proteínas associadas às junções intercelulares acompanhada por um desarranjo do citoesqueleto envolvendo as fibras de estresse na superfície basal e adesão focal associada a F-actina na região de contato célula-matriz. A análise morfológica mostrou uma diminuição do número de células entrando em mitose e um aumento do número de células com núcleos picnóticos ou morfológicamente alterados após tratamento com o peçonha. Microscopia eletrônica de varredura revelou uma densidade de microvilosidades diminuída, assim como a alteração da morfologia celular normal, de poliédrico para um formato fusiforme, nas células tratadas. O tipo principal de morte celular induzido pelo tratamento com o peçonha bruta foi a necrose, com uma frequência pequena de indução de apoptose. O pré-tratamento das células MDCK com catalase, superóxido dismutase e L-NAME inibiu os efeitos sobre morte celular causados pelo peçonha bruta, indicando o envolvimento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nos danos causados pelo envenenamento pela peçonha de *B. alternatus*.

As peçonhas ofídicas possuem uma grande variedade de enzimas que degradam ácidos nucléicos e seus constituintes. As desoxirribonucleases (DNases) são endonucleases presentes em peçonhas de serpentes que hidrolisam ácido desoxirribonucléico (DNA). Sua ação no envenenamento ocorre em conjunto com outras enzimas que quebram ligações fosfato (ATPases, 5'-nucleotidasas, fosfodiesterases, ribonucleases). Vários estudos sobre endonucleases em mamíferos sugerem que a DNase II (DNase ácida) seria responsável pela fragmentação do DNA durante a apoptose. É também conhecido que peçonhas são capazes de induzir apoptose em células. Através de uma combinação de cromatografias de troca iônica, gel

filtração, afinidade e HPLC, foi purificada uma DNase da peçonha de *B. alternatus*, com atividade específica de 3.489 unidades/mg (atividade específica da peçonha: 65 unidades/mg) e fator de purificação de ~54 vezes. As características bioquímicas desta enzima são: uma massa molecular de ~31 kDa, ausência de subunidades, pI de 4,4-5,2, pH ótimo de atividade de 4,7, termo estabilidade até 40°C. O K_m e V_{max} são 10.1 µg/mL e 352.5 U/mg, respectivamente. A enzima degrada preferencialmente DNA de dupla fita, com atividade menor sobre DNA desnaturado; também degrada DNA circular (dos plasmídeos pGEM e pBR322) mas não degrada RNA ou poly A. É inibida por altas concentrações (100 mM) de cátions (Ca^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+}), e também por N-etilmaleimida, iodoacetamida, ácido aurintricarboxílico e DTT, mas não por EDTA. A enzima é reconhecida por IgG antibotrópica em *Western blot* e no ELISA e por anti-DNase II humana no *Western blot*. Em células MDCK, a DNase produz alterações morfológicas como vacuolação do citoplasma, retração e destacamento das células em monocamada, presença de núcleos condensados e/ou fragmentados. Através de ensaios de viabilidade e citotoxicidade, verificamos que a DNase é citotóxica às células MDCK em doses a partir de 400 U/mL (~20 µg/mL). Além disso, causa fragmentação de DNA e um aumento no número de células apoptóticas, em menor proporção, de células em necrose. A via de apoptose estimulada pela enzima envolve a ativação das caspases 3, 8 e 9, e uma diminuição na expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Estes resultados mostram que a peçonha de *B. alternatus* é citotóxica às células MDCK, com parte desta toxicidade mediada pela DNase II. Esta enzima induz apoptose que poderia contribuir para a toxicidade geral da peçonha.

ABSTRACT

Bothrops snake venoms are cytotoxic to a variety of cells (endothelial, smooth muscle, renal and inflammatory cells), and may cause cell death by apoptosis. The venom components implicated in apoptosis include metalloproteinases and L-amino acid oxidase. In contrast, although acidic deoxyribonucleases (DNase II) have been implicated in DNA fragmentation during apoptosis in mammals, nothing is known of the involvement of venom deoxyribonucleases in this phenomenon. In this thesis, we 1) investigated the cytotoxicity of *Bothrops alternatus* venom in Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells, 2) purified and characterized an acidic DNase from this venom, and 3) assessed the apoptotic activity of this DNase in MDCK cells. Treatment with *B. alternatus* venom (10 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) markedly decreased the transepithelial electrical resistance of cultured cells, and caused redistribution of some junctional proteins followed by cytoskeletal rearrangement involving stress fibers at the basal cell surface and focal adhesion-associated F-actin in the cell-matrix contact region. There was a decrease in the number of mitotic cells and an increase in the number of cells with pycnotic or morphologically altered nuclei. Scanning electron microscopy revealed a decrease in microvillar density and alteration in the normal cell morphology from polyhedral to fusiform. Staining with annexin V-FITC and electrophoresis of cellular DNA suggested that cell death was predominantly by necrosis. Pretreating the cells with catalase, superoxide dismutase or L-NAME significantly attenuated the venom-induced cell death, indicating the possible involvement of reactive oxygen and nitrogen species in this phenomenon. DNase II was purified from *B. alternatus* venom by a combination of ion exchange and gel filtration chromatographies (specific activity = 1.9×10^3 units/mg vs. 36.1 units/mg for venom, purification factor = 51.2, with a protein yield of 1.75%). The molecular mass of 26.4 kDa (SDS-PAGE) was unaffected by dithiothreitol or β -mercaptoethanol, indicating a single-chain protein. Immunoblotting with affinity-purified IgG from commercial bothropic antivenom also yielded a single protein band with the same molecular mass. The enzyme was also recognized by antibothropic IgG in ELISA and crossreacted with anti-human DNase II in western blots. The isoelectric point determined by 2D-gel electrophoresis was ~ 5.0 . DNase II cleaved double-stranded DNA, denatured DNA and circular DNA (from the plasmids pGEM and pBR 322), but there was no degradation of RNA. The enzyme was active in the pH range of 4.5-5.5, with an optimum at 4.7; activity was lost at $\geq 50^\circ\text{C}$. The K_m and V_{max} were 10.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 352.5 U/mg, respectively. Enzymatic activity was

inhibited by aurintricarboxylic acid (25 μ M), iodoacetamide (1 mM), DTT (1 mM) and Ca^{2+} , Mg^{2+} and Zn^{2+} (100 mM), but not by EDTA (5 mM). In MDCK cells, DNase II produced cytoplasmic vacuolization, cell shrinkage and cell detachment from the substrate, as well as condensed and/or fragmented nuclei. DNase was cytotoxic to MDCK cells at ≥ 400 U/mL (~ 20 μ g/mL), caused DNA fragmentation, and increased the proportion of apoptotic cells. The apoptotic pathway stimulated by this enzyme involved the activation of caspases 3, 8 and 9, and a decrease in the expression of the anti-apoptotic protein Bcl2. These results show that *B. alternatus* venom is cytotoxic to MDCK cells, with part of this toxicity probably being mediated by DNase II. This enzyme induces apoptosis that could contribute to the general cytotoxicity of the venom.

PREFÁCIO

Para facilitar a apresentação e discussão do trabalho realizado, esta tese está organizada em seis capítulos, sendo que os capítulos 2 a 4 seguem a estrutura de artigos científicos (introdução, materiais e métodos, resultados e discussão).

Os capítulos são:

Capítulo 1: Introdução geral e objetivos.

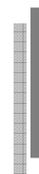
Capítulo 2: A avaliação da ação da peçonha de *Bothrops alternatus* em células epiteliais renais MDCK.

Capítulo 3: A purificação e a caracterização bioquímica e imunológica da DNase ácida da peçonha de *Bothrops alternatus*.

Capítulo 4: A ação da DNase ácida de *Bothrops alternatus* em células epiteliais renais MDCK.

Capítulo 5: Conclusões gerais do trabalho

Capítulo 6: Referências



CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

Peçonhas ofídicas são misturas complexas de proteínas, peptídeos, carboidratos, lipídeos, íons metálicos e compostos orgânicos (BIEBER, 1979; IWANAGA e SUZUKI, 1979; BJARNASON e FOX, 1988, 1989). Entretanto, há considerável variação na composição de peçonhas entre as famílias, gêneros e espécies de serpentes, ou mesmo dentro de uma mesma espécie. Estas diferenças na composição da peçonha se justificam devido às variações geográficas, sexuais, genéticas, ontogênicas e sazonais (BRAZIL, 1901; MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1990 a,b; CHIPPAUX *et al.*, 1991; FURTADO *et al.*, 1991). As principais proteínas encontradas em peçonhas de serpentes são enzimas, como esterases, fosfatases, fosfolipases, metaloproteases e nucleases (TU, 1977; IWANAGA e SUZUKI, 1979; ELLIOTT, 1978; BAILEY, 1998), primordialmente com funções de imobilização, morte e digestão da presa (MEBS, 1978; AIRD, 2002).

Toxinologia de *Bothrops alternatus*

A serpente *Bothrops alternatus* (DUMÉRIL, BIBRON e DUMÉRIL, 1854), conhecida popularmente como urutu, urutu-cruzeiro ou cruzeira, boicotiara, jararaca-de-agosto e víbora de la cruz, dentre outros (figura 1.1), é uma serpente encontrada predominantemente em áreas abertas, como campos, cerrados e brejos das regiões sul, sudeste e parte do centro-oeste do Brasil (figura 1.2), além da Argentina, Paraguai e Uruguai, (CAMPBELL e LAMAR, 2004). Possui hábito noturno e um tamanho médio

de 1,20 m, podendo alcançar até 1,70 m de comprimento quando adulta (BRASIL, 2001; MELGAREJO, 2003). A *B. alternatus* é uma espécie bastante agressiva e perigosa, e uma das maiores produtoras de peçonha do gênero, chegando a 380 mg de peçonha (BELLUOMINI, 1984), porém, sua toxinologia é menos estudada que a de *Bothrops jararaca*, que mais causa acidentes em humanos (BRASIL, 2001).

Como outras espécies do gênero *Bothrops*, a peçonha de *B. alternatus* contém variadas proteínas, algumas das quais já foram caracterizadas, como fosfolipases A₂ (NISENBOM *et al.*, 1986a,b, 1988; PONCE-SOTO *et al.*, 2007), uma enzima tipo trombina (balterobina; SMOLKA *et al.*, 1998), desintegrinas (alternagina-C; SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2005; Dis-Ba, RAMOS *et al.*, 2008), uma metaloproteinase (GAY *et al.*, 2005), uma L-amino ácido oxidase (STÁBELI *et al.*, 2004), um inibidor de trombina (botroalternina; CASTRO *et al.*, 1998) e uma fosfodiesterase (VALÉRIO *et al.*, 2002).

Os principais efeitos locais e sistêmicos observados em envenenamento por *B. alternatus* são edema, hemorragia e necrose (MARUNAK *et al.*, 1999) e se assemelham muito a outras peçonhas botrópicas (FAN e CARDOSO, 1995; GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000; FRANÇA e MÁLAQUE, 2003). Alguns dos efeitos locais da peçonha, especialmente o edema e a resposta inflamatória podem ser mediados por metaloproteinases (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000), pela formação de metabólitos do ácido araquidônico, liberado pela ação de fosfolipase A₂ da peçonha (NISENBOM *et al.*, 1986a,b, 1988) e posteriormente, convertidos em leucotrienos pela via lipoxigenase (FLORES *et al.*, 1993), ou pela liberação de mediadores endógenos como a bradicinina e a histamina (ROTHSCHILD e ROTHSCCHILD, 1979; ANTUNES *et al.*, 1989) e citocinas como o TNF- α (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1996).



Figura 1.1: *Bothrops alternatus* (urutu). Foto de Marcio Martins.

(fonte: http://eco.ib.usp.br/labvert/Jararaca/imagens/alternatus_foto7.htm)

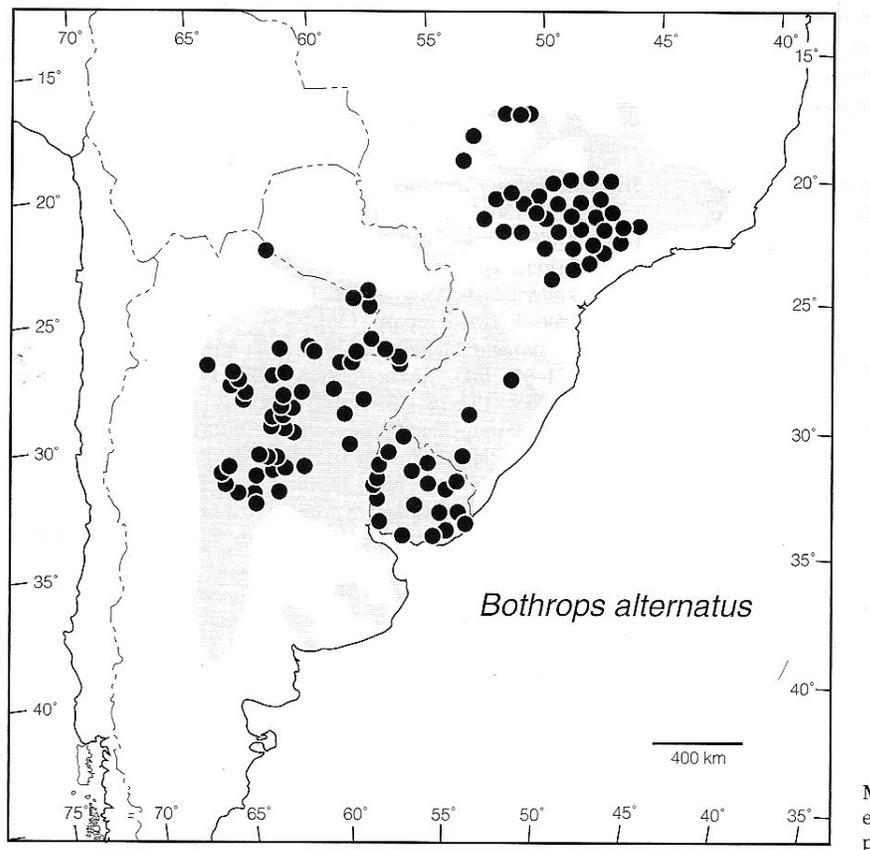


Figura 1.2: Distribuição geográfica de *Bothrops alternatus* na América do sul. (CAMPBELL e LAMAR, 2004).

Enzimas que atuam em ligações fosfatos e ácidos nucleicos

Dentre a diversidade de enzimas presentes em peçonhas de serpentes, existem as enzimas capazes de hidrolisar ácidos nucleicos e seus derivados, como os nucleotídeos (GEORGATSOS e LASKOWSKI, 1962; RICHARDS *et al.*, 1965; MACKESSY, 1998). Dentre estas enzimas, destacam-se as adenosina difosfatases (ADPases), adenosina trifosfatases (ATPases), monoesterases, 5'-nucleotidase, fosfodiesterases, endonucleases como as ribonucleases e as desoxirribonucleases

(DNases) (TAN e PONNUDURAI, 1991, 1992; SALES e SANTORO, 2007). Com exceção das fosfodiesterases, são poucos os trabalhos de caracterização destas enzimas (MACKESSY, 1998; AIRD, 2002).

A fosfodiesterase é a mais abundante das nucleases em peçonhas de serpentes e foi descrita inicialmente na década de 30 do século passado (GULLAND e JACKSON, 1938) e desde então tem sido purificada e caracterizada em peçonhas botrópicas (MACKESSY, 1998; AIRD, 2002; VALÉRIO *et al.*, 2002; SALES e SANTORO, 2007). Esta enzima é referida como uma exonuclease do tipo I (oligonucleotídeo 5'-nucleotidohidrolase, EC 3.1.4.1), e catalisa a hidrólise de ligações fosfodiéster de maneira progressiva, começando na região 3'-hidroxi-terminal (LASKOWSKI, 1971), e produzindo 5'-mononucleotídeos resultantes da hidrólise de oligonucleotídeos (UZAWA, 1932; GULLAND e JACKSON, 1938; BJÖRK, 1963; MACKESSY, 1998).

A ribonuclease (EC 3.1.27.5) é considerada uma endonuclease que cliva nucleosídeos 3'-fosfato e 3'-fosfooligonucleotídeos de moléculas de RNA. Esta enzima não apresenta preferência por bases e produz oligonucleotídeos de 2 a 5 bases, com terminal em 5'-fosfato (TABORDA *et al.*, 1952; AIRD, 2002). Em muitas peçonhas, a atividade inespecífica atribuída a ribonucleases é, na verdade, responsabilidade de fosfodiesterases (ELLIOTT, 1978; MACKESSY, 1998).

As monofosfatases representam uma família de enzimas não específicas que podem ser ácidas ou alcalinas e, em peçonhas ofídicas, tem sido relatada a atividade de fosfatases ácida e alcalina (TU e CHUA, 1966; ACOSTA *et al.*, 1993; SALES e SANTORO, 2007). A fosfatase ácida (fosfo-monoéster fosfohidrolase ácida, E.C.

3.1.3.2) possui um pH ótimo de atividade entre 4,0 e 5,0, e hidrolisa diversos substratos como *p*-nitrofenil fosfato, 2'-AMP, 3'-AMP, 5'-AMP e ATP. A fosfatase alcalina (fosfomonoéster fosfohidrolase, E.C. 3.2.3.1) é ativada por Ca^{2+} e Mg^{2+} e tem um pH ótimo de aproximadamente 9,5. Esta enzima pode hidrolisar 5'-AMP, 5'-dAMP, 3'-AMP, ribose-5-fosfato, ATP, flavina mononucleotídeo, nicotinamida mononucleotídeo e 5'-fosforilribose-1-pirofosfato (SUZUKI e IWANAGA, 1958a,b; SULKOWSKI *et al.*, 1963; FERNLEY, 1971; TU, 1977; ELLIOTT, 1978). Adenosina di e trifosfatases ou ADPase/ATPase (ATP difosfohidrolase 3.6.1.5) são enzimas que desfosforilam ADP ou ATP, formando orto ou pirofosfatos, em pH 8,4 (ELLIOTT, 1978).

A 5'-nucleotidase (5'-ribonucleotideo fosfohidrolase, EC 3.1.3.5) é uma fosfomonoesterase específica que hidrolisa o fosfato terminal de 5'-ribo ou desoxinucleotídeos. Sua massa molecular é de aproximadamente 100 kDa, e o pH ótimo é entre 6,5 e 7,0. A 5'-nucleotidase é a enzima mais ativa dentre as fosfatases (HEPEL e HILMOE, 1951; SINSHEIMER e KOERNER, 1952; SULKOWSKI *et al.*, 1963; TU, 1977; IWANAGA e SUZUKI, 1979).

A DNase I (endodesoxirribonuclease I, EC 3.1.21.1) é uma enzima que cliva 5'-fosfonucleotídeos e produtos de 5'-fosfooligonucleotídeos com preferência para DNA dupla fita, porém também age em DNA de fita simples e cromatina, em ligações fosfodiéster adjacentes a pirimidinas, liberando nucleotídeos com 3'-hidroxila livre. A DNase I é também conhecida como DNase alcalina por possuir pH ótimo de atividade entre 7,0 e 8,0 (KUNITZ, 1948; PRIVAT DE GARILHE e LASKOWSKI, 1955; LASKOWSKY, 1971).

A DNase II (endodesoxirribonuclease II, EC 3.1.22.1) é uma hidrolase específica que cliva os nucleosídeos 3'-fosfato e produtos de 3'-fosfooligonucleotídeos, com preferência para DNA de dupla fita, nativo ou desnaturado, liberando nucleotídeos 5'-hidroxila livre. Ela é também conhecida como DNase ácida. Esta enzima distingue-se da DNase I principalmente pelo pH ótimo de atividade dela ser ácido, entre 4,2 e 5,5 (HAESSLER e CUNNINGHAM, 1957; GEORGATSOS e LASKOWSKI, 1962; BERNARDI, 1966; WEIR, 1993; AIRD, 2002).

Alguns estudos verificaram a presença de diversas destas enzimas na peçonha da serpente *B. alternatus*, com altas atividades de fosfodiesterase, 5'-nucleotidase, ATPase e ADPase e baixa atividade de fosfatase alcalina (MEBS, 1970; VALÉRIO *et al.*, 2002; DE ROODT *et al.*, 2003; SALES e SANTORO, 2007). Tem sido sugerido que a presença de nucleotidasas e desidrogenases em peçonhas ofídicas estaria relacionada à imobilização e morte de presas. A figura 1.3 apresenta, de forma resumida, possíveis locais de atuação destas enzimas na liberação de purinas por peçonhas ofídicas (AIRD, 2002).

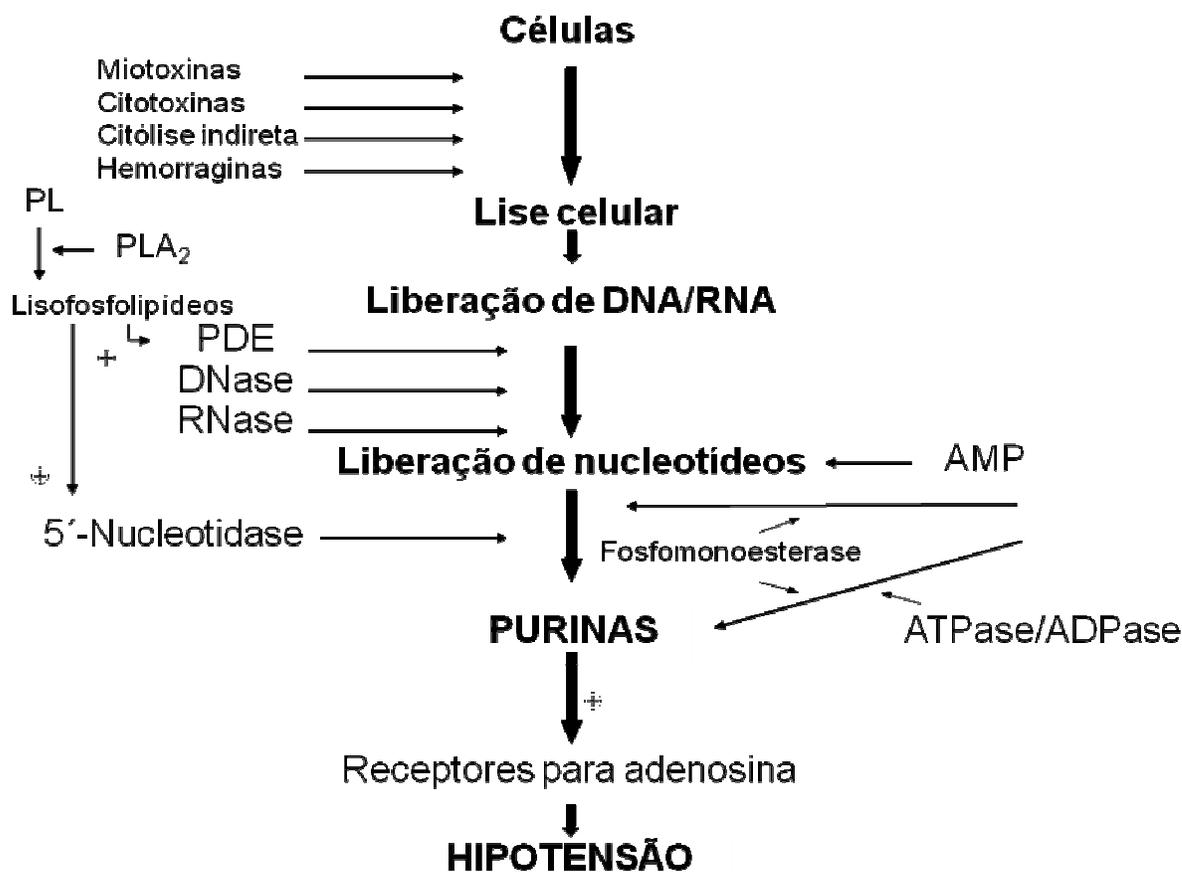


Figura 1.3: Possíveis locais de ação das enzimas de degradação de ácidos nucléicos na estratégia de imobilizar presas (modificado de AIRD, 2002). (+) – ativação. PDE – fosfodiesterase. PL – fosfolípidos.

OBJETIVOS

Considerando que: **(a)** vários estudos sobre DNase II em mamíferos têm mostrado o envolvimento destas enzimas na fragmentação de DNA em apoptose (BARRY e EASTMAN, 1993; GOTTLIEB *et al.*, 1995; TORRIGLIA *et al.*, 1998; COUNIS e TORRIGLIA, 2000), **(b)** peçonhas de serpentes, inclusive de espécies de *Bothrops*, contêm DNase II e **(c)** tem sido sugerido que esta enzima pode contribuir para alguns efeitos de peçonhas *in vivo* (AIRD, 2002), propomos, neste trabalho:

- (1)** Caracterizar os efeitos da peçonha de *B. alternatus* em células epiteliais renais MDCK.
- (2)** Purificar e caracterizar a DNase II da peçonha de *B. alternatus*.
- (3)** Avaliar a atividade pró-apoptótica desta enzima em células MDCK, comparando-a com DNases II de mamíferos.



CAPÍTULO 2

Avaliação da ação da peçonha de *Bothrops alternatus* em células epiteliais renais MDCK em cultura

INTRODUÇÃO

O envenenamento causado por serpentes do gênero *Bothrops* pode produzir uma variedade de efeitos locais (edema, dor, hemorragia, necrose) e sistêmicos (coagulopatia, hipotensão, insuficiência renal aguda e hemorragia sistêmica) (ROSENFELD, 1971; WATT, 1989; RUSSELL *et al.*, 1997; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2003; FRANÇA e MÁLAQUE, 2003; GUTIÉRREZ e OWNBY, 2003; WARREL, 2004), efeitos que são mediados por uma variedade de proteínas presentes nestas peçonhas, como metaloproteinases (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000) e fosfolipase A₂ miotóxica (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; GUTIÉRREZ e OWNBY, 2003), embora outras enzimas, como por exemplo, L-aminoácido oxidase (DU e CLEMETSON, 2002) e enzimas que afetam a cascata de coagulação (KAMIGUTI *et al.*, 1991; FRANÇA e MÁLAQUE, 2003) também possam estar envolvidas nestes processos.

A insuficiência renal aguda (IRA) é um dos mais importantes efeitos sistêmicos causados por peçonha de serpentes em humanos picados pelo gênero *Bothrops*. No Brasil, dentre as principais manifestações clínicas sistêmicas após acidentes botrópicos, pacientes que apresentam IRA correspondem a 1,4% a 1,6% dos casos (RIBEIRO e JORGE, 1997; BUCARETCHI *et al.*, 2001). Apesar da baixa freqüência de ocorrência

da IRA nos acidentes de modo geral, quando consideradas as causas de morte, a importância da IRA torna-se mais relevante, correspondendo a aproximadamente 79,1% dos casos (AMARAL *et al.*, 1986; JORGE e RIBEIRO, 1990; RIBEIRO *et al.*, 1998).

Diversos estudos *in vitro* (SERRA *et al.*, 1999; HAVT *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2004) e *in vivo* (REZENDE *et al.*, 1989; BURDMANN *et al.*, 1993; BOER-LIMA *et al.*, 1999, 2002; CRUZ-HÖFLING *et al.*, 2001) mostram que as peçonhas botrópicas exercem efeitos deletérios na função renal e sua morfologia. A etiologia da IRA induzida por *Bothrops* é multifatorial, e envolve vasoconstrição (com conseqüente isquemia renal), deposição de fibrina glomerular (REZENDE *et al.*, 1989), injúria vascular (BOER-LIMA *et al.*, 1999, 2002) e a liberação de substâncias vasoativas (HAVT *et al.*, 2001; CASTRO *et al.*, 2004), mediadas primariamente por proteases e PLA₂ (HAVT *et al.*, 2001; CRUZ-HÖFLING *et al.*, 2001; FRANÇA e MÁLAQUE, 2003). Muitos dos efeitos locais e sistêmicos de peçonhas botrópicas são produzidos por uma ação direta das toxinas destas peçonhas em células endoteliais e musculares (vascular e não-vascular) (LOMONTE *et al.*, 1994; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995, 2003; GUTIÉRREZ e OWNBY, 2003; HARRIS, 2003), porém poucos estudos têm avaliado os efeitos destas peçonhas em células renais em cultura (COLLARES-BUZATO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Conforme indicado na introdução geral (Capítulo 1), o envenenamento por *B. alternatus* produz alterações locais e sistêmicas características de outras espécies deste gênero (BAUAB *et al.*, 1994). OLIVEIRA *et al.* (2002) relataram que a peçonha

desta espécie é citotóxica às células renais Vero (macacos vervet) em cultura, mas não investigaram os mecanismos de ação envolvidos nesta citotoxicidade.

Neste capítulo descrevemos a citotoxicidade e as alterações morfológicas, incluindo a reorganização do citoesqueleto e redistribuição de algumas proteínas associadas às junções intercelulares induzidas pela peçonha de *B. alternatus* em células MDCK (**M**adin-**D**arby **c**anine **k**idney) em cultura. Estas células apresentam características morfológicas e funcionais semelhantes às células do túbulo coletor e/ou distal de mamíferos (VALENTICH, 1981).

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e peçonha

Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA, sal sódico), agarose, anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com FITC, anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com FITC, catalase, N^ω-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), superóxido dismutase, faloidina conjugada com TRITC, Tris base e Triton X-100 foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Marcadores de DNA 1 kb foram obtidos da Fermentas Inc. (Hannover, MD, EUA). DTT foi obtido da Amersham-GE (Piscataway, NJ, EUA). Anticorpos primários anti-occludina e anti-E-caderina foram adquiridos da Zymed (São Francisco, CA, EUA). Garrafas e placas de cultura estéreis foram obtidas da Nunc (Copenhague, Dinamarca), ou Corning (Corning, NY, EUA). Outros reagentes foram obtidos da Sigma ou Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) ou fornecedores locais.

A peçonha liofizada de *B. alternatus*, obtida por extração manual de espécimens adultas de ambos os sexos, foi obtida pelo Centro de Extração de Toxinas Animais (CETA, Morungaba, SP, Brasil).

Cultura de células

Células epiteliais renais de cão da linhagem Madin-Darby A (MDCK A) obtidas do Instituto Adolfo Lutz (passagens 78 a 80) foram cultivadas em frascos plásticos, com meio mínimo essencial de Eagle (MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10 mg/mL), e mantidas a 37°C

em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ em ar. As células foram passadas semanalmente após tratamento com tripsina (2,5 mg/mL) e 0,2% EDTA em solução balanceada sem Ca²⁺ e Mg²⁺. Para fins experimentais, as células foram semeadas em alta densidade (0,5 – 1,0 x 10⁶ células/cm²) em suportes para células em cultura contendo membranas de material inorgânico (área de 0,78 ou 4,9 cm²) (Anocell, Nunc) ou de tereftalato de polietileno (PET) recoberta com uma película de colágeno tipo I (área de 0,33 cm²) (BD Falcon, San Jose, CA, EUA) ou em placas com 6 e 96 poços (Corning) ou em *coverslips* de vidro (Kinitell). As monocamadas de células MDCK foram usadas três dias após a semeadura.

Incubação com a peçonha de *B. alternatus*

A peçonha de *B. alternatus* foi preparada imediatamente antes do uso em solução estoque em meio de cultura MEM e posteriormente diluída em uma concentração final de 10 e 100 µg/mL. A concentração de 10 µg/mL foi escolhida com base em experimentos preliminares que mostraram que 1 µg da peçonha/mL não causava dano às células no período de tempo de incubação utilizado neste trabalho, enquanto a concentração de 10 µg/mL causava algum dano à monocamada de células MDCK, o que estaria de acordo com outros trabalhos de peçonhas ofídicas *in vitro* (WILLINGER *et al.*, 1995; COLLARES-BUZATO *et al.*, 2002); uma concentração 10 vezes acima (100 µg/mL) foi utilizada para simular os elevados níveis de peçonha aos quais o rim pode ser exposto *in vivo*. A peçonha foi aplicada simultaneamente em ambas as superfícies (apical e basolateral) da monocamada de células MDCK nos

experimentos utilizando-se os suportes de células. As células controle receberam o mesmo volume de meio de cultura, porém sem conter a peçonha. Em alguns experimentos, as monocamadas foram pré-incubadas (30 min) com catalase (100 U/mL), superóxido dismutase (40 U/mL) ou *N*^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, um inibidor da óxido nítrico sintase, 1 mM), anteriormente à incubação com a peçonha com o intuito de se verificar o envolvimento de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), do ânion superóxido (O₂^{•-}) ou do óxido nítrico (NO[•]), respectivamente, na toxicidade da peçonha de *B. alternatus*.

Medida de resistência elétrica transepitelial

A resistência elétrica transepitelial (R_T) foi medida através das monocamadas crescidas nos suportes contendo as membranas Anocell ou Falcon (PT), utilizando-se dois eletrodos “*chopstick*” de Ag/AgCl acoplados a um voltímetro combinado à uma fonte de corrente constante (EVOM, World Precision Instruments, Hertfordshire, UK). Estes experimentos foram realizados para verificar se a peçonha alterava, de maneira concentração-dependente, a integridade da barreira epitelial. Ambas as superfícies das monocamadas foram expostas a concentrações de 10 ou 100 µg de peçonha/mL por um período de até sete horas.

Marcação de proteínas juncionais e F-actina

Citoquímica para F-actina

Para avaliar se a peçonha causava alterações na organização do citoesqueleto foi utilizada a metodologia de citoquímica para F-actina usando faloidina conjugada com TRITC (PETERSON *et al.*, 1990; COLLARES-BUZATO *et al.*, 1998). Para tal, células crescidas em suportes com membranas Anocell foram tratadas com peçonha de *B. alternatus* (10 ou 100 $\mu\text{g/mL}$) durante 1 ou 3 horas. Decorrido este tempo, as células foram lavadas em PBS, fixadas por 30 min em 4% de paraformaldeído em PBS, permeabilizadas com Triton X-100 0,1% (10 min) e incubadas com 1 μg do conjugado TRITC-faloidina/mL em PBS (Sigma). As membranas contendo as monocamadas marcadas foram, então, montadas com meio de glicerina/PBS (Sigma) sobre lâminas de vidro, cobertas com lamínula e seladas. As células foram examinadas por microscopia de varredura confocal a laser (CLSM; BioRad MRC 1024, BioRad, Richmond, VA, EUA). Algumas células marcadas com faloidina foram incubadas com DAPI para revelar a morfologia nuclear. Neste caso, as células foram visualizadas utilizando um microscópio convencional de fluorescência (Olympus BX60; Olympus, Hamburgo, Alemanha) acoplado a um sistema computadorizado de captura de imagens. Para fazer uma comparação adequada entre os grupos tratados com peçonha e o controle, a coloração e a análise microscópica de todos os grupos foram realizadas na mesma sessão experimental.

Imunocitoquímica para ocludina e E-caderina

Após exposição à peçonha de *B. alternatus* e medidas de R_T , as monocamadas crescidas em suportes, com membranas Anocell foram fixadas e marcadas para ocludina e E-caderina por técnica padrão de imunofluorescência indireta (COLLARES-BUZATO *et al.*, 1998). As células foram fixadas em metanol a -20°C , lavadas em PBS em seguida incubadas overnight com anticorpos anti-occludina ou com anti-E-caderina (diluições na tabela 2.1) em solução contendo 3% de soro eqüino. Após lavagens em PBS, as monocamadas foram incubadas, no escuro, por 2 h com anticorpo anti-IgG de rato ou anti-IgG de coelho (diluições na tabela 2.1) conjugado com FITC. As membranas contendo as monocamadas marcadas foram, então, montadas com meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) sobre lâminas de vidro, cobertas com lamínula e seladas. As células foram examinadas por microscopia de varredura confocal a laser (CLSM; BioRad MRC 1024, BioRad, Richmond, VA, EUA). Para comparação entre os grupos tratados com peçonha e o controle, a coloração e a análise microscópica de todos os grupos foram realizadas na mesma sessão experimental.

Tabela 2.1: Resumo dos anticorpos utilizados.

Anticorpo primário		
Proteína	E-caderina	occludina
Organismo alvo	Humano	Humano
Organismo hospedeiro	Coelho	Camundongo
Diluição	1:75	1:100
Origem	Zymed	Zymed
Anticorpo secundário		
Organismo alvo	Coelho	Camundongo
Organismo hospedeiro	Carneiro	Coelho
Diluição	1:75	1:75
Conjugado	FITC	FITC
Origem	Sigma	Sigma
Técnica	Imunocitoquímica	Imunocitoquímica

Viabilidade celular

Incorporação de vermelho neutro

A citotoxicidade da peçonha foi avaliada pelo método da coloração por vermelho neutro (BORENFREUND e PUERNER, 1984). As células foram cultivadas em placas de 96 poços. Após exposição à peçonha (10 ou 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 μl finais) por um período variável entre 30 minutos e 3 horas, o meio foi removido, e foram adicionados a cada poço 200 μl de MEM contendo 50 μg de vermelho neutro/ mL , e as placas foram incubadas a 37°C durante 3 horas. O meio contendo o corante foi removido e os poços foram lavados uma vez por 2-3 minutos com formol-cálcio (40% de formaldeído, v/v, e 10% de cloreto de cálcio, p/p) para remover corante não incorporado. Finalmente, 200 μl de ácido acético/50% etanol (1:100, v/v) foram adicionados a cada poço durante 15 minutos à temperatura ambiente e, então, a placa foi lida a 540 nm em um leitor de

microplacas SpectraMax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). A viabilidade foi determinada comparando as absorbâncias resultantes com a média de absorbância dos poços contendo células controle (sem tratamento com a peçonha, considerado 100% de viabilidade).

Ensaio MTT

A viabilidade celular também foi avaliada pelo ensaio de MTT (brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio) nas mesmas condições descritas para o ensaio de vermelho neutro. Após lavar com PBS, as células foram incubadas com 0,5 mg de MTT/mL por 3 h à 37°C. Os cristais de formazan, resultado da redução de MTT, foram dissolvidos pela adição de etanol absoluto a cada poço seguido da incubação por 5 min e, então, a placa foi lida a 570 nm em um leitor de microplacas SpectraMax 340. A viabilidade foi determinada comparando as absorbâncias resultantes com a média de absorbância dos poços contendo células controle.

Produção de H₂O₂

As células MDCK foram tratadas com a peçonha de *B. alternatus* (10 µg/mL ou 100 µg/mL) contendo ou não pré-tratamento com catalase (100 U/mL) em meio MEM fornecido sem vermelho de fenol. Alíquotas (100 µL) foram coletadas em diversos intervalos de tempo e a quantidade de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) presente foi determinada utilizando um ensaio contendo 0,25 µM de *horseradish* peroxidase e 0,4 µM de *o*-dianisidina (ANDE *et al.*, 2006). A absorbância resultante foi lida a 530 nm em

um leitor de microplacas SpectraMax 340 e os níveis de H₂O₂ foram calculados a partir de uma curva padrão de H₂O₂.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Células MDCK foram crescidas em membranas PT cobertos com colágeno tipo I (BD Falcon). Após tratamento com a peçonha de *B. alternatus* (10 µg/mL ou 100 µg/mL), foram fixadas em 2,5% de formaldeído contendo 0,06% de ácido pícrico e 2,5% de glutaraldeído em 200 mM de tampão cacodilato, pH 7,4, por pelo menos uma hora. As monocamadas foram então lavadas com tampão cacodilato, pós-fixadas em uma solução aquosa de OsO₄ a 4°C no escuro por uma hora e desidratadas através de uma série de concentrações de etanol, anteriormente à secagem de ponto crítico utilizando CO₂ líquido (CPD 030, Balzers, Oberkochen, Alemanha). Finalmente, as monocamadas foram montadas em suportes de metal com fita adesiva dupla-face e cobertas com ouro utilizando um *sputter coater* (SCD 050, Balzers, Oberkochen, Alemanha) antes de serem examinadas com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura JEOL 5800 LV (Jeol, Tóquio, Japão) operado em uma voltagem de aceleração de 0,3-30 kV.

Microscopia de luz

Células MDCK A foram cultivadas em *coverslips* de vidro (1,33 cm²) para avaliar a ação da peçonha de *B. alternatus* na morfologia dos núcleos celulares. Após tratamento com peçonha (10 ou 100 µg/mL) durante 1 a 3 horas, as células foram

lavadas em PBS e fixadas em etanol/ácido acético (3:1), e em seguida foi realizada a reação de Feulgen. Para tal, as células foram hidrolisadas com uma solução de 4 N de HCl durante 75 minutos, lavadas e tratadas com reativo de Schiff (0,5% de fucsina básica, 5% de 1N HCl, 0,5% de metabissulfito de sódio, 1% de carvão ativado e filtrado) por 40 min. Os *coverslips* foram, então, montados em meio de montagem sobre lâminas de vidro e selados, para análise em microscopia de luz. Para a análise morfométrica dos núcleos das células, as imagens de cinco regiões de cada monocamada foram capturadas por um sistema digital de imagens (CoolSnap, Media Cybernetics, Bethesda, EUA). Nas imagens foi avaliado o número de núcleos de acordo com os seguintes critérios: núcleos normais – formato elíptico com cromatina geralmente dispersa e frouxa, presença de nucléolo, que se apresenta em coloração negativa; núcleos mitóticos – núcleos em diferentes fases de divisão celular, característicos da mitose; e núcleos alterados – núcleos picnóticos ou com diferentes níveis de compactação da cromatina ou núcleos fragmentados.

Avaliação de apoptose com Anexina V–FITC

A apoptose foi avaliada utilizando-se o ensaio de detecção da anexina V usando o kit TACS™ Annexin V-FITC. As células MDCK foram tratadas com a peçonha de *B. alternatus* por 3 e 24 horas. Após o tratamento, o meio foi coletado e centrifugado a 500 x g por 10 min para coletar células em suspensão. As células aderidas à placa foram lavadas em PBS três vezes e tripsinizadas (2,5 g de tripsina/L em solução contendo 0,02% de EDTA) para destacá-las da placa. Estas células foram adicionadas

às anteriores e centrifugadas a 500 x *g* por 10 min. As células foram analisadas de acordo com o protocolo do fabricante usando um citômetro de fluxo FACSCanto™ (BD Biosciences) e o software FACSDiva™ (BD Biosciences).

Fragmentação de DNA e eletroforese em gel de agarose

Células MDCK A, cultivadas em placas com 6 poços, foram tratadas com peçonha de *B. alternatus* (10 ou 100 µg/mL) durante 1, 3, 6 e 24 horas a 37°C. A fragmentação de DNA foi avaliada após obtenção do DNA com o kit de extração EZ-DNA (Biosystems, Curitiba, PR, Brasil). Após remover o meio, as células foram lisadas diretamente na placa com 1 mL de solução EZ-DNA/poço, raspadas e, então, transferidas para um tubo de centrifuga tipo *Eppendorff*, onde ficaram incubadas durante 5 min à temperatura ambiente. Decorrido o tempo, adicionou-se 500 µL de etanol absoluto, e as amostras foram misturadas por inversão dos tubos seguido por descanso de 3 min à temperatura ambiente. Após centrifugação (13.000 x *g*, 10 min), o precipitado foi lavado três vezes com etanol 95% e, então, centrifugado novamente. Ao final, o etanol foi removido e o DNA secado ao ar. Antes da corrida em gel de agarose 1,2% em tampão TBE (90 mM Tris-borato, pH 8,0, contendo 4 mM EDTA), as amostras de DNA foram hidratadas com 100 µL de H₂O MilliQ por pelo menos 2 h. Padrões de DNA (ladder de 1 kb) foram corridas simultaneamente com as amostras. O gel foi corado com brometo de etídio (1 µg/mL) e as bandas visualizadas em luz UV e documentados (sistema de fotodocumentação da BioRad).

Análise estatística

Quando conveniente, os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP) do número de experimentos indicado. Os dados foram comparados estatisticamente usando o teste *t* de Student para comparar duas concentrações dentro do mesmo período de tempo, ou o teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey, para comparar os grupos tratados e seus respectivos controles ao longo dos experimentos. Um valor de $p < 0,05$ indicou significância.

RESULTADOS

O teste de citotoxicidade por incorporação de vermelho neutro mostrou que a incubação com a peçonha de *B. alternatus* a 10 e 100 µg de peçonha/mL reduziu a viabilidade celular em $25,5 \pm 7\%$ e $43,4 \pm 12\%$ após 1 h, respectivamente, e $65,3 \pm 7\%$ e $85,4 \pm 10\%$, respectivamente, após 3 h de tratamento (figura 2.1a). Após 24 h de tratamento a peçonha de *B. alternatus* (10 µg de peçonha/mL) reduziu a viabilidade celular em $77,5\% \pm 18\%$, enquanto que com a concentração de 100 µg de peçonha/mL, as células não estavam mais viáveis com 6 h. O vermelho neutro é um corante solúvel em água e que passa através da membrana plasmática e se concentra nos lisossomos de células vivas onde se fixa por ligações eletrostáticas nos sítios aniônicos da matriz lisossomal. Estes dados foram também confirmados com a utilização de outra metodologia para viabilidade ou citotoxicidade celular, o teste da redução de MTT (figura 2.1b). Este método baseia-se na medida da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, a qual, se ativa, é capaz de metabolizar o reagente MTT em um composto colorido denominado formazan. Estes dados indicam que a peçonha de *B. alternatus* é citotóxica em células MDCK em cultura.

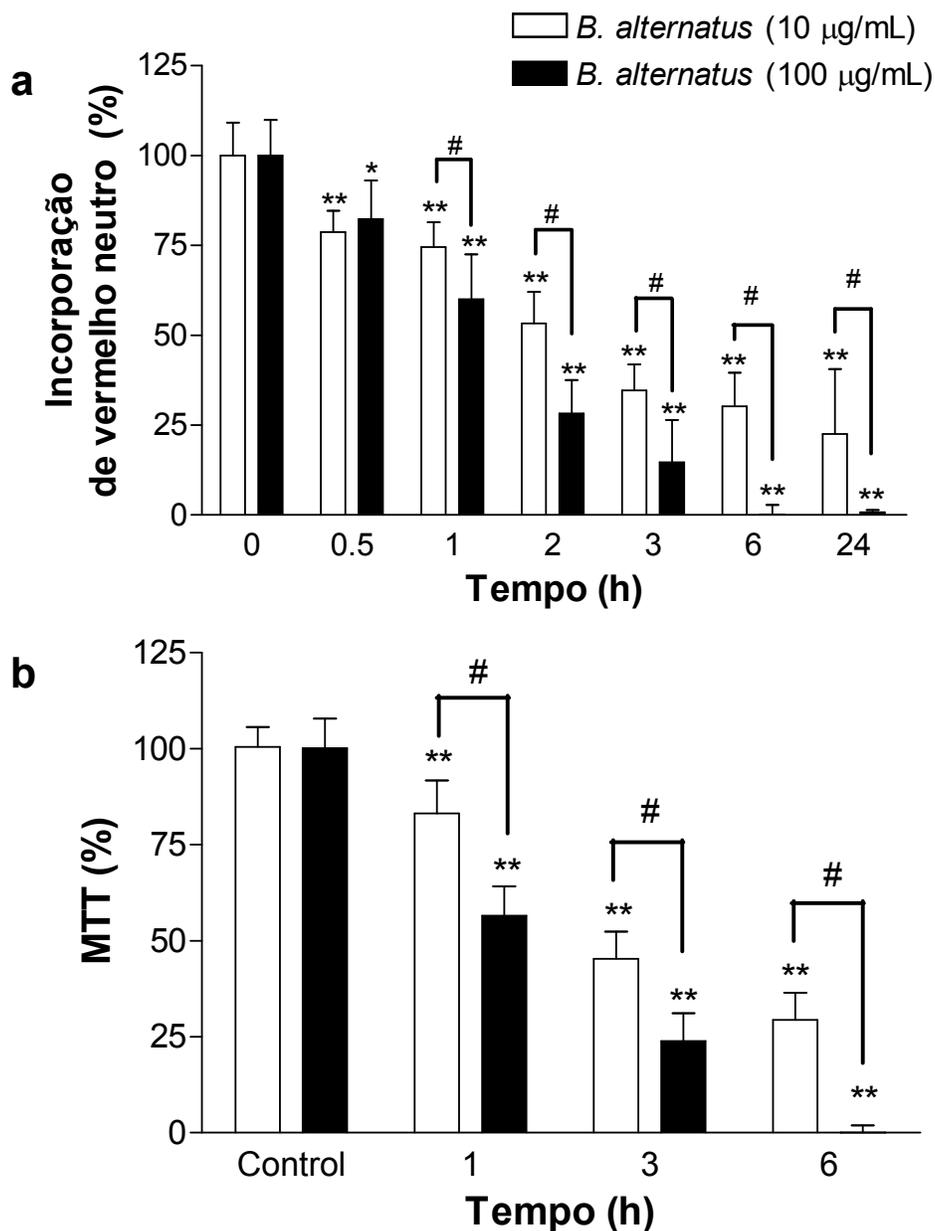


Figura 2.1: Viabilidade das células MDCK após tratamento com a peçonha de *B. alternatus*. A viabilidade celular foi avaliada pelos ensaios de (a) vermelho neutro e (b) MTT. Em ambos os casos, os resultados foram expressos relativamente às células controle, consideradas como 100% de viabilidade. As colunas representam a média + DP de 12 monocamadas por grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparada ao grupo controle (ANOVA seguido do teste Tukey). # $p < 0,05$ entre os tratamentos com peçonha no mesmo período de tempo (teste *t* de Student's).

A medida de resistência transepitelial (R_T) é freqüentemente utilizada para investigar a integridade das junções célula-a-célula e célula-matriz (COLLARES-BUZATO *et al.*, 1994; LO *et al.*, 1999; COLLARES-BUZATO *et al.*, 2002). Foi avaliada a capacidade da peçonha de *B. alternatus* de alterar a integridade da barreira epitelial medindo-se a R_T das células MDCK crescidas em membranas permeáveis seguida da incubação com a peçonha. A figura 2.2 mostra que a incubação da peçonha de *B. alternatus* reduziu significativamente a R_T das monocamadas de células MDCK de 365,0 para 52,6 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ($p < 0,05$) após 2 h, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, chegando a zero após 4 h de tratamento. Na concentração de 10 μg de peçonha/mL, a R_T diminuiu significativamente somente após 6 h de tratamento (figura 2.2).

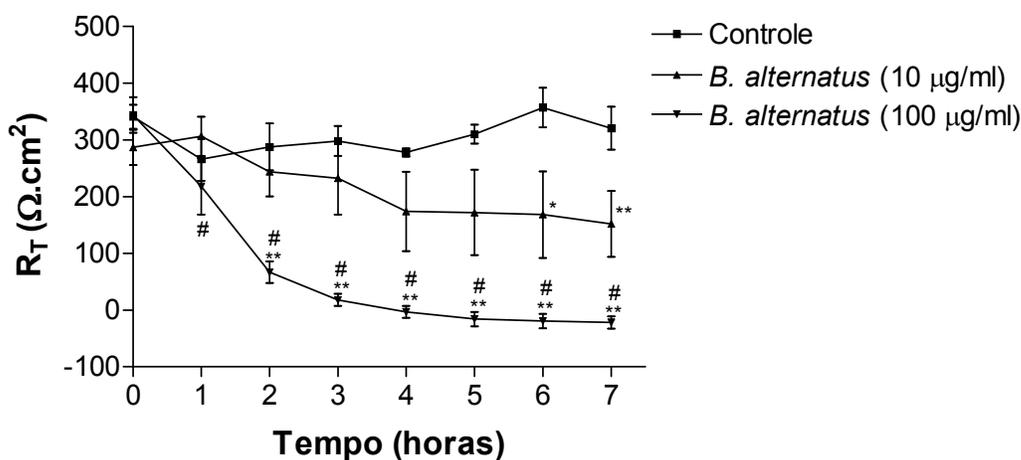


Figura 2.2: Redução da resistência elétrica transepitelial (R_T) através das monocamadas de MDCK após incubação com peçonha de *B. alternatus*. O grupo controle permaneceu em meio de cultura pelo mesmo período de tempo que os grupos tratados com 10 e 100 μg de peçonha/mL. Todos os dados são correspondentes a cinco monocamadas por grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em comparação com o controle e # $p < 0,01$ em comparação com o valor inicial de R_T (ANOVA seguido de teste de Tukey).

Em comparação às células controle, a incubação das células MDCK com 100 µg de peçonha de *B. alternatus*/mL causou a desestruturação do anel perijuncional de actina (figura 2.3f, setas), conforme indicado pela marcação de F-actina pela faloidina já a partir de 1 h de tratamento. Essa alteração do citoesqueleto foi mais evidente quando as células foram tratadas por 3 h com a peçonha (figura 2.4f, setas). Nas células controle (figuras 2.3d e 2.4d) o anel perijuncional de actina permaneceu contínuo, e se organizou ao longo de toda membrana lateral, enquanto que a actina filamentosa na região basal da célula estava organizada na forma de fibras, denominadas fibras de estresse (figura 2.3g e 2.4g, setas) dispostas preferencialmente paralelas umas às outras. No tratamento com 10 µg de peçonha/mL foram observadas as seguintes alterações do citoesqueleto: 1) condensação dos microfilamentos associados ao anel perijuncional de actina em algumas regiões de contato intercelular (figura 2.3e e 2.4e, setas), e 2) uma pequena desestruturação das fibras de estresse na superfície basal, após 1 h (figura 2.3h, setas) e 3 h (figura 2.4h, setas), com fibras mais curtas e desorganizadas em relação à monocamada controle. No tratamento com 100 µg de peçonha/mL, ocorreram alterações marcantes na distribuição da F-actina em todas as regiões celulares (figura 2.4f e 2.4i, setas), e uma diminuição significativa no número de microvilosidades, conforme comprovado pela diminuição da marcação com faloidina na membrana apical (figura 2.4c). Estas modificações, em geral, foram menos pronunciadas com a concentração de 10 µg/mL, porém mais evidentes no tratamento mais prolongado de 3 h, assim como com a concentração de 100 µg/mL.

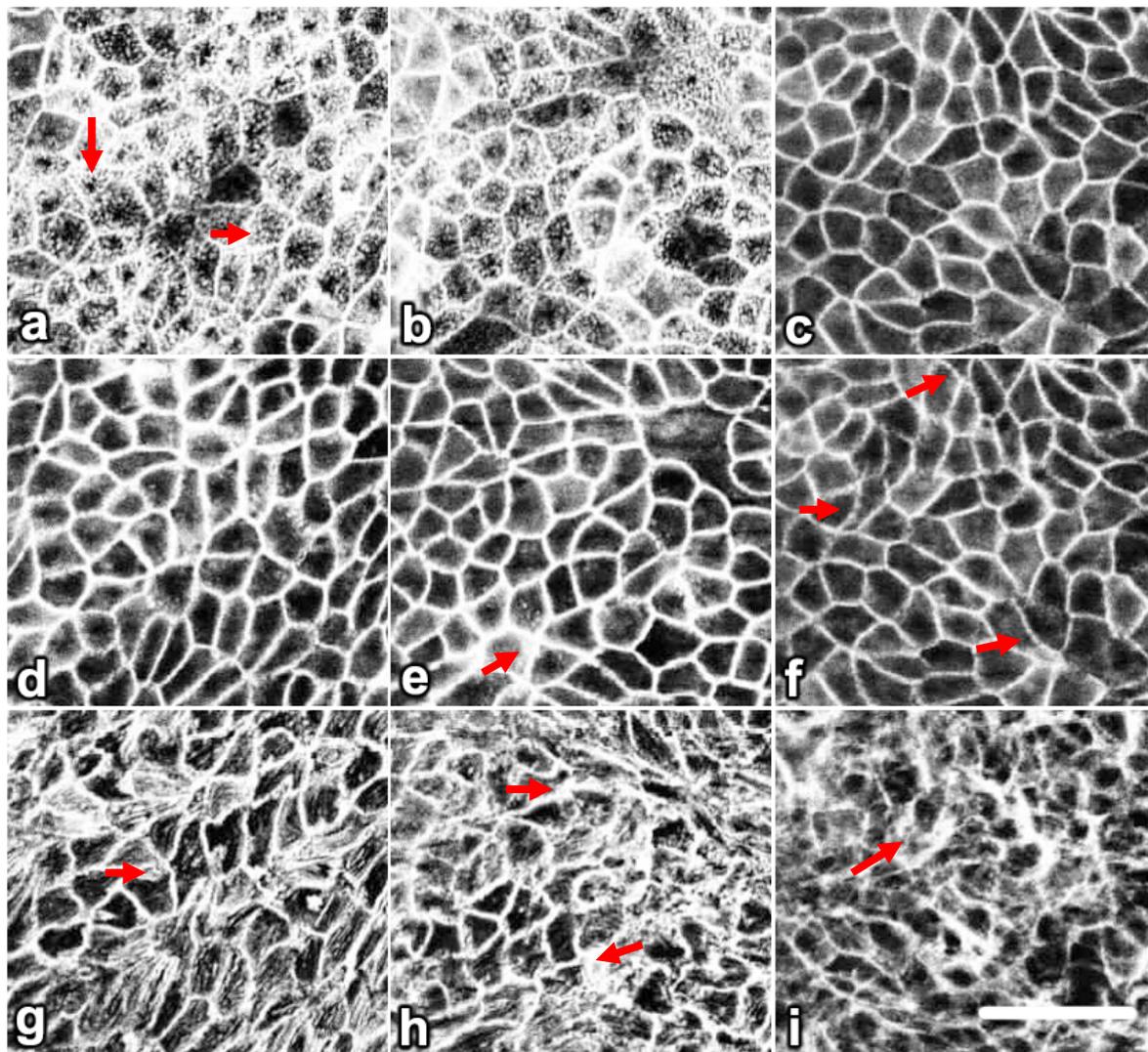


Figura 2.3: Rearranjo do citoesqueleto em células MDCK após tratamento com peçonha de *B. alternatus*. As monocamadas de MDCK foram expostas a 10 (b,e,h) e 100 (c,f,i) μg de peçonha/mL de meio de cultura durante 1 h. O grupo controle permaneceu em meio de cultura pelo mesmo período de tempo (a,d,g). Cada quadro representa uma imagem confocal de um corte óptico (X-Y) obtido com a mesma sensibilidade do microscópio confocal da região apical (a,b,c), mediana (d,e,f) e basal (g,h,i) da monocamada. As setas apontam as estruturas citadas no texto. A barra representa 50 μm .

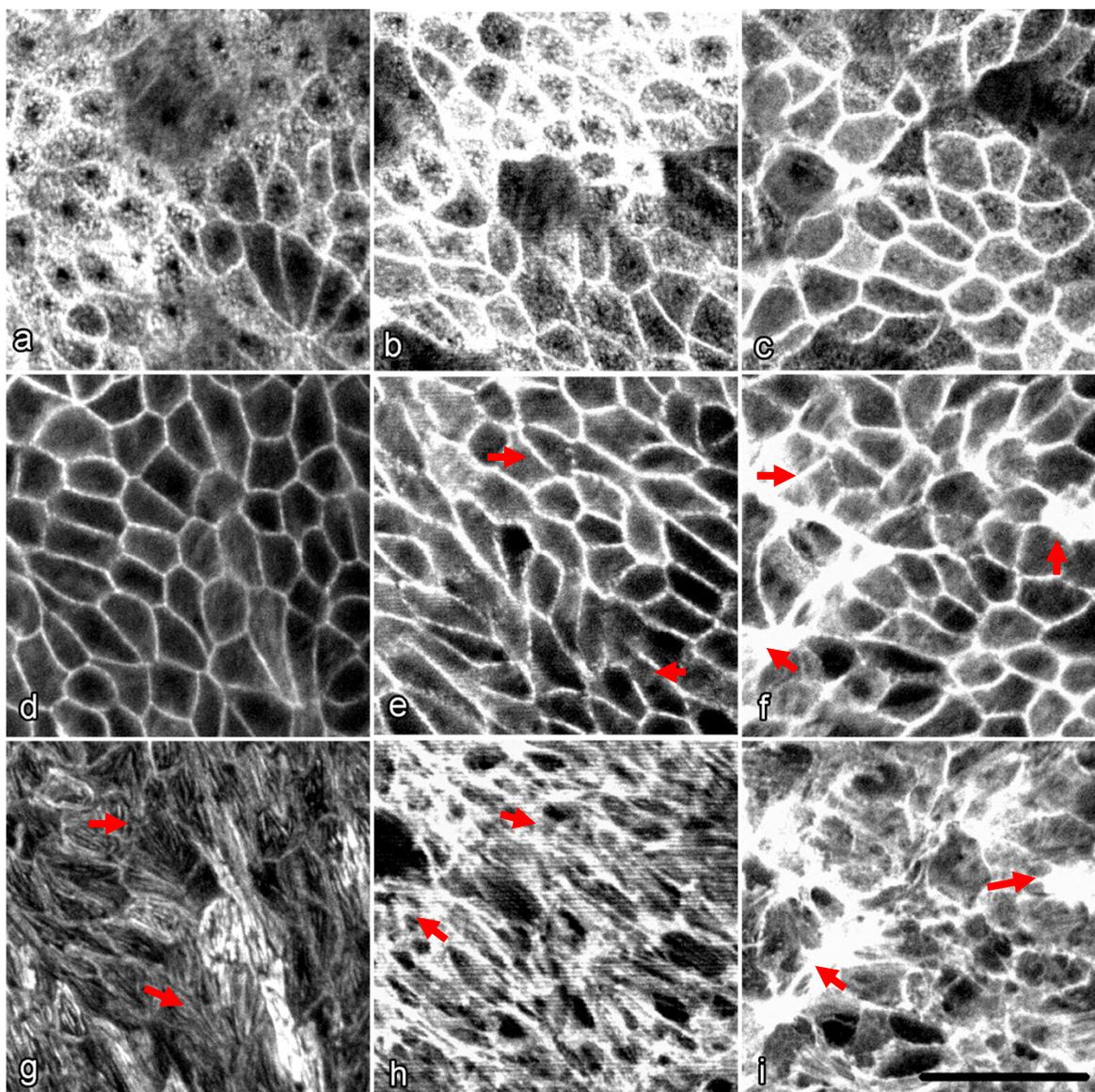


Figura 2.4: Rearranjo do citoesqueleto em células MDCK após tratamento com peçonha de *B. alternatus*. As monocamadas de MDCK foram expostas a 10 (b,e,h) e 100 (c,f,i) μg de peçonha/mL de meio de cultura durante 3 h. O grupo controle permaneceu em meio de cultura pelo mesmo período de tempo (a,d,g). Cada quadro representa uma imagem confocal de um corte óptico (X-Y) obtido com a mesma sensibilidade do microscópio confocal da região apical (a,b,c), mediana (d,e,f) e basal (g,h,i) da monocamada. As setas apontam as estruturas citadas no texto. A barra representa 50 μm .

Além da reorganização do citoesqueleto causada pela peçonha, observamos também alterações na distribuição de algumas proteínas associadas às junções celulares. A imunocitoquímica da ocludina, uma proteína estrutural da junção de oclusão, revelou uma marcação intercelular ligeiramente mais fraca e difusa nas células tratadas com 10 e 100 μg de peçonha/mL, após 3 h, em comparação com as células controle. Adicionalmente, uma acumulação focal desta proteína pôde ser vista em algumas áreas de contato entre as células tratadas (figura 2.5b,c, setas em vermelho), particularmente no tratamento com 100 μg de peçonha/mL (figura 2.5c). A distribuição da proteína de junção aderente a E-caderina foi modificada de modo semelhante à ocludina, após 3 h de exposição à peçonha. As células MDCK controle mostraram uma intensa marcação para E-caderina da membrana, nos sítios de contato intercelular. Em contraste, as células tratadas com a maior concentração de peçonha (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mostraram uma marcação juncional para E-caderina menos evidente e mais difusa, com uma acumulação focal desta proteína em algumas áreas da membrana (figura 2.5f, setas vermelhas) e citoplasma (figura 2.5f, setas amarelas).

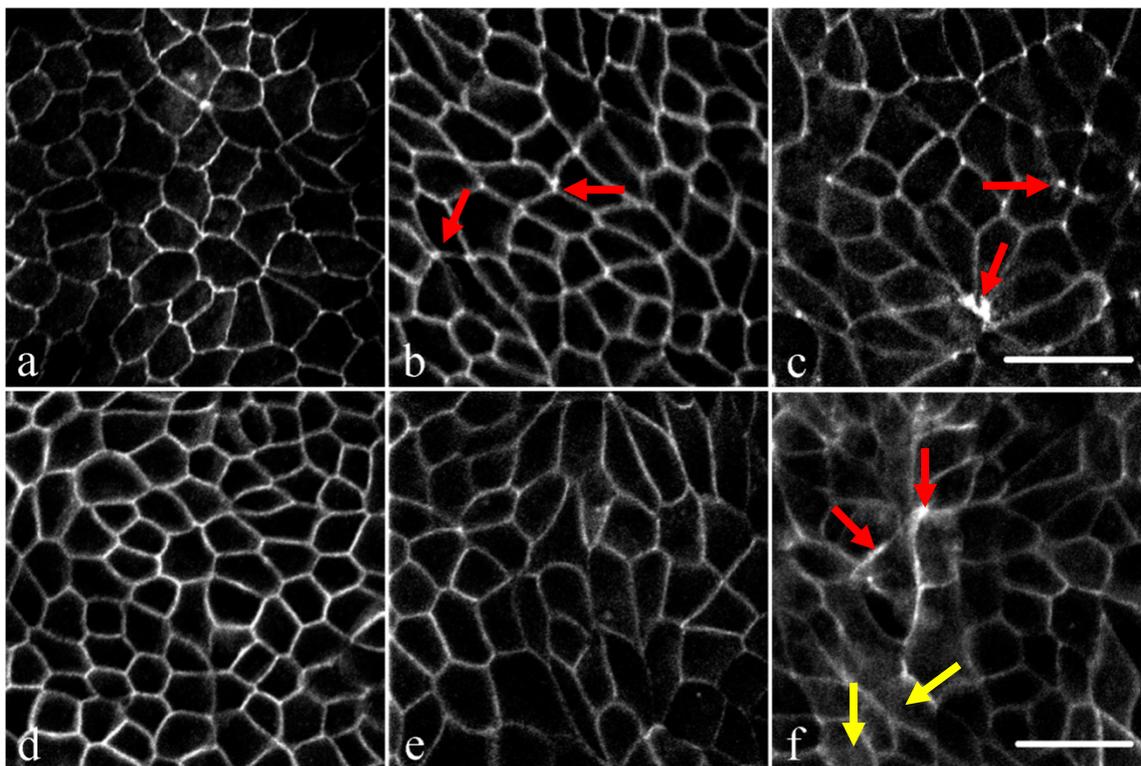


Figura 2.5: Distribuição celular das junções celulares, ocludina e E-caderina, em monocamadas de células MDCK incubadas com a peçonha de *B. alternatus*. As células foram tratadas com 10 μg (b,e) e 100 μg (c,f) de peçonha/mL de meio de cultura por 3 h. Cada quadro representa uma imagem confocal de um corte óptico (X-Y) obtido com a mesma sensibilidade do microscópio confocal. Os grupos controle (a,d) foram mantido em meio de cultura durante o mesmo período de tempo. Occludina (a-c) e E-caderina (d-f) estão mostradas. As setas apontam acúmulo focal de proteína na membrana (vermelhas) e no citoplasma (brancas). Barras = 25 μm .

Para investigarmos as possíveis alterações morfológicas celulares e/ou nucleares induzidas pela peçonha de *B. alternatus*, as células MDCK foram crescidas em *coverslips* de vidro e coradas com azul de toluidina (figura 2.6) ou pela reação de Feulgen (figura 2.7). As alterações morfológicas observadas com a coloração de azul de toluidina foram as seguintes: 1) vacuolação do citoplasma (figura 2.6d), e 2) modificações no formato das células, passando de um formato poligonal típico das

células normais (figura 2.6a,b) para um formato arredondado, fusiforme ou irregular (figura 2.6c-f, indicado por setas pretas). As alterações de núcleo das células tratadas com a peçonha e reveladas pelas colorações de azul de toluidina e reação de Feulgen incluem: diferentes níveis de condensação da cromatina (figuras 2.6e, seta preta, figura 2.7f), picnose (figura 2.7f, seta preta), e fragmentação nuclear (figura 2.6f, seta vermelha e figura 2.7d-f, setas vermelhas e imagem inserida). A peçonha de *B. alternatus* (10 e 100 µg/mL) parece ter um efeito citostático sobre as células MDCK após 1 h de tratamento, com uma marcada redução ($p < 0,001$) no número de núcleos mitóticos (figura 2.8b); este efeito foi mantido após 3 h. Nas células controle (figura 2.7a,b, e imagens inseridas) houve um maior número de núcleos em divisão. Ambas as concentrações de peçonha causaram um aumento tempo-dependente no número de células com alterações morfológicas (figura 2.8a) e nucleares (figura 2.8b), indicativo de um efeito citotóxico.

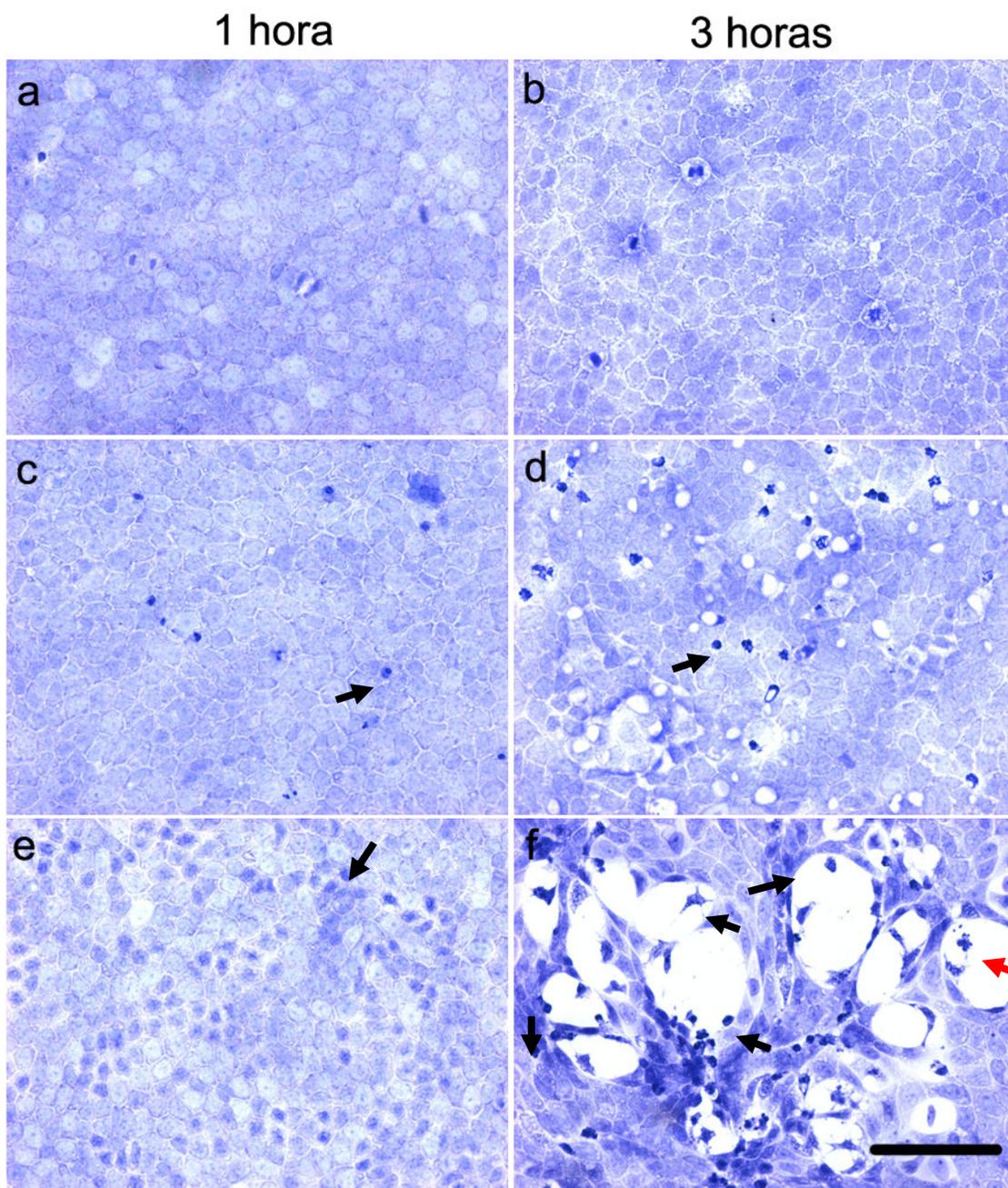


Figura 2.6: Células MDCK coradas com azul de toluidina. As monocamadas crescidas em coverslips foram expostas a 10 (c,d) ou 100 (e,f) μg da peçonha/mL de meio de cultura completo durante 1 ou 3 h. As células controle (a,b) permaneceram em meio de cultura completo pelo período de tratamento. Cada quadro é representativo de um dos campos obtidos por microscopia de luz nos diferentes tratamentos. As setas apontam estruturas citadas no texto. Barra = 50 μm .

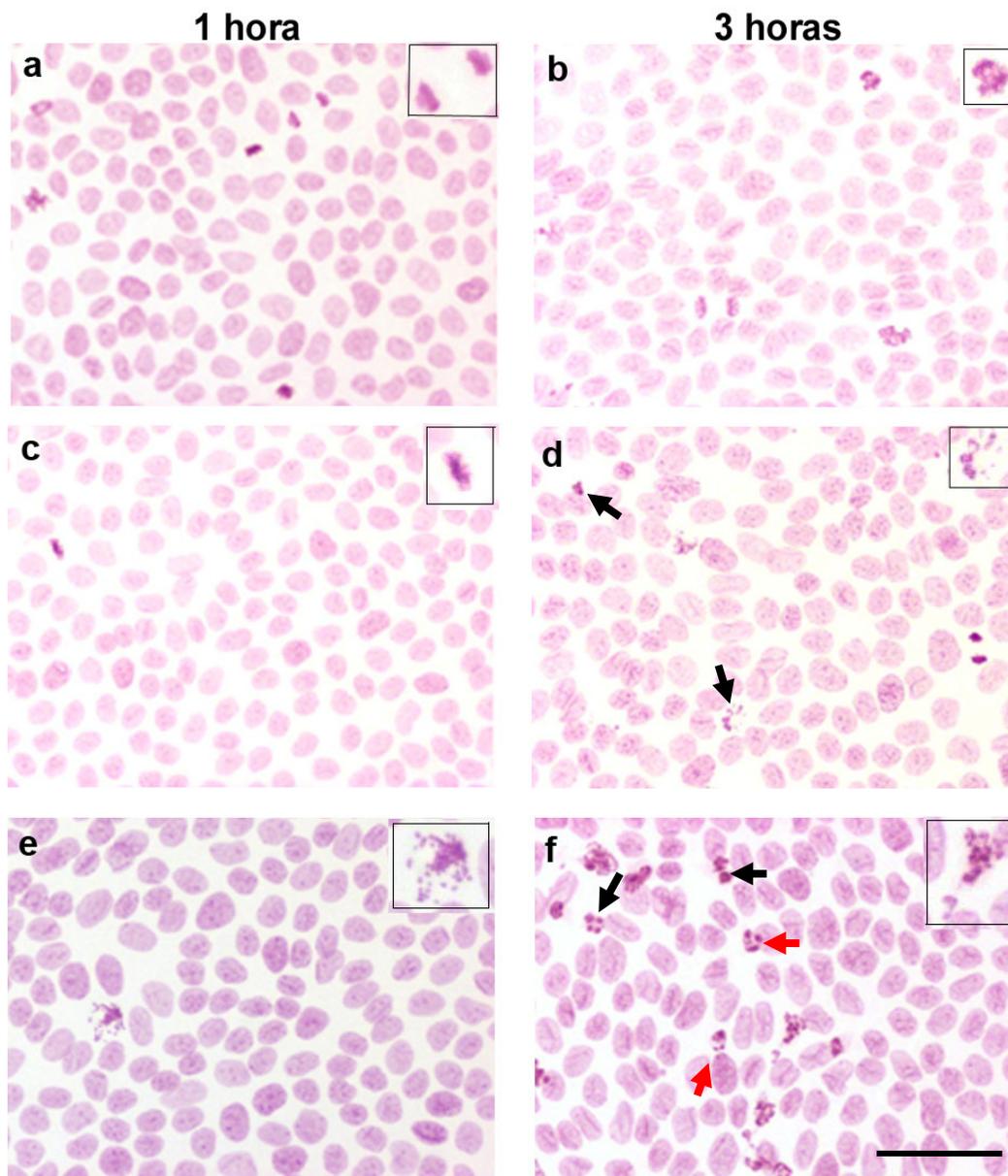


Figura 2.7: Células MDCK coradas pela reação de Feulgen. As monocamadas crescidas em coverslips foram expostas a 10 (c - 1h, d - 3h) ou 100 (e - 1h, f - 3h) μg da peçonha/mL de meio de cultura completo durante 1 ou 3 h. As células controle (a - 1 h, b - 3 h) permaneceram em meio de cultura completo pelo período de tratamento. Cada quadro é representativo de um dos campos obtidos por microscopia de luz nos diferentes tratamentos. Em destaque (aumento de 2x), algumas células do quadro maior. As setas apontam estruturas citadas no texto. Barra = 50 μm .

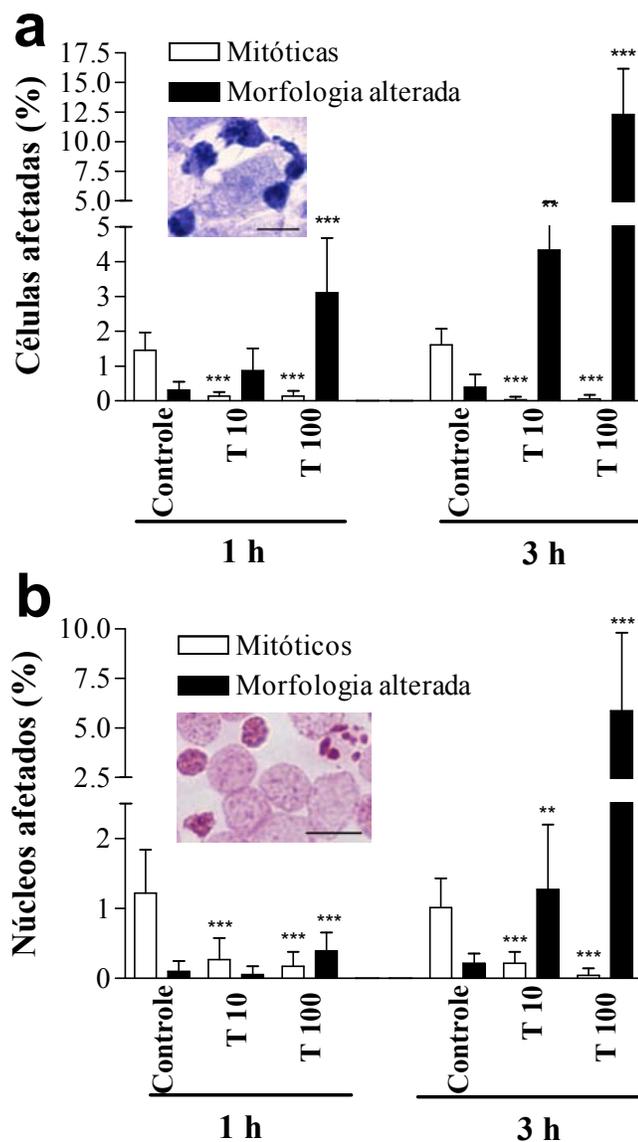


Figura 2.8: Análise morfométrica de células MDCK tratadas com peçonha de *B. alternatus* e coradas com (a) azul de toluidina para detectar alterações na morfologia celular e (b) reação de Feulgen para detectar mudanças na morfologia nuclear. As proporções de células e núcleos mitóticos e alterados estão expressas como porcentagem dos controles. As colunas representam a média + DP de 10 (3 h) e 20 (1 h) campos microscópicos examinados por tratamento. As imagens inseridas são fotomicrografias representativas de monocamadas de células MDCK, mostrando as células alteradas (a) e núcleos de morfologia atípica (b). Barras = 10 μ m.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) das células MDCK tratadas com a peçonha de *B. alternatus* revelou alterações gerais na morfologia celular, como a aquisição de um formato fusiforme ou arredondado, e separação das células vizinhas (figura 2.9c), além da perda de microvilosidades na superfície apical celular (figura 2.9b). Estes resultados corroboraram as modificações vistas com microscopia de luz e a marcação com faloidina. A figura 2.9 também mostra que as células tratadas com 100 µg de peçonha/mL perderam contato com as células vizinhas, como comprovado pelos espaços intercelulares que surgiram com o tratamento. Embora esta maior perda de contato possa ter sido causada pelo processamento para a MEV, parece improvável que isto tenha acontecido já que este efeito não é observado nas células controle ou mesmo nas células tratadas com 10 µg de peçonha/mL.

Para verificar se as alterações nucleares observadas com a microscopia de luz foram acompanhadas por modificações na organização do citoesqueleto, algumas monocamadas de MDCK foram duplamente marcadas com o conjugado TRITC-faloidina e DAPI. Conforme mostra a figura 2.10, as células com núcleos picnóticos também apresentaram o citoesqueleto mais alterado, caracterizado principalmente pela marcação mais difusa no anel perijuncional de actina menos evidente e áreas com condensação dos microfilamentos.

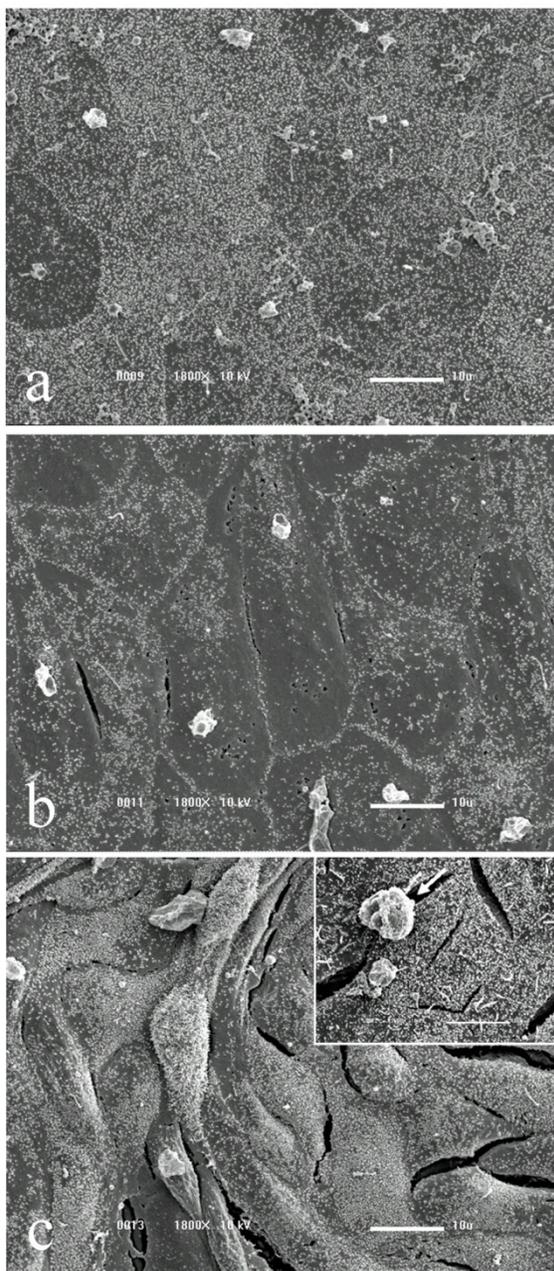


Figura 2.9: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das monocamadas de MDCK em cultura. (a) Células controle, (b) e (c) células tratada com 10 µg e 100 µg de peçonha de *B. alternatus* peçonha/mL, respectivamente. Imagem em detalhe: grupos de células arredondadas destacadas da monocamada (seta). Barras = 10 µm.

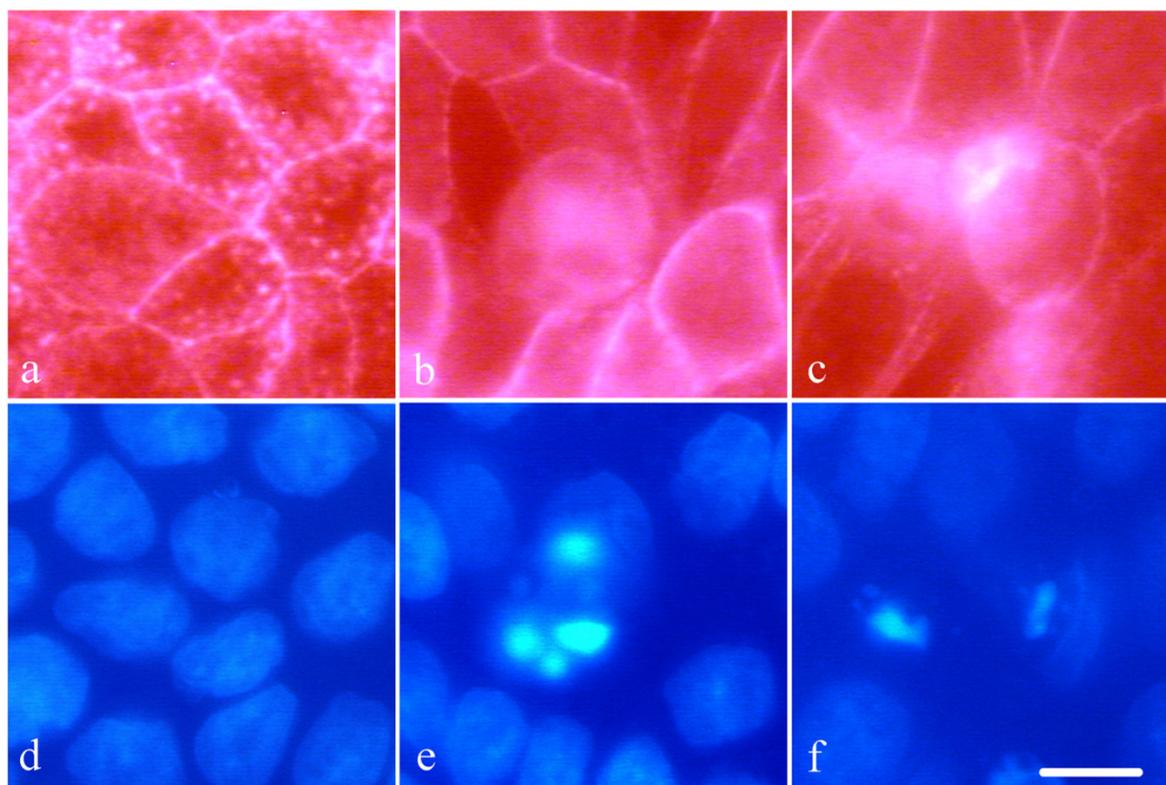


Figura 2.10: Dupla marcação das células MDCK com faloidina e DAPI, após tratamento com a peçonha de *B. alternatus* (10 ou 100 µg/mL) por 3 h. (a) e (d), controles. (b) e (e), 10 µg de peçonha/mL. (c) e (f), 100 µg de peçonha/mL. A dupla marcação com faloidina (a-c) e DAPI (d-f) mostra que o rearranjo de citoesqueleto acompanhou as modificações morfológicas da cromatina após incubação com a peçonha. Barras = 20 µm.

As modificações nucleares mostradas pela reação de Feulgen e a marcação com DAPI não foram suficientes para podermos concluir sobre o tipo de morte celular (necrose e/ou apoptose) induzido pela peçonha. Entretanto, a análise do DNA extraído das células MDCK após 1, 3, 6 e 24 h de incubação com 10 e 100 µg de peçonha/mL, não revelou a fragmentação de DNA característica de apoptose (figura 2.11). Sendo assim, as células tratadas com a peçonha de *B. alternatus* foram avaliadas por citometria de fluxo usando a marcação de anexina. Esta análise mostrou que a morte

celular ocorria via necrose, com uma frequência muito baixa de apoptose após exposição das células à peçonha (figura 2.12). Nas monocamadas controle, $92,9 \pm 7\%$ (n=3) das células estavam aderentes ao substrato e também entre si, com a grande maioria viável e apresentando morfologia normal. Nas monocamadas tratadas com a peçonha de *B. alternatus* $99,4 \pm 2,5\%$ (n=3) das células não estavam aderidas ao substrato, flutuando no meio de cultura, e a grande maioria estava necrótica (figura 2.12, painel a).

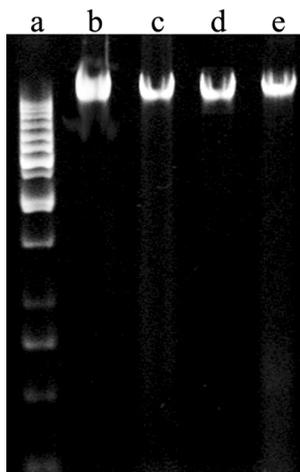


Figura 2.11: Perfil eletroforético de DNA extraído de células MDCK em cultura incubadas com a peçonha de *B. alternatus*. Pistas: (a) 1 kb DNA ladder, (b) DNA de células controle, (c, d e e), DNA de células tratadas com 1, 10 e 100 μg de peçonha/mL, respectivamente. As amostras correram em um gel de agarose 1,2% e foram coradas com brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

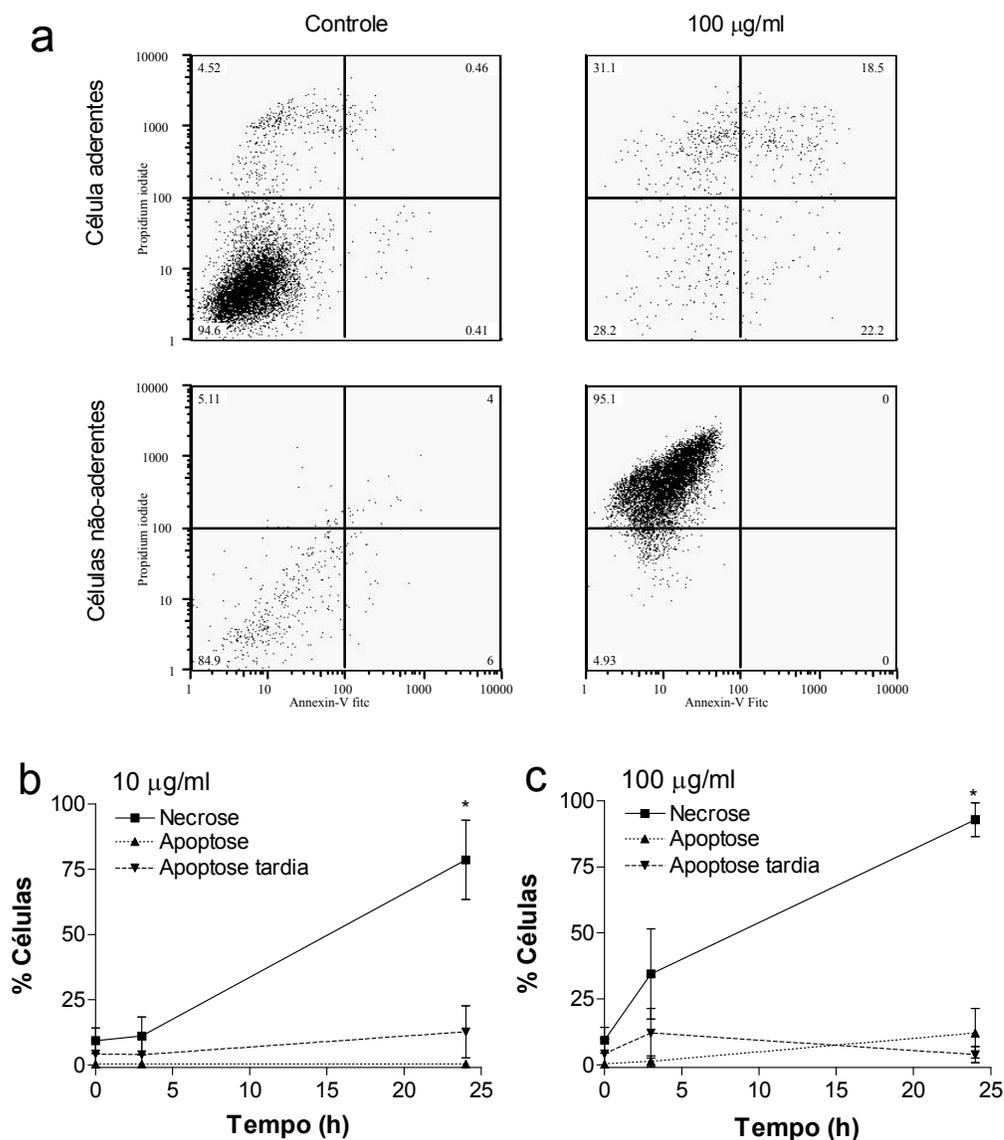


Figura 2.12: Citometria de fluxo das células aderentes e não aderentes de monocamadas controle e tratadas com a peçonha de *B. alternatus*. Painel (a) mostra a distribuição das células aderentes e não aderentes em dois grupos. Painéis (b) e (c) mostram a porcentagem de apoptose e necrose nas células MDCK em cultura incubadas com a peçonha de *B. alternatus* (b - 10 µg/mL e c - 100 µg/mL) por 3 h e 24 h. As porcentagem foram determinadas por citometria de fluxo e correspondem à soma das células aderentes e não aderentes. Os pontos representam a média ± DP de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado ao tempo zero (teste *t* de Student).

Para investigarmos o possível envolvimento de radicais livres na citotoxicidade da peçonha de *B. alternatus*, células MDCK foram incubadas com a peçonha na ausência e presença de catalase, a enzima que degrada H_2O_2 . O perfil de produção de H_2O_2 (figura 2.13) demonstrou que a peçonha de *B. alternatus* aumentou a concentração de H_2O_2 no meio de cultura, com uma concentração máxima de $\sim 287 \mu M$ após 15 minutos com o tratamento de $100 \mu g$ de peçonha/mL e de $68 \mu M$ após 20 minutos com $10 \mu g$ de peçonha/mL. Após o pico de produção de H_2O_2 , houve uma diminuição progressiva até atingir os níveis anteriores à adição de peçonha. Na presença de catalase, H_2O_2 não foi detectado no meio de cultura de células tratadas com a peçonha. Como podemos observar na figura 2.14a,b, o tratamento com catalase aumentou significativamente a viabilidade celular, conforme avaliada pelo ensaio de incorporação de vermelho neutro, após 1, 3, 6 e 24 h de exposição à peçonha (resultados semelhantes foram obtidos com a o método de redução de MTT; resultados não mostrados). A pré-incubação com a superóxido dismutase (SOD) e com o N^ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) foram também testadas para verificar o envolvimento do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ou óxido nítrico (NO^{\cdot}), respectivamente, no processo de morte celular induzido pela peçonha de *B. alternatus* em monocamadas MDCK. Em ambos os casos, houve aumento da viabilidade celular, embora o efeito protetor tenha sido menos consistente e não tão pronunciado como àquele visto com catalase, particularmente com a concentração de $100 \mu g$ de peçonha/mL (figura 2.14c-f).

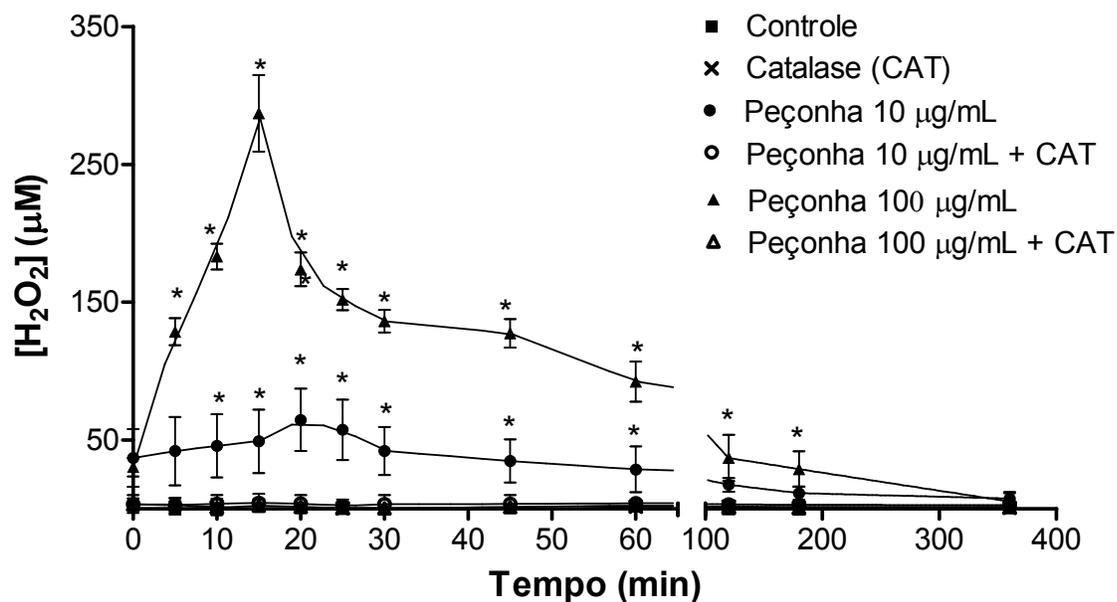


Figura 2.13: Produção temporal de H_2O_2 após exposição de monocamadas de células MDCK à peçonha de *B. alternatus*. As concentrações de H_2O_2 foram medidas pelo ensaio de peroxidase-acoplada em alíquotas de meio de cultivo de células incubadas com peçonha na ausência ou presença catalase. Os pontos representam a média \pm DP de cinco experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado às células controle (ANOVA seguido do teste de Tukey).

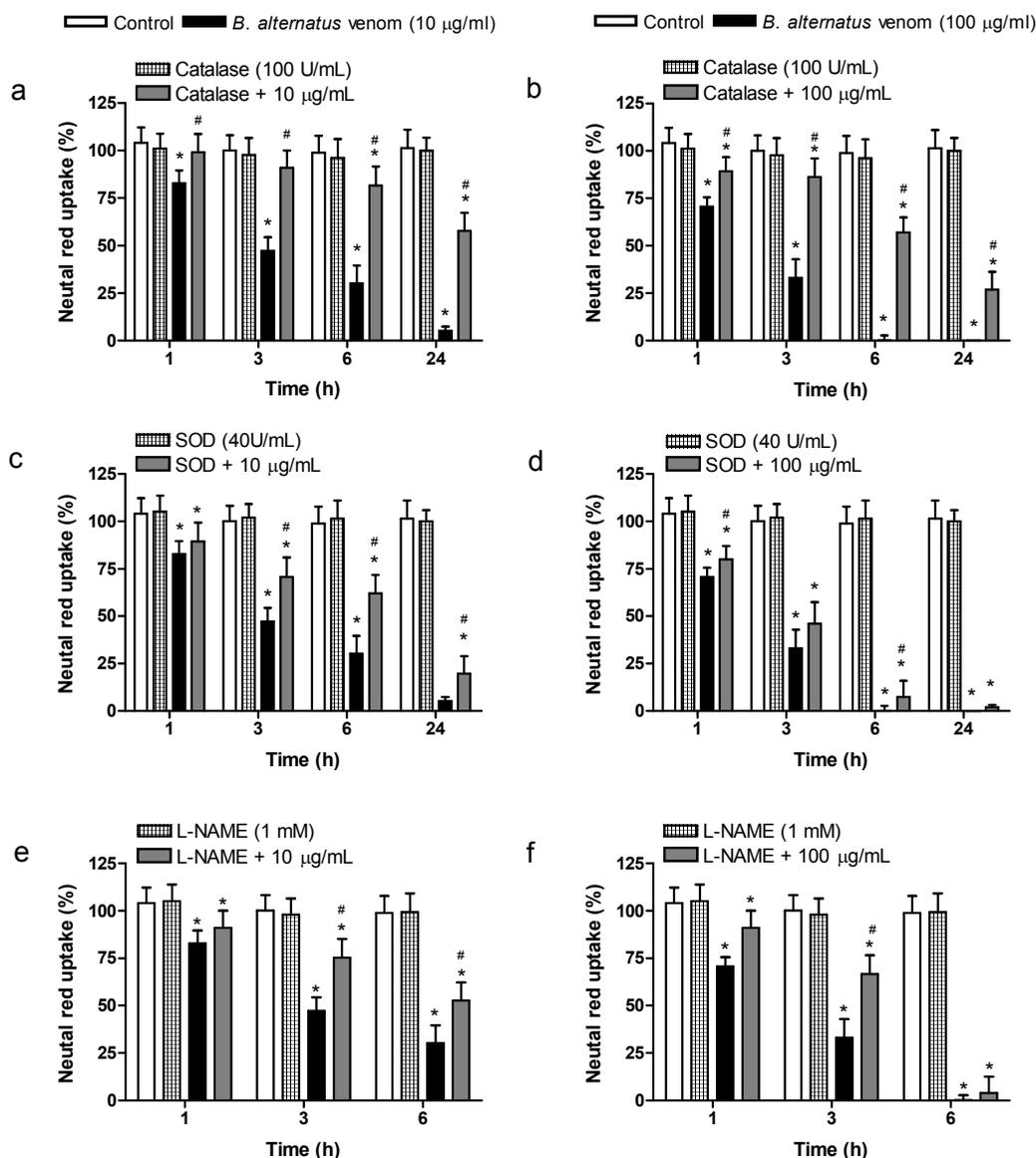


Figura 2.14: Efeito protetor da catalase (a,b), da superóxido dismutase (SOD; c,d) e do L-NAME (e,f) sobre a redução na viabilidade das células MDCK induzidas pela peçonha de *B. alternatus*. Painéis (a), (c) e (e) são de células incubadas com 10 µg de peçonha/mL e painéis (b), (d) e (f) são de células incubadas com 100 µg de peçonha/mL. Quando necessário, as células foram pré-incubadas com catalase (100 U/mL), SOD (40 U/mL) ou L-NAME (1 mM) por 30 min antes da adição de peçonha. As colunas mostram a média + DP de 15 monocamadas por grupo. *p<0,05 comparado ao controle correspondente a cada intervalo de tempo e #p<0,05 comparado à peçonha apenas (ANOVA seguido do teste de Tukey).

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste capítulo mostram que a peçonha de *B. alternatus* exerce diversos efeitos nas células MDCK em cultura, tais como: 1) citotoxicidade, conforme mostrado pelo decréscimo na viabilidade celular baseada na redução da incorporação de vermelho neutro, redução de MTT e também pela marcação de anexina V-FITC e iodeto de propídeo; 2) uma redução na resistência elétrica transepitelial e redistribuição de algumas proteínas associadas às junções intercelulares, o que é indicativo de rompimento da função de barreira epitelial; e 3) uma redução na adesão celular ao substrato, conforme mostrado pelo aumento do número de células destacadas no sobrenadante de cultura e o desarranjo das fibras de estresse. Estes efeitos foram dependentes da concentração de peçonha e do tempo de incubação.

À semelhança das outras espécies do gênero *Bothrops*, a peçonha de *B. alternatus* contém uma variedade de proteínas e enzimas (MEBS, 1970; TAN e PONNUDURAI, 1991), várias das quais foram isoladas e caracterizadas, incluindo L-amino ácido oxidase (L-AAO) (STABELI *et al.*, 2004), fosfolipase A₂ (PLA₂) (NISENBOM *et al.*, 1986), uma enzima tipo-trombina (balterobina) (SMOLKA *et al.*, 1998), um inibidor de trombina (bothroalternina) similar a bothrojararacina de *B. jararaca* (CASTRO *et al.*, 1998), metaloproteinases/disintegrinas (SOUZA *et al.*, 2000; MARIANO-OLIVEIRA *et al.*, 2003; COMINETTI *et al.*, 2003, 2004; GAY *et al.*, 2005; SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2005), e fosfodiesterase (VALÉRIO *et al.*, 2002). Destes componentes,

metaloproteinases, desintegrinas, PLA₂, e L-AAO são provavelmente os principais mediadores das modificações observadas aqui.

As peçonhas botrópicas também contêm uma variedade de PLA₂ miotóxicas básicas que exercem diversos efeitos biológicos em diferentes tipos celulares (GUTIÉRREZ e OWNBY 2003; LOMONTE *et al.* 2003). BARBOSA *et al.* (2002) mostraram que a miotoxina I, mas não a miotoxina II, da peçonha de *Bothrops moojeni* exerce um efeito deletério na função renal em perfusão de rim isolado de rato. Ao contrário de outras peçonhas do gênero *Bothrops* como *B. jararacussu* e *B. moojeni*, a peçonha de *B. alternatus* não possui estas miotoxinas básicas (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1990a, 1991) embora PONCE-SOTO *et al.* (2007) recentemente descreveram a purificação de uma miotoxina Lys49 PLA₂ miotóxica da peçonha desta espécie. Entretanto, considerando que o conteúdo desta toxina na peçonha é bastante reduzida (<2%) e que a mesma é apenas fracamente citotóxica (a liberação de lactato desidrogenase em células C2C12 ocorre somente em concentrações >130 µg/mL – maior que a concentração de 100 µg de peçonha/mL utilizado no presente estudo), é bem provável que a sua contribuição aos danos causados pela peçonha de *B. alternatus* em células MDCK seja bem limitada.

A adesão celular é um evento crítico no desenvolvimento celular e é coordenado por integrinas (moléculas de adesão celular) que medeiam a ligação dos componentes da matriz extracelular (HYNES, 1999; BOUDREAU e JONES, 1999). Na ausência de contato célula-matriz, muitos tipos celulares morrem através de apoptose por *anoikis* (FRISCH e FRANCIS, 1994; MEREDITH *et al.*, 1993; DÍAZ *et al.*, 2005; TANJONI *et al.*, 2005). As peçonhas botrópicas contêm uma variedade de metaloproteinases, muitas

das quais causam hemorragia *in vivo* por sua capacidade de degradar os componentes da matriz (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000; GUTIÉRREZ *et al.*, 2005). Além disso, estas peçonhas têm uma variedade de desintegrinas que interferem com a adesão celular mediada por integrinas (KAMIGUTI *et al.*, 1998; SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2005). As metaloproteinases/desintegrinas presentes na peçonha de *B. alternatus* reduzem a adesão celular em substratos cobertos com fibrinogênio, fibronectina e colágeno (SOUZA *et al.*, 2000; COMINETTI *et al.*, 2003). Esta ação pode explicar a capacidade da peçonha em destacar as células MDCK do substrato, como descrito neste trabalho. A queda na resistência elétrica transepitelial vista nas monocamadas tratadas com a peçonha provavelmente reflete o destacamento das células do substrato, embora a influência de danos às junções intercelulares não pode ser descartada, uma vez que a microscopia confocal mostrou certa desorganização destas estruturas da membrana em células tratadas, principalmente com a concentração de 100 µg/mL.

O destacamento das células do substrato causado pela peçonha de *B. alternatus* foi acompanhado por um decréscimo na resistência elétrica transepitelial e por um desarranjo nos elementos do citoesqueleto, especialmente nos microfilamentos de actina (fibras de estresse) na superfície basal. Este desarranjo tem sido observado em vários tipos celulares expostos a antagonistas de integrinas (STAIANO *et al.*, 1997; CASTEL *et al.*, 2000), assim como com peçonhas (COLLARES-BUZATO *et al.*, 2002). O rearranjo de actina também foi observado em neutrófilos expostos à jarastatina, uma desintegrina da peçonha de *B. jararaca* (COELHO *et al.*, 1999), e alternagina-C, uma desintegrina não-RDG da peçonha de *B. alternatus* (MARIANO-OLIVEIRA *et al.*, 2003).

O desarranjo do citoesqueleto é um importante passo nas ações paradóxicas (inibição e estimulação) destas toxinas na migração de neutrófilos. COSTA e SANTOS (2004) demonstraram que o rearranjo de actina é também importante na ação da jararagina, uma metaloproteinase-desintegrina da peçonha de *B. jararaca* que estimula a migração de células epiteliais, pela formação de filipódia, lamelipódia e fibras de estresse através de um mecanismo envolvendo a fosforilação da quinase de adesão focal (FAK), e o recrutamento de integrinas contendo $\alpha 5$ aos contatos focais; estas ações dependem da atividade enzimática desta proteína.

Os mecanismos envolvidos nas modificações induzidas pela peçonha na organização do citoesqueleto em células MDCK ainda não estão claros. O rearranjo do citoesqueleto pode envolver a combinação de processos como a perda da adesão célula-matriz, morte celular e/ou um processo compensatório designado para reestabelecer a integridade da monocamada após o destacamento das células (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005). Proteínas relacionadas à desintegrina, como alternagina-C de *B. alternatus* (COMINETTI *et al.*, 2004), podem induzir apoptose ou necrose por destacamento das células, inicialmente bloqueando os receptores de integrina seguido da contração do anel perijuncional de actina, o que poderia acentuar o estiramento mecânico exercido pelas células vizinhas (WU *et al.*, 2003), conforme observado aqui.

Durante a morte celular, as células perdem contato intercelular com as células vizinhas e, conseqüentemente, iniciam a reorganização do citoesqueleto (WU e HUANG, 2003). Conforme mostrado aqui, a citometria de fluxo revelou que, após incubação com a peçonha de *B. alternatus*, todas as células destacadas do substrato estavam em necrose ou apoptose tardia. Somente algumas células que permaneceram

no substrato mostraram alterações típicas de morte celular, apoptose ou necrose, como foi revelado por MEV e por marcação dupla com faloidina e DAPI. Além disso, a reorganização do citoesqueleto vista na maioria das células da monocamada aparentemente não estava associada a sinais de morte celular. Estas observações indicam que as modificações induzidas pela peçonha no citoesqueleto, especialmente aquelas envolvendo as fibras de estresse e contato célula-matriz, não são necessariamente correlacionadas com a morte celular.

As peçonhas ofídicas causam apoptose em uma variedade de células (ARAKI *et al.*, 2002), e este efeito é mediado por componentes como L-AAO (para revisão, ver DU e CLEMETSON, 2002; STÁBELI *et al.*, 2004; ANDE *et al.*, 2006; ZHANG e WEI, 2007), metaloproteinases (MASUDA *et al.*, 1997, 1998; WU *et al.*, 2001; GUTIÉRREZ *et al.*, 2005; TANJONI *et al.*, 2005; MOURA-DA-SILVA, *et al.*, 2007; BALDO *et al.*, 2008), desintegrinas (COMINETTI *et al.*, 2003; SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2005), e PLA₂ (ZHAO *et al.*, 2002; GUTIÉRREZ e OWNBY, 2003). Embora a peçonha de *B. alternatus* contenha estas enzimas, os ensaios de coloração nuclear com Feulgen, citometria de fluxo e fragmentação de DNA indicam que a morte celular induzida por esta peçonha em células MDCK ocorre essencialmente por necrose, enquanto que a indução de apoptose foi limitada. O fato de termos observado uma baixa frequência de apoptose, apesar da peçonha de *B. alternatus* conter proteínas capazes de induzir este processo de morte celular, pode sugerir que a ação potente da peçonha em produzir intensa necrose mascara qualquer efeito apoptótico.

Além da ação citotóxica que a peçonha de *B. alternatus* exerce sobre as células MDCK, a reação de Feulgen mostrou uma marcada diminuição no número de células

entrando em divisão celular, o que sugere que esta peçonha também tem uma ação citostática. O desarranjo das fibras de actina e de outros elementos do citoesqueleto, como os microtúbulos, pode efetivamente interromper a divisão celular (LING *et al.*, 2001). A coloração com Feulgen indica que várias células possuem núcleos picnóticos ou em diferentes estágios de condensação de cromatina, indicativo de estágios iniciais de morte celular. Por outro lado, observamos apenas um pequeno número de células com núcleos com padrão de cromatina fragmentado característico de apoptose.

Embora numerosos estudos tenham avaliado os efeitos renais gerais das peçonhas botrópicas *in vivo* e *in vitro* (em células em cultura e órgãos isolados), os mecanismos moleculares precisos envolvidos nesse processo ainda permanecem obscuros. HAVT *et al.* (2001) sugeriram que a diminuição do fluxo de filtração glomerular, fluxo urinário e a porcentagem de transporte tubular de potássio total observado em rins isolados de rato perfundidos com a peçonha de *B. jararacussu* é mediado pelo fator ativador de plaquetas. Enquanto estes autores não conseguiram demonstrar um papel para a PLA₂ na ação desta peçonha, CRUZ-HÖFLING *et al.* (2001) relataram que a fração contendo PLA₂ da peçonha de *B. insularis* causou lesões renais glomerulares e tubulares em pintainhos, possivelmente como resultado de isquemia local causada pela formação de prostaglandinas vasoconstritoras como tromboxano A₂. CASTRO *et al.* (2004) demonstraram um efeito nefrotóxico direto na ação da peçonha *B. jararaca* em túbulos proximais renais isolados de rato, que foi parcialmente mediado por peroxidação lipídica. O papel dos produtos do ácido araquidônico, formação de radicais livres e peroxidação lipídica nos efeitos citotóxicos da peçonha de *B. alternatus* em células MDCK ainda precisa ser determinado.

Como um passo inicial em direção à compreensão dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade causada pela peçonha de *B. alternatus*, examinamos o papel das espécies reativas de oxigênio (ROS, especialmente H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$) e NO^{\cdot} sobre a viabilidade das células MDCK expostas à peçonha. A produção de grandes quantidades de peróxido de hidrogênio pode resultar em danos celulares devido à capacidade desta molécula em atravessar a membrana celular e produzir outros ROS intracelularmente, particularmente os radicais hidroxila (HO^{\cdot}). Adicionalmente, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o óxido nítrico (NO^{\cdot}) podem reagir para produzir oxidantes mais potentes, como o peróxinitrito ($ONOO^-$). Este, assim como o HO^{\cdot} , podem acelerar a peroxidação lipídica e causar severo estresse oxidativo.

L-Amino ácido oxidases (L-AAO) são um dos principais componentes de peçonhas ofídicas responsáveis pelo aumento da produção de H_2O_2 em células em cultura. Estas enzimas causam necrose quando há um aumento efetivo de níveis de H_2O_2 , porém produzem apoptose quando o H_2O_2 é depletado do meio de cultura pela adição de catalase (ANDE *et al.*, 2006). A peçonha de *B. alternatus* contém L-AAO (STABELI *et al.*, 2004) e, como mostrado aqui, o tratamento com a peçonha em células MDCK aumentou os níveis de H_2O_2 , que foi abolido pela catalase; o pré-tratamento com catalase também aumentou a viabilidade das células expostas à peçonha. Estes resultados sugerem que a formação de H_2O_2 , através da L-AAO presente na peçonha, é um dos principais mediadores da citotoxicidade da peçonha de *B. alternatus*. Esta conclusão é apoiada na nossa descoberta de que a principal via de morte celular é através de necrose ao invés de apoptose, bem como nos altos níveis de H_2O_2

detectados no meio de cultura, particularmente após exposição à concentração de 100 μg de peçonha/mL.

Além do H_2O_2 , outros reativos de oxigênio tais como o $\text{O}_2^{\cdot-}$ e NO^{\cdot} também podem estar envolvidos no dano celular causado pela peçonha de *B. alternatus*, pois o tratamento com superóxido dismutase, que metaboliza o $\text{O}_2^{\cdot-}$, e L-NAME, um inibidor da óxido nítrico sintase envolvida na formação de NO, também exerceram um efeito protetor sobre as células, embora este seja menos pronunciado que com catalase. Corroborando com estes resultados, a formação de ROS e NO foi observada em respostas inflamatórias mediadas por peçonhas botrópicas (ZAMUNER *et al.*, 2001; MIYABARA *et al.*, 2004; CHAVES *et al.*, 2006). A formação destes radicais livres e o estresse oxidativo resultante podem comprometer a integridade das mitocôndrias e sua permeabilidade, resultando em sobrecarga de cálcio, perda do potencial de membrana, interferência com o metabolismo energético celular, e finalmente lise da célula (DAVIES, 1999; ANDE *et al.*, 2006).

Estudos clínicos mostram que as concentrações circulantes de peçonhas do gênero *Bothrops* em indivíduos picados por estas serpentes estão geralmente <0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (BARRAL-NETTO *et al.*, 1991; KAMIGUTI *et al.*, 1991; THEAKSTON *et al.*, 1992; CARDOSO *et al.*, 1993; FRANÇA *et al.*, 2003; PARDAL *et al.*, 2004), embora as concentrações no líquido seroso das bolhas no local da picada, possam ser maiores (>10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (PARDAL *et al.*, 2004). Apesar das concentrações de peçonha testadas aqui estarem acima desta faixa, elas são semelhantes a outras utilizadas em diversas investigações em várias peçonhas de serpentes em células em cultura (LOMONTE *et*

al., 1994; WILLINGER *et al.*, 1995; COLLARES-BUZATO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002; DAMICO *et al.*, 2007) e em preparações de rins isolados perfundidos (HAVT *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2004). Além disso, estudos da distribuição nos órgãos das peçonhas botrópicas (DOMINGOS *et al.*, 1994; VASCONCELOS *et al.*, 1998) e toxinas (MORENO e GUTIÉRREZ, 1988; TANIGAWA *et al.*, 1994) em animais envenenados mostram que os rins são um importante alvo de acumulação de peçonha, possivelmente devido ao seu papel na excreção renal de proteínas ofídicas (MEBS, 1978). A acumulação de peçonha nos rins significa que este órgão pode estar exposto a níveis consideravelmente mais altos que outros órgãos. Esta acumulação preferencial de enzimas da peçonha e suas toxinas podem contribuir para os fortes danos renais, morfológicos e funcionais, causado por peçonhas botrópicas em animais experimentais (REZENDE *et al.*, 1989; BURDMANN *et al.*, 1993; BOER-LIMA *et al.*, 1999, 2002) e humanos (AMARAL *et al.*, 1985).

Concluindo, a peçonha de *B. alternatus* exerce um efeito marcante nas células MDCK em cultura que envolve o destacamento destas células de seu substrato, reorganização da F-actina do citoesqueleto e uma redução na viabilidade celular, com uma conseqüente diminuição da resistência transepitelial das monocamadas; a morte celular ocorre predominantemente por necrose. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, particularmente H₂O₂, estão envolvidas nesta citotoxicidade, embora o mecanismo exato ainda precise ser determinado. Estes efeitos são, provavelmente, mediados principalmente por L-AAO, metaloproteinases, desintegrinas e PLA₂, presentes na peçonha, as quais podem contribuir para as alterações renais (morfológicas e funcionais) causadas pela peçonha após envenenamento.



CAPÍTULO 3

Purificação e caracterização da DNase ácida da peçonha de *Bothrops alternatus*

INTRODUÇÃO

Desoxirribonuclease II (DNase II)

A desoxirribonuclease (DNase) II (EC 3.1.22.1), descoberta por CATCHESIDE e HOLMES (1947) e bioquimicamente caracterizada na década de 60 do século passado (BERNARDI *et al.*, 1965), é sinônimo de endonuclease ácida (MACLEA *et al.*, 2003), enzima que hidrolisa a estrutura fosfodiéster por um mecanismo de clivagem única (EVANS e AGUILERA, 2003) capaz de liberar pequenos oligonucleotídeos de fitas de DNA com a extremidade 3'-fosfato livre (BERNARDI *et al.*, 1971) (figura 3.1). Conforme o nome sugere, as endonucleases ácidas têm pH ótimo entre 4,2 e 5,5 (sendo que a DNase II se distingue da DNase I por esta segunda possuir pH ótimo alcalino), se tornam inativa em pH 7,4 (HAESSLER e CUNNINGHAM, 1957; GEORGATSOS e LASKOWSKI, 1962; WEIR, 1993), e possuem massa molecular entre 26 kDa e 46 kDa (LIAO *et al.*, 1989; RIBEIRO e CARSON, 1993; SHIOKAWA *et al.*, 1994). DNases II têm sido detectadas em células e secreções de muitos organismos (CUNNINGHAM e LASKOWSKI, 1953), em diversos tecidos (fígado, baço, etc.), células (neutrófilos) e linhagens celulares (CHO, HeLa e HL-60) (DULANEY e TOUSTER, 1972;

LIAO *et al.*, 1989; BARRY e EASTMAN, 1993; GOTTLIEB *et al.*, 1995), e em peçonhas animais (MACKESSY, 1998).

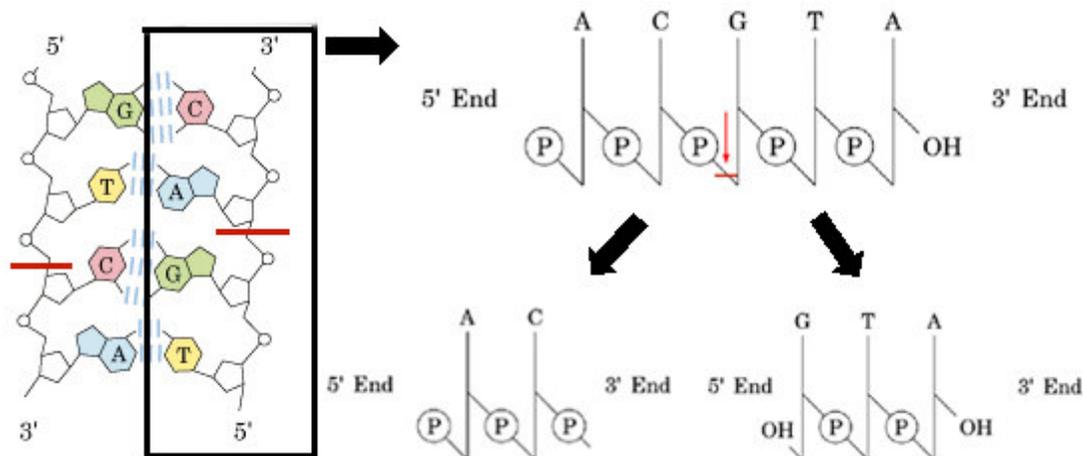


Figura 3.1: Esquema de clivagem dupla do DNA (barras vermelhas) pela DNase II, e a formação de fragmentos com terminais 3'-fosfato livres (modificado de ALBERTS *et al.*, 1994).

Muitas DNases II consistem de uma cadeia única de aminoácidos. Assim, MACLEA *et al.* (2002) mostraram que a DNase II α humana consiste de um polipeptídeo contíguo, único, com glicosilação e pontes dissulfetos importantes para a formação da enzima ativa. Por outro lado, algumas destas enzimas são compostas por três subunidades não idênticas derivadas da proteólise de um precursor protéico (WANG *et al.*, 1998; TAKESHITA *et al.*, 1998), e o resíduo de histidina na cadeia $\alpha 2$ está intimamente envolvido com a atividade enzimática (WANG *et al.*, 1998). Estudos sobre mutações sítio-direcionadas mostraram que duas glicosilações são necessárias para gerar esta enzima madura (YASUDA *et al.*, 1999). LIAO (1985), em estudo com DNase II α de suínos, verificou que regiões que possuíam resíduos de histidina estariam relacionados ao sítio e atividade catalíticos, função desempenhada sem a presença de

cátions bivalentes (OSHIMA e PRICE, 1973). Outras endonucleases também possuem resíduos de histidina envolvidos na catálise (FRIEDHOFF *et al.*, 1996; MEISS *et al.*, 2001; MACLEA *et al.*, 2002). Recentemente, CHENG *et al.* (2006) sugeriram que os resíduos His115, His132 e His297 desempenham papel fundamental na função da DNase II de porco (pDNase II), pois, através de mutações pontuais verificaram a perda de atividade da DNase nestes mutantes. Mutações em outros resíduos (His41, His109, His206, His207, His274 e His322) não afetaram a atividade endonucleásica desta enzima. Estes dados estão de acordo com os apresentados por MACLEA *et al.* (2003) para DNase II humana, onde a His295 (equivalente a His297 em pDNase II) foi identificada como envolvida na catálise. Através da modelagem da DNase II humana (figura 3.2), baseando-se na fosfolipase D, CYMERMAN *et al.* (2005) sugeriram o envolvimento do resíduo His113 (His115 em pDNase II) como o primeiro nucleófilo, o qual atacaria o átomo de fósforo do substrato formando um intermediário covalente.

CHENG *et al.* (2006) propuseram que His297 (His295 em pDNase II) seria a doadora de elétron ao fósforo (figura 3.3, reação I), enquanto His115 (His113 em pDNase II) doaria prótons para a fissão da ligação P-O, formando o produto ROH (reação II). Após a liberação deste produto, a His115 utiliza uma molécula de água como segundo nucleófilo, que ataca o átomo de fósforo (reação III), invertendo sua configuração. A reação final (IV) envolve a fissão da ligação N-P, que resulta na liberação do segundo produto. Com base em experimentos de alquilação, LIAO (1985) propôs o envolvimento de um único resíduo de histidina na atividade catalítica da enzima, conclusão esta apoiada pelos achados de OSHIMA e PRICE (1973) usando iodoacetato.

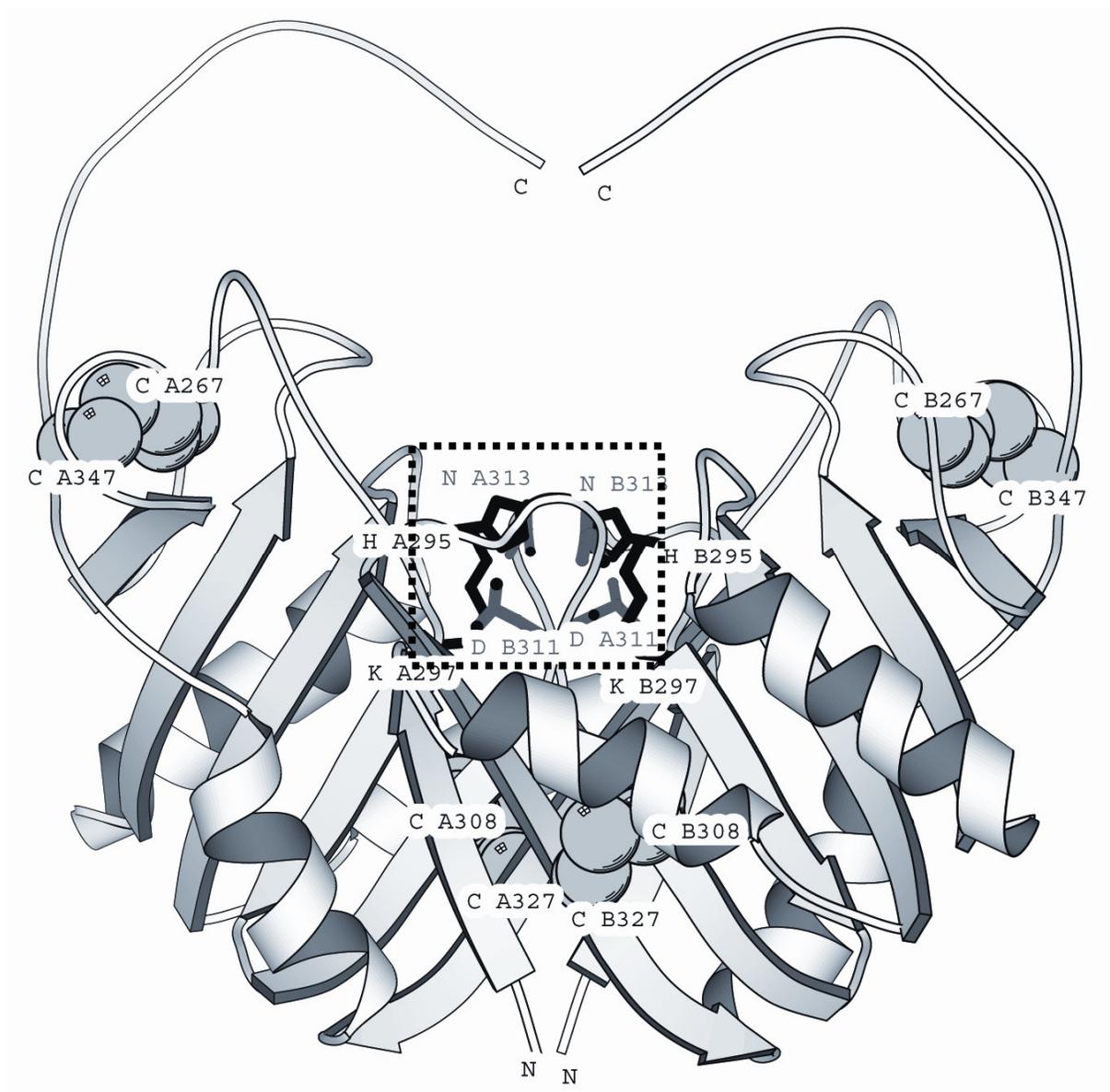


Figura 3.2: Modelo da forma madura da DNase II α baseada no alinhamento com fosfolipase D proposto por CYMERMAN *et al.* (2005). O sítio ativo está indicado pelo quadrado preto pontilhado e as pontes dissulfeto estão indicadas por esferas.

(Fonte: <ftp://genesilico.pl/iamb/models/DNaseII>).

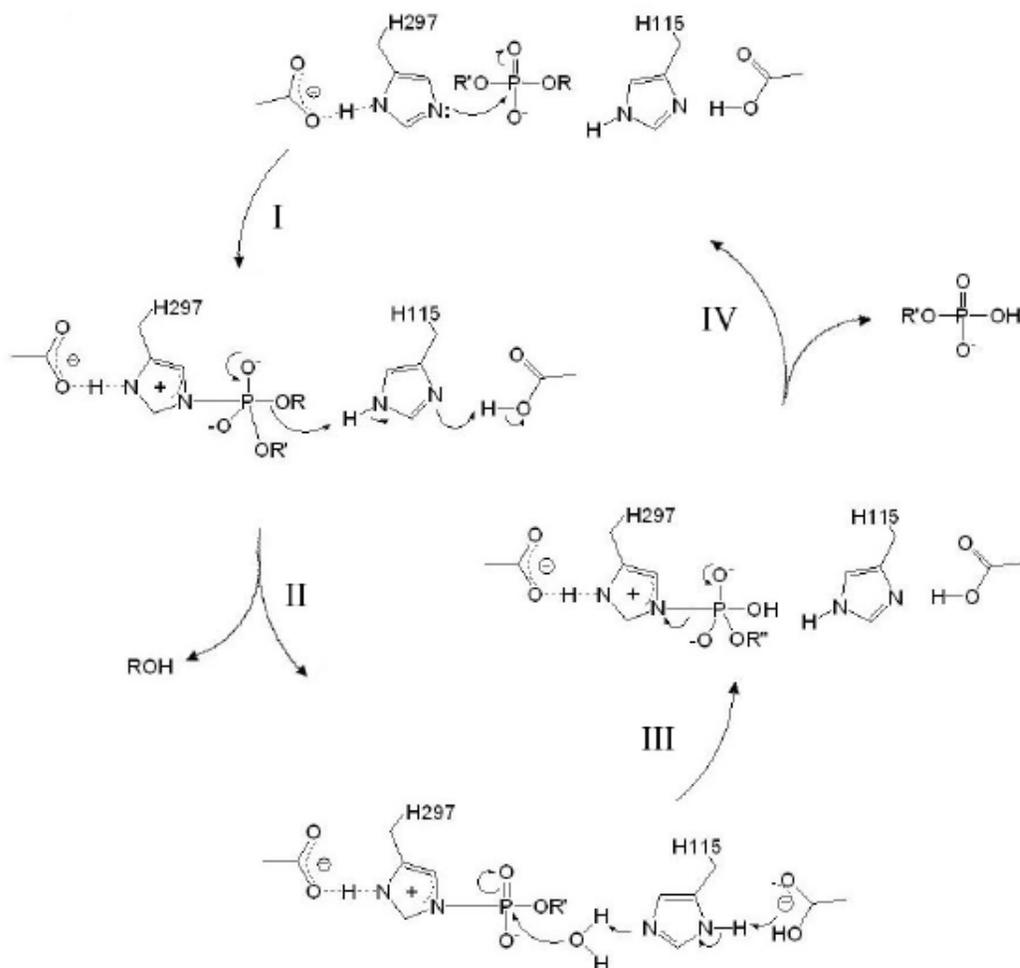


Figura 3.3: Modelo esquemático da reação catalisada por DNase II. I a IV são as principais reações catalizadas pela enzima (ver texto) (CHENG *et al.*, 2006).

Ao menos seis resíduos de cisteína, além da seqüência de um peptídeo sinal na região N-terminal da molécula (direcionando as proteínas a serem secretadas), são conservados dentro da família de DNase II em diversas espécies (figura 3.4) (KRIESER *et al.*, 2001; MACLEA *et al.*, 2003). Dentre os organismos estudados por MACLEA *et al.* (2003), apenas a bactéria *Burkholderia pseudomallei* possuía somente dois dos seis

resíduos de cisteínas universalmente conservados, e a ausência do peptídeo sinal em sua seqüência (NIELSEN *et al.*, 1997). A presença destas regiões conservadas reflete a importância dos resíduos de cisteína para a manutenção da estrutura correta da proteína, e também sugere que tal conformação seja importante para a função desta (MACLEA *et al.*, 2003).

Embora o conhecimento sobre a estrutura de DNase II e suas propriedades enzimáticas tenha aumentado, a função fisiológica desta enzima continua sendo, atualmente, uma área de intensa investigação (KRIESER e EASTMAN, 2000; CHOU *et al.*, 2002; MACLEA *et al.*, 2002, 2003; EVANS e AGUILERA, 2003; COUNIS e TORRIGLIA, 2006; NAGAI *et al.*, 2006; NAKAHARA *et al.*, 2007; PADRON-BARTHE *et al.*, 2007).

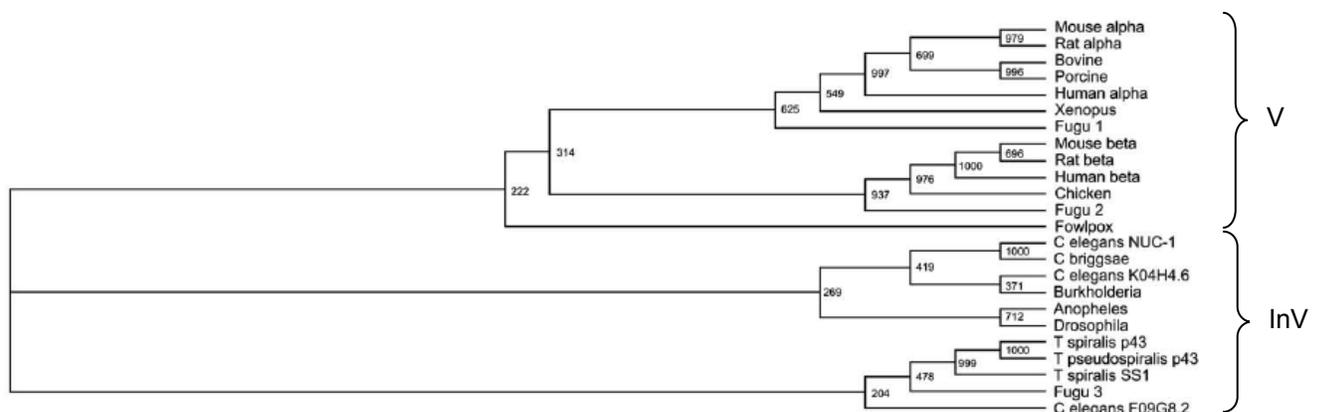


Figura 3.4: Árvore filogenética da família de DNases II. A homologia foi realizada através de alinhamento usando algoritmo ClustalW. O ramo superior mostra DNases de vertebrados (V, exceto “fowlpox” – um vírus) e o inferior, DNases de invertebrados (InV, exceto Fugu 3 – peixe tipo baiacu). (Fonte: MACLEA *et al.*, 2003).

DNase II de peçonhas

As peçonhas ofídicas, que têm a função de imobilizar e matar suas presas, apresentam uma grande variedade de enzimas com diferentes funções (FRY *et al.*, 2006), dentre estas estão aquelas capazes de atuar sobre ácidos nucléicos, e seus derivados como nucleotídeos, nucleosídeos e ligações fosfato. A atividade de diversas destas enzimas tem sido encontrada em peçonhas ofídicas, tais como fosfatases (alcalina e, em grau menor, ácida), fosfodiesterases, ribonucleases, desoxirribonucleases alcalinas (endonucleases alcalinas ou ácidas, DNase I ou DNase II), e 5'-nucleotidases (MACKESSY, 1998; AIRD, 2002; SALES e SANTORO, 2007). A atividade de endonucleases em peçonha foi primeiramente reportada por DELEZENNE e MOREL (1919) e, subseqüentemente, por TABORDA *et al.* (1952). A primeira purificação de uma DNase de peçonha de serpentes foi realizada por GEORGATSOS e LASKOWSKI (1962) utilizando a peçonha de *Bothrops atrox*. Atividades endonucleásicas com pH ótimo em torno de 5,0 também foram descritas em peçonhas de outras espécies de serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Naja*, *Trimeresurus* e *Vipera* (GEORGATSOS e LASKOWSKI, 1962; LASKOWSKI, 1980; SITTENFELD *et al.*, 1991; MACKESSY, 1998) em associação à atividade de fosfodiesterase (pH ótimo em 8,9).

A DNase II de peçonha, atuando em conjunto com fosfodiesterases da peçonha ou fosfodiesterases endógenas, degrada ácidos nucléicos em nucleotídeos livres, que servem como substrato para a 5'-nucleotidase (responsável por liberar nucleosídeos livres). Os produtos (purinas) desta via de degradação podem eventualmente contribuir

para a hipotensão, choque, imobilização e morte da presa após envenenamento (AIRD, 2002). Apesar de certa similaridade entre a atividade de DNase em peçonhas e a ação de fosfodiesterases (que hidrolisam tanto RNA como DNA) (PRITCHARD *et al.*, 1977; SITTENFELD *et al.*, 1991; MACKESSY, 1998; SALES e SANTORO, 2007), a DNase II pode ser diferenciada das fosfodiesterases devido à sua atividade em pH ácido, assim como à produção de oligonucleotídeos derivados da endoclivagem do ácido nucléico, ao contrário da fosfodiesterase que, com clivagem exógena, produz mononucleotídeos.

Neste capítulo descrevemos o isolamento da DNase ácida presente na peçonha de *B. alternatus* e investigamos suas propriedades bioquímicas, comparando-as com DNases ácidas presente em mamíferos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

Ácido aurintricarboxílico, ácido bórico, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA, sal sódico), acrilamida, agarose, albumina bovina, azul de bromofenol, azul brilhante de Coomassie R250, anticorpo secundário anti-cavalo acoplado à peroxidase, DNA (tipo I, de salmão), DNA plasmídeo pBR322, DNase I de pâncreas bovino (>1000 unidades de Kunitz/mg sólida), DNase II de baço suíno (>800 unidades de Kunitz/mg sólida), N-etilmaleimida, N,N-metileno-bis-acrilamida, o-fenilenodiamina (OPD), persulfato de amônio, N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED), Tris base, Triton X-100 foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Marcadores de massa molecular para SDS-PAGE foram obtidos da BioRad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, EUA) e marcadores de DNA 1 kb foram obtidos da Fermentas Inc. (Hannover, MD, EUA). As resinas para cromatografia (ConA-Sepharose, heparina-Sepharose, proteína G-Sepharose, SOURCE 15RPC, SP-Sepharose e Superdex 75) e DTT foram obtidas da Amersham-GE (Piscataway, NJ, EUA). A coluna BioSuite 4 µm UHR SEC 125 foi obtida da Waters. Os demais reagentes (de grau p.a.) foram obtidos de fornecedores locais.

Peçonha e antivenenos

A peçonha de *B. alternatus* foi adquirida do Centro de Extração de Toxinas (CETA, Morungaba, SP, Brasil) e foi extraída manualmente de espécimes adultas de *B.*

alternatus de ambos os sexos. O soro antibotrópico produzido contra um *pool* de peçonhas botrópicas (*B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*) e o soro anticrotálico produzido contra peçonha de *Crotalus durissus terrificus* foram obtidos do Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brasil).

Quantificação de proteínas

As concentrações protéicas foram determinadas pela absorbância em 280 nm no caso das frações cromatográficas (perfis de eluição) e pelo método de BRADFORD (1976) usando-se albumina bovina como padrão (para os pools de frações e proteína pura).

Purificação da DNase II

Cromatografia de troca iônica (SP-Sepharose)

A peçonha (100 mg) foi dissolvida em 1 mL de tampão acetato de sódio 30 mM pH 5,0, e centrifugada (12.000 x *g*, 10 min). O sobrenadante resultante foi adicionado a duas colunas de HiTrap SP-Sepharose (5 mL) acopladas em série, equilibradas com acetato de sódio 30 mM, pH 5,0, contendo 5 mM EDTA. Após lavagem da coluna com o mesmo tampão para remover material não retido, as proteínas foram eluídas (30 mL/h) em gradiente não-linear de NaCl (0–1 M). O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm, e as frações (1 mL/tubo) foram dosadas para atividade enzimática.

Cromatografia de afinidade (heparina-Sepharose)

As frações ativas do passo anterior foram agrupadas, concentradas em filtros Amicon 5,000 Da (Millipore) (4.000 x g por 45 min a 4°C) e adicionadas a uma coluna HiTrap heparina-Sepharose (5 mL), equilibrada com tampão acetato de sódio 30 mM pH 5,0, contendo 5 mM EDTA. Após lavagem da coluna com o tampão acima para retirada de material não retido, as proteínas foram eluídas (60 mL/min) em gradiente não-linear de NaCl (0-2 M) no mesmo tampão. As frações (1 mL/tubo) foram monitoradas a 280 nm e dosadas para atividade de DNase II.

Cromatografia de gel filtração (Superdex 75)

As frações contendo atividade da DNase II foram agrupadas e este *pool* foi centrifugado a 4.000 x g por 45 min a 4°C em filtros Amicon 5,000 Da (Millipore) para concentração. O sobrenadante retido foi adicionado a uma coluna de Superdex 75 (1,0 cm x 30 cm) equilibrada com acetato de sódio 30 mM, pH 6,0, contendo 5 mM EDTA e 0,5 M NaCl. As proteínas foram eluídas (12 mL/h) com o mesmo tampão e o perfil de eluição foi monitorado a 280 nm. As frações coletadas (1 mL/tubo) foram dosadas para atividade enzimática de DNase II. As ativas foram agrupadas e usadas no passo seguinte.

Cromatografia de afinidade (ConA-Sepharose)

As frações ativas do passo anterior foram agrupadas e concentradas em filtros Amicon 5,000 Da (Millipore) (4.000 x g por 45 min a 4°C) para serem adicionadas a uma coluna de ConA-Sepharose (0,5 cm x 5 cm) equilibrada com tampão acetato de

sódio 30 mM, pH 6,0, contendo 5 mM EDTA e 0,5 M NaCl. Após lavagem da coluna (30 mL/h) com o mesmo tampão para remover material não retido, as proteínas foram eluídas em um gradiente de D-glicose (0–1 M, linear) no tampão acima, seguido de lavagem da coluna com Tris-borato 0,1 M, pH 6,5, contendo 0,5 M NaCl e 5 mM EDTA, para remover proteínas fortemente ligadas. O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm e as frações (1 mL/tubo) foram dosadas para atividade enzimática.

Cromatografia de gel filtração (BioSuite UHR SEC 125)

As frações contendo atividade da DNase II foram agrupadas e este *pool* foi centrifugado a 4.000 x *g* por 45 min a 4° C em filtros Amicon 5,000 Da (Millipore) para concentração e aplicados a uma coluna de HPLC BioSuite 4 µm UHR SEC (4,6 mm x 300 mm) equilibrada com 30 mM acetato de sódio, pH 5,0 contendo 5 mM EDTA. As proteínas foram eluídas (21 mL/h) com o mesmo tampão e o perfil de eluição foi monitorado a 280 nm. As frações (0,5 mL) foram coletadas e dosadas para atividade enzimática de DNase II.

Atividades enzimáticas

DNase II

Ensaio em placa: O ensaio em cubeta de KUNITZ (1950) foi modificado para placas de 96 poços. O DNA foi dissolvido a 75 µg/mL em tampão acetato de sódio 0,15 M, pH 4,7. A peçonha de *B. alternatus* ou fração cromatográfica (10-50 µL) foi adicionada a esta solução de substrato (150 µL) num volume final de 200 µL, e o

aumento da absorvância a 260 nm foi monitorado a 37°C durante até 30 minutos em um leitor de placas BioTek (BioTek Instruments Inc., EUA). Uma unidade de atividade foi definida como um aumento de 0,001 na absorvância em 260 nm por minuto (KUNITZ, 1950) após correção da pista óptica.

No ensaio para avaliar os substratos utilizamos as mesmas condições descritas acima, porém em tampão acetato de sódio 150 mM, pH 4,7, adicionamos 120 µg de RNA/poço, ou 50 µg de PolyA/poço, ou 11,5 µg/mL de DNA desnaturado, utilizando 15 µg de enzima purificada.

O pH ótimo da enzima foi determinado medindo-se a atividade enzimática em glicina-HCl 10 mM (pH 3,0 – 3,5), acetato de sódio 150 mM (pH 4,0 – 6,0) , Tris-HCl 10 mM (pH 6,5 – 8,0), glicina-NaOH 10 mM (pH 8,0 – 9,0) nas mesmas condições descritas acima.

A estabilidade da DNase ao calor foi avaliada aquecendo-se a enzima purificada (15 µg) em várias temperaturas durante 15 minutos, seguida pela determinação da atividade residual usando o ensaio enzimático descrito acima.

A influência de metais, EDTA, DTT, iodacetamida, N-etilmaleimida e ácido aurintricarboxílico foi investigada incubando a enzima purificada (15 µg) com diferentes concentrações destas substâncias (1 – 100 mM) e realizando o ensaio para medir a atividade residual.

Ensaio em cubeta: Para determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) o ensaio em cubetas foi realizado de acordo com o método de KUNITZ (1950). A atividade foi medida usando o pH ótimo da enzima (tampão acetato de sódio 150 mM,

pH 4.7), e variando a concentração do substrato (0,5 – 100 µg de DNA/mL). Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram calculados de acordo com Lineweaver e Burk (1934), usando o programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

Ensaio em gel de agarose: Após o ensaio em placa de 96 poços, as amostras de DNA foram removidas da placa e mantidas em banho a 37°C por pelo menos mais 30 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se etanol absoluto gelado e procedendo-se a centrifugação a 15.000 x g por 10 min a 4°C. O precipitado contendo DNA foi ressuspenso em tampão Tris-borato EDTA (TBE – 89 mM de Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM de EDTA, pH 8,0), e aplicado a um gel 2% de agarose. Após corrida a 35 V por 1,5 h, o gel foi corado com brometo de etídio (1 µg/mL) para visualizar as bandas antes da fotodocumentação.

A capacidade da enzima purificada em degradar DNA circular foi avaliada usando os plasmídeos pBR322 e pGEM. Neste ensaio, 400 ng (1 µL) de plasmídeo e 5 µg (1 µL) de enzima purificada foram incubados em tampão acetato de sódio 150 mM, pH 4,7, num volume final de 5 µL. A reação foi interrompida adicionando-se 5 µL de tampão de corrida 6x (azul de bromofenol, 40% de glicerol em TBE) e a amostra adicionada em um gel de 1,2% de agarose. Após corrida a 35 V por 1 h, em TBE, o gel foi corado com brometo de etídio (1 µg/mL), visualizado sob luz UV e documentado.

DNase I

O ensaio da DNase I foi realizado nas condições descritas para DNase II, porém utilizando 75 µg de DNA /mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5. Em placas de 96 poços, a peçonha de *B. alternatus* ou fração cromatográfica (10-50 µL) foi adicionada a esta solução de substrato (150 µL) num volume final de 200 µL. O aumento da absorbância a 260 nm foi monitorado a 37°C durante até 30 minutos em um leitor de placas BioTek. Uma unidade de atividade foi definida como um aumento de 0,001 na absorbância em 260 nm por minuto (Kunitz, 1950) após correção da pista óptica.

Fosfodiesterase

A atividade de fosfodiesterase foi medida de acordo com BJÖRK (1963), modificada para placas de 96 poços. A mistura de reação consistiu em 100 µL de substrato (1 mM bis(p-nitrofenil)-fosfato em tampão glicina-NaOH), 75 µL de tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 8,9, 25 µL de 30 mM MgSO₄ e 50 µL de peçonha ou fração cromatográfica num volume final de 250 µL. Após incubar a 37°C por 30 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de 0,05 M NaOH e a absorbância resultante foi lida a 400 nm em um leitor de microplacas SpectraMax.

Eletroforese

Eletroforese em géis de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A eletroforese das frações cromatográficas com atividade de DNase II, na presença de SDS, foi feita usando-se géis de 10% de acrilamida (LAEMMLI, 1970) num

sistema eletroforético Mighty Small SE260 (Hoefer-Pharmacia). Após eletroforese a 100 V constantes, os géis foram corados com 0,1% de azul de Coomassie R250 em metanol:ácido acético:água destilada (40:10:50, v/v) e, depois descorados. Os géis correspondendo às etapas finais de purificação (quando a quantidade de proteína era muito pequena) foram corados com nitrato de prata. Os marcadores moleculares foram corridos em paralelo com as amostras. Os géis foram analisados e documentados.

Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

A DNase (80 µg) foi diluída em um volume final de 250 µL com solução contendo urea 8 M, 4% (w/v) CHAPS, 2% (v/v) anfólitos pH 3-10, DTT 60 mM e 0,002% (w/v) azul de bromofenol, de acordo com o fabricante (GE Healthcare). As amostras foram adicionadas em uma fita (*strip*) de IPG (13 cm; GE Healthcare) com uma separação linear de pH 3 a 10 para a DNase e não linear de pH 3 a 10 para a peçonha. Após 12 h de reidratação, a isoeletrofocalização (IEF) foi feita a 25°C por 1 h a 500 V, por 1 h adicional a 1.000 V e então por 12 h a 8.000 V em um sistema IPGphor (GE Healthcare), mantendo-se uma corrente limite de 50 µA por strip. A fita da primeira dimensão foi então reduzida lavando-a em 1% de DTT (w/v) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, contendo urea 6 M, 30% de glicerol (v/v), 2% de SDS (w/v) e 0,002% de azul de bromofenol (w/v). Em seguida, a fita da primeira dimensão foi alquilada no mesmo tampão contendo 2,5% de iodoacetamida (w/v) ao invés de DTT. A segunda dimensão foi realizada por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida de 12,5% em um sistema SE600 (Hoefer-Pharmacia). A fita de IPG foi selada à superfície do gel da

segunda dimensão usando 0,5% de agarose (w/v). A eletroforese foi realizada a 80 V por 30 minutos e depois a 120 V constantes até o azul de bromofenol atingir o final do gel. As proteínas foram visualizadas usando coloração com azul de Coomassie ou prata e o gel foi documentado.

Caracterização imunológica

Western-blotting

Após SDS-PAGE de peçonha (5 µg) de *B. alternatus* e DNase II purificada (5 µg) em géis de 10% de acrilamida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (TOWBIN *et al.*, 1979) em uma cuba de transferência Mighty Small TE22 (Hoefer-Pharmacia). Marcadores moleculares foram incluídos na corrida. Após a transferência, sítios inespecíficos na membrana foram bloqueados *overnight* a 4°C com 5% de leite desnatado em solução basal (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, 150 mM NaCl e 0,5% Tween 20). As membranas foram então incubadas por 12 h em temperatura ambiente com antiveneno botrópico (diluição na tabela 3.1) ou anticorpo anti-DNase II humana (diluição na tabela 3.1). Após lavagens, as membranas foram incubadas com um conjugado IgG-peroxidase anti-cavalo de coelho ou conjugado IgG-peroxidase anti-coelho de cabra (diluídos de acordo com a tabela 3.1), respectivamente. Ao final de 2 h, a membrana foi lavada e as bandas imunorreativas foram detectadas utilizando um kit de quimioluminescência (Millipore, EUA) e documentadas em filme fotográfico (Kodak, São José dos Campos, SP, Brasil).

Tabela 3.1: Resumo dos anticorpos utilizados.

Anticorpo primário			
Proteína	soro	antiveneno	DNase II
Organismo alvo	<i>Bothrops</i> sp	<i>Bothrops</i> sp	Humano
Organismo hospedeiro	Cavalo	Cavalo	Coelho
Diluição	1:1.000	1:1.000	1:1000
Origem	Butantan	Butantan	Sigma
Anticorpo secundário			
Organismo alvo	Cavalo	<i>Bothrops</i> sp	Coelho
Organismo hospedeiro	Coelho	Cavalo	Cabra
Diluição	1:5.000	1:1.000	1:20.000
Conjugado	Peroxidase	Peroxidase	Peroxidase
Origem	Sigma	-	Sigma
Técnica	<i>Western-blotting</i>	ELISA	<i>Western-blotting</i>

Purificação de IgG

Imunoglobulinas (IgG) totais foram purificadas por cromatografia de afinidade a partir de antisoros botrópico e crotálico comerciais (Instituto Butantan). Dez mililitros de cada antisoro foram diluídos em tampão fosfato 20 mM, pH 7,0 (1:1 v/v) e 1 mL foi adicionado a uma coluna HiTrap proteína G-Sepharose (1 mL) previamente equilibrada com o mesmo tampão. Após lavagem da coluna para remover proteínas não aderidas, as IgGs foram eluídas com tampão glicina-HCl 100 mM, pH 2,7. As frações (1 mL) foram coletadas em tubos contendo 100 µL de tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 9,0 para corrigir o pH para ~7,0. O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm e as frações contendo IgG foram agrupadas, dialisadas contra água e liofilizadas.

ELISA direto

A reatividade cruzada da DNase com antiveneno botrópico foi examinada por ELISA conforme descrito por VALÉRIO *et al.* (2002). Os poços de placas de 96 poços foram sensibilizados com 100 μL de antiveneno (diluído como descrito na tabela 3.1, em carbonato de amônia 0,1 M, pH 8,9 - tampão de ligação) *overnight* a 4°C. Os poços foram lavados com PBS, e a estes foram adicionados peçonha ou DNase numa curva de diluição de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 1 ng/mL (em 100 μL), seguida da incubação por 1 h à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais com PBS, 100 μL de conjugado de IgG-peroxidase anti-botrópico eqüino foi adicionado para permitir a reação com os antígenos (incubação de 1 h à temperatura ambiente). Após uma série final de lavagens, a solução de substrato (100 μL de 0,2 mg de o-fenilenodiamina/mL e 0,05% H_2O_2 em tampão citrato 0,15 M, pH 5,0) foi adicionada e a placa incubada no escuro em temperatura ambiente por até 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 20 μL de H_2SO_4 e a absorbância final foi medida a 492 nm em um leitor de placas SpectraMax 340.

Caracterização estrutural

Composição de aminoácidos

A composição de aminoácidos foi determinada conforme descrito por BEGHINI *et al.* (2000). Após hidrólise de amostra em HCl 6 N contendo fenol 0,1% durante 24 h à 110°C, os aminoácidos foram derivados com o-ftaldialdeído e separados por HPLC de

fase reversa. A identificação dos aminoácidos foi feita comparando os tempos de retenção com uma mistura de aminoácidos padrões marcados com o-ftaldialdeído.

Espectrometria de massas

A DNase II purificada (pico I da gel filtração em HPLC) foi adicionada a uma microplaca e, após o solvente ter evaporado, acrescentou-se a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinamico (1% (m/V) em H₂O/ACN 1:1 (v/v) (1 μ L) contendo 0,1% de TFA) que foi novamente incubada à temperatura ambiente para secar. As análises foram feitas em espectrômetro de massa MALDI-ToFMS (***Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry***) (Waters, Micromass, UK). As análises foram realizadas exclusivamente com íons positivamente carregados, e modo *reflectron*.

RESULTADOS

Neste capítulo apresentamos os resultados do isolamento e purificação da DNase ácida da peçonha de *B. alternatus* e, em seguida, sua caracterização físico-química, enzimática e imunológica. No capítulo seguinte, descrevemos o envolvimento desta enzima na apoptose.

A metodologia de purificação descrita aqui foi estabelecida por nós com base em purificações de outras DNases (YASUDA *et al.*, 1992; BARRY e EASTMAN, 1993), já que até o momento nenhuma DNase havia sido isolada, com alto grau de pureza, de peçonhas ofídicas. Para isso, diversas etapas e condições foram testadas para melhorar a purificação da DNase II. As etapas cromatográficas descritas abaixo são as que ofereceram o melhor rendimento protéico e de atividade para a DNase II de *B. alternatus*.

Purificação da DNase II

Primeira etapa

A purificação da enzima foi iniciada com uma fase de captura em cromatografia de troca iônica em HiTrap[®] SP-Sepharose, com duas colunas acopladas em série para permitir uma carga inicial maior de proteína a ser adicionada (no caso 100-120 mg) e um rendimento melhor nas etapas seguintes. Esta coluna, apesar de seu pequeno volume (5 mL), possui uma grande capacidade/mL de resina. A base da troca iônica é a competição de íons presentes na coluna (neste caso a coluna é de troca catiônica)

pelas proteínas presentes na amostra, e subseqüentemente pela força iônica do tampão, capaz de retirar as proteínas que estão ligadas à coluna. Portanto, a escolha da força iônica do tampão e do pH influenciou bastante na melhor resolução da cromatografia. A DNase II tem como característica se ligar a sulfato (OSHIMA e PRICE, 1973; LIAO, 1985; IKEDA e TAKATA, 2002), portanto, se liga à resina da SP-Sepharose (sulfoxipentil-Sepharose). Desta forma, estudamos diversos tampões e diferentes pHs, e chegamos ao tampão acetato de sódio (30 mM) em pH 5,0 (figura 3.5) com 5 mM EDTA, ligando as proteínas de *B. alternatus* à coluna, para serem eluídas em um gradiente de NaCl (0-1 M) não-linear. Este tampão também não interferiu na atividade enzimática da DNase II, e além disso, pôde ser utilizado nas etapas cromatográficas seguintes, evitando dessa forma diálises entre as etapas cromatográficas. Este tampão não interferiu na atividade enzimática da DNase II, mantendo uma boa estabilidade da enzima, a 18-20°C (temperatura durante a cromatografia) e a 4°C (temperatura de armazenamento entre as etapas).

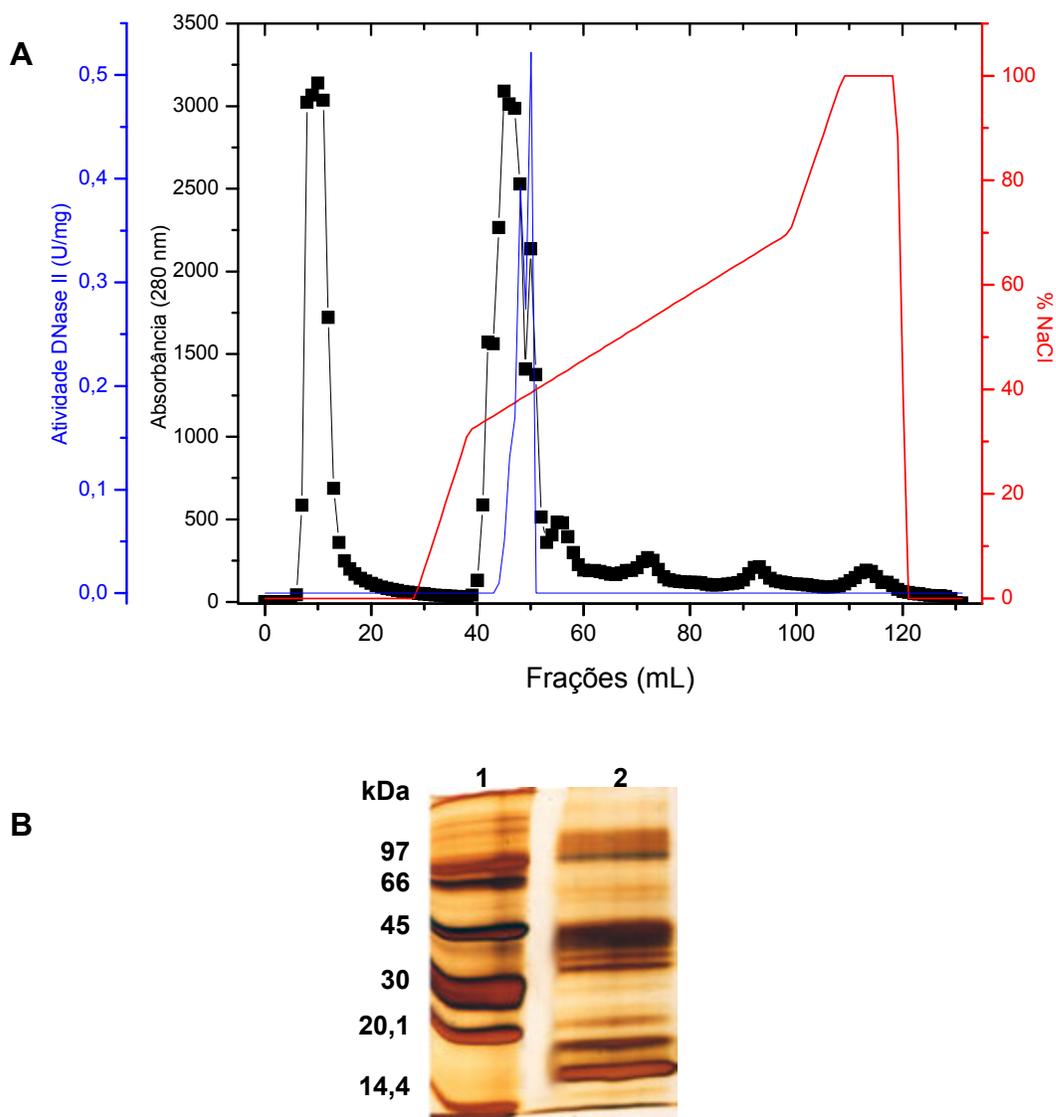


Figura 3.5: (A) Cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap[®] SP-Sepharose (10 mL) da peçonha de *B. alternatus*. A amostra (100 mg) foi aplicada à coluna, conforme descrito em Materiais e Métodos. A coluna foi lavada com tampão acetato de sódio 30 mM, pH 5,0, com 5 mM EDTA (fluxo de 30 mL/h) e a eluição feita em gradiente não linear (0-1 M) de NaCl. A eluição foi monitorada a 280 nm. As frações (1 mL/tubo) foram coletadas e a atividade para DNase II (—■—) foi medida. Uma unidade de atividade = $A_{260} 0,001/\text{mL}/\text{min}$. (B) SDS-PAGE do pool de frações ativos para DNase II. 1 – Marcadores de massa molecular, 2 – Pool ativo da HiTrap[®] SP-Sepharose.

Segunda etapa

As frações eluídas da HiTrap[®] SP-Sepharose contendo atividade de DNase II foram eluídas com 0,35 a 0,4 M de NaCl, o qual precisava ser removido para dar continuidade à purificação, pois seriam utilizadas colunas de afinidade nas etapas seguintes. Para remoção do sal, utilizamos a centrifugação em filtros Amicon com limite de filtração de 5.000 Da e várias lavagens com o tampão acetato de sódio 30 mM, pH 5,0, e 5 mM EDTA. Esse procedimento teve vantagem de também concentrar a amostra que seria usada na etapa seguinte.

Em seguida, utilizando uma cromatografia de afinidade/troca iônica em coluna HiTrap[®] heparina-Sepharose (5 mL), a DNase II foi eluída em um gradiente de NaCl em concentrações de 0,7 a 0,95 M (figura 3.6). A heparina imobilizada possui dois modos de interação com as proteínas: o primeiro é funcionar como um ligante de afinidade, principalmente para fatores de coagulação, e o segundo, utilizado por nós, é a sua alta capacidade de troca catiônica, devido à presença de grupos sulfato. Em ambos os casos, um gradiente de sal poderia eluir as proteínas ligadas.

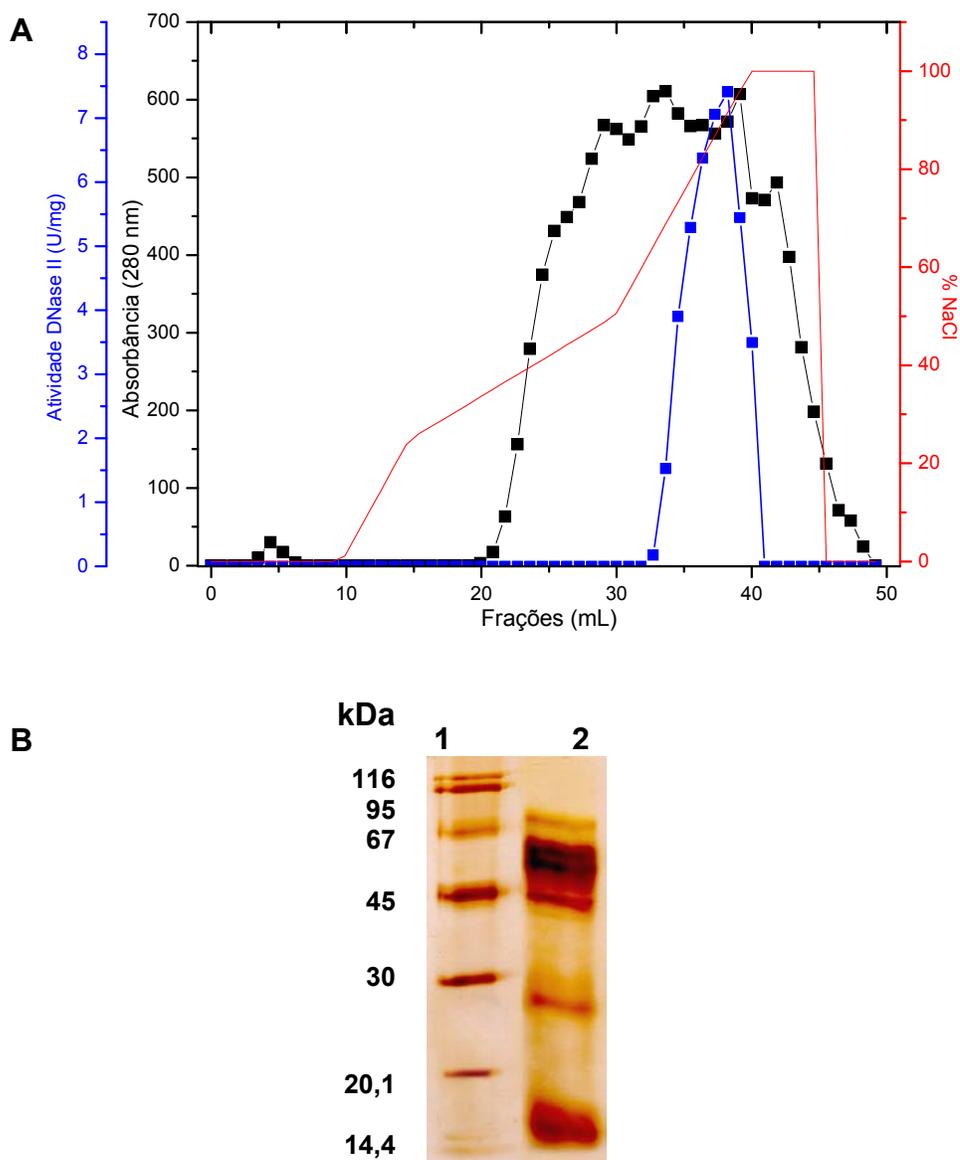


Figura 3.6: (A) Cromatografia de afinidade em coluna HiTrap[®] heparina-Sepharose (5 mL). O pool de frações (41 mg) contendo atividade de DNase II da etapa anterior foi aplicado à coluna conforme descrito em Materiais e Métodos. A coluna foi lavada com tampão acetato de sódio 30 mM, pH 5,0, com 5 mM EDTA (fluxo de 60 μ L/h), e as proteínas eluídas em gradiente não-linear de NaCl (0-1 M). A eluição foi monitorada a 280 nm e as frações (1 mL/tubo) coletadas. A atividade de DNase II (—■—) foi medida. (B) SDS-PAGE do pool de frações ativas da heparina-Sepharose. 1 – Marcadores de massa molecular; 2 – Pool ativo da HiTrap[®] heparina-Sepharose.

Terceira etapa

Na terceira etapa da purificação, foi realizada uma gel filtração em Superdex 75. As frações contendo atividade de DNase II provenientes da troca iônica em HiTrap[®] heparina-Sepharose foram juntadas e concentradas em filtro Amicon para serem aplicadas à coluna de gel filtração. A concentração da amostra foi um passo importante para obter uma melhor separação das proteínas, já que, idealmente, o volume da amostra aplicado a uma coluna de gel filtração não deve ser superior a 1% do volume da mesma. Utilizamos a gel filtração como ferramenta para trocar o tampão para a etapa seguinte; o tampão de troca foi acetato de sódio 30 mM, pH 6,0, contendo 5 mM EDTA e 0,5 M NaCl. A figura 3.7a mostra que não houve distinção de picos, porém, o perfil eletroforético (figura 3.7b) mostrou que algumas proteínas de alta massa molecular foram praticamente removidas, e a banda correspondente a DNase II se tornou mais evidente.

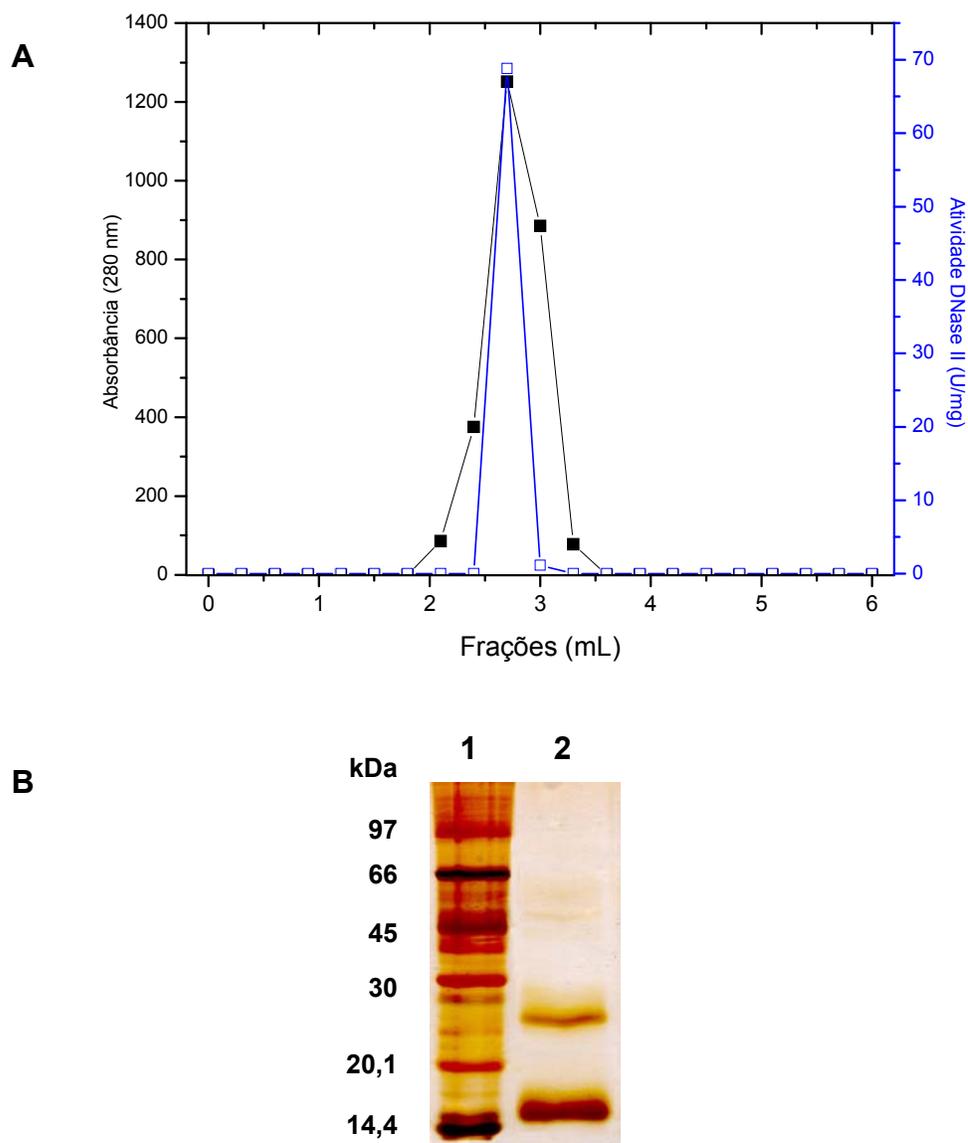


Figura 3.7: (A) Cromatografia de gel filtração em coluna Superdex 75. O pool de frações (10,9 mg) contendo atividade de DNase II da etapa anterior foi aplicado à coluna Superdex 75 conforme descrito em Materiais e Métodos. A coluna foi eluída com tampão acetato de sódio 30 mM, pH 6,0, com 5 mM EDTA e 0,5 M NaCl (fluxo de 12 mL/h). A eluição foi monitorada a 280 nm e as frações (1 mL/tubo) coletadas. A atividade para DNase II (—■—) foi medida. (B) SDS-PAGE do pool de frações ativas para DNase II da Superdex 75. 1 – Marcadores de massa molecular; 2 – Pool ativo da Superdex 75.

Quarta etapa

A cromatografia de afinidade em ConA-Sepharose foi utilizada para a purificação da DNase II como quarta etapa. Nesta etapa, NaCl 0,5 M de foi adicionado ao tampão de equilíbrio e lavagem para evitar interações inespecíficas. A figura 3.8a mostra que a atividade da DNase II não foi retida na coluna, ao contrário do que era esperado. As DNases II descritas na literatura possuem glicosilações necessárias para sua atividade enzimática (YASUDA *et al.*, 1999; MACLEA *et al.*, 2002; SHIOMI *et al.*, 2004), e o esperado era que a nossa se ligasse à ConA (YASUDA *et al.*, 1993). Porém, apesar da DNase II não se ligar a ConA-Sepharose, mantivemos esta etapa e o tampão contendo NaCl por dois motivos. Em primeiro lugar, porque apesar da DNase não se ligar à coluna, outras proteínas de massa molecular superior, provavelmente glicoproteínas, que não foram removidas na etapa de gel filtração, se ligaram à ConA especificamente e, desta forma, puderam ser eliminadas. Em segundo lugar, a purificação, apesar de necessitar de uma etapa a mais, se tornou reproduzível, e com um melhor rendimento da DNase II. Para garantir a remoção de todas as proteínas da coluna, após o gradiente de D-glicose, utilizamos o tampão Tris-borato 100 mM, pH 6,5, contendo 1 M NaCl, que removeu proteínas fortemente ligadas à coluna.

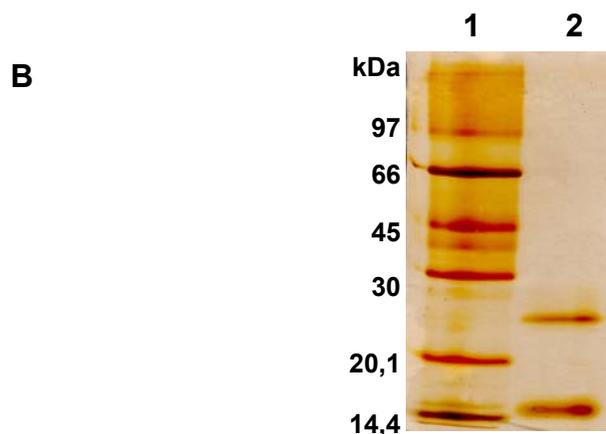
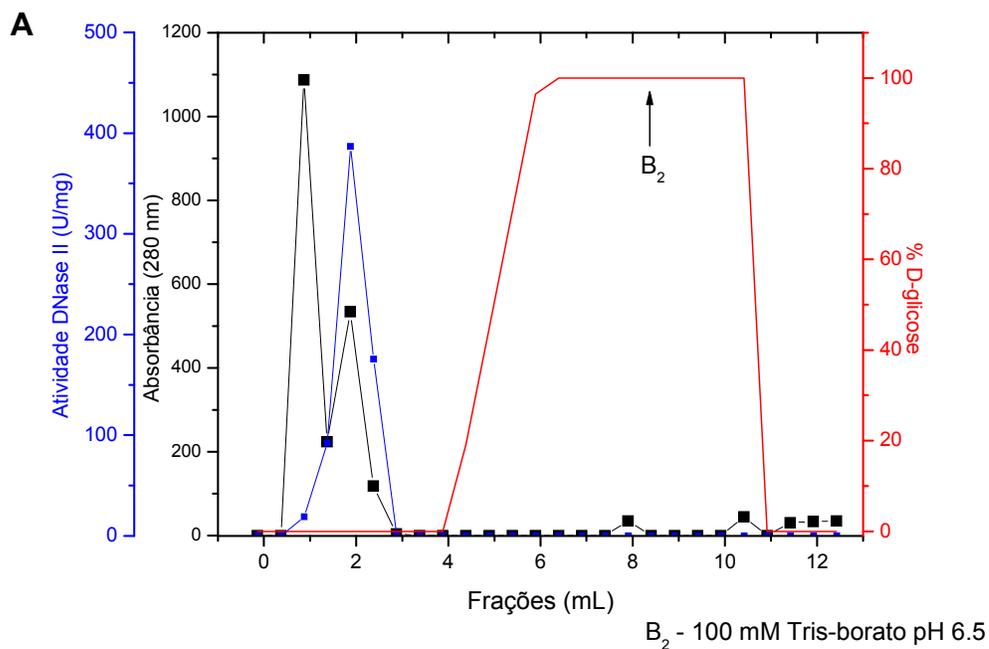


Figura 3.8: (A) Cromatografia de afinidade em coluna ConA-Sepharose. O pool de frações (7,2 mg) contendo atividade de DNase II da etapa anterior foi aplicado à coluna conforme descrito em Materiais e Métodos. A coluna foi lavada com tampão acetato de sódio 30 mM, pH 6,0, contendo 5 mM EDTA e 0,5 M NaCl (fluxo de 30 mL/h), e as proteínas ligadas foram eluídas em gradiente linear (0-1 M) de D-glicose. A seta indica o momento em que o tampão Tris-borato 100 mM, pH 6,5, 1 M NaCl foi adicionado. A eluição foi monitorada a 280 nm e as frações (0,5 mL/tubo) coletadas. A atividade para DNase II (—■—) foi medida. (B) SDS-PAGE do pool de frações ativas para DNase II da ConA-Sepharose. 1 – Marcadores de massa molecular; 2 – Pool ativo de ConA-Sepharose.

Quinta etapa

Para a etapa final do isolamento da DNase II, e já que observamos que no SDS-PAGE da fração ativa da ConA-sepharose havia duas bandas de diferentes tamanhos (uma em torno de 26 kDa e outra em torno de 15 kDa), realizamos uma quinta e última etapa de purificação, utilizando uma nova gel filtração, porém em uma coluna de HPLC. A figura 3.9 mostra a resolução da cromatografia de gel filtração em coluna BioSuite UHR (*ultra-high resolution*) SEC (*size-exclusion chromatography*) (4,6 cm x 300 cm) (Waters) utilizando a pressão de 8 MPa em HPLC. Houve separação das bandas principais vistas na figura 3.8a. A atividade da DNase II acompanhou o pico I, correspondendo à maior banda no SDS-PAGE (figura 3.8b). Como a coluna permite o uso do mesmo tampão acetato de sódio e pH 5,0, usado nas etapas anteriores e fundamental para a manutenção da atividade da DNase, tivemos um bom rendimento de atividade da enzima, como observamos na tabela 3.1. A figura 3.10 resume as etapas cromatográficas usadas na purificação da DNase II de *B. alternatus*.

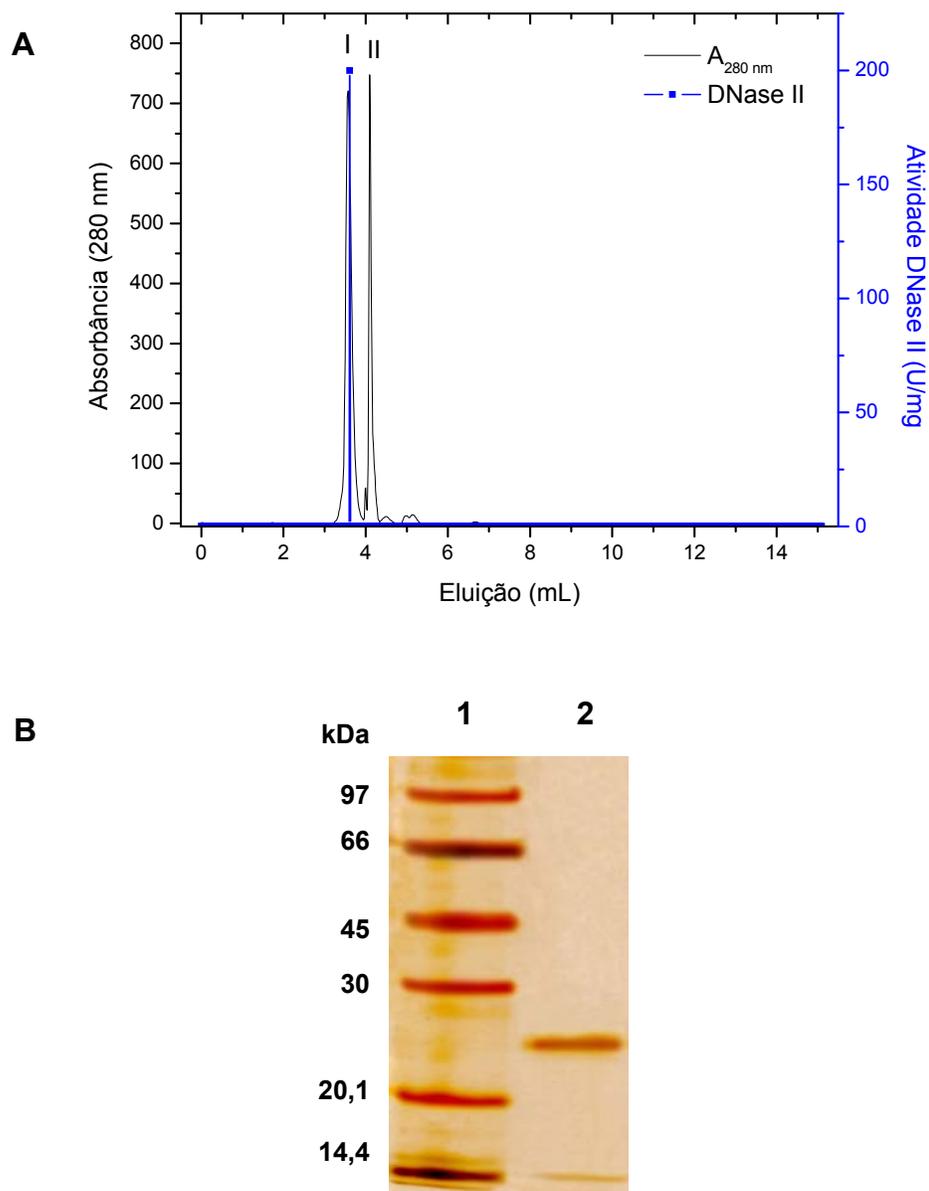


Figura 3.9: (A) Cromatografia de gel filtração em coluna BioSuite UHR SEC 250 (4,6 cm x 300 cm). O pool de frações (140 μ g) contendo atividade de DNase II da etapa anterior (ConA sepharose) foi aplicado à coluna BioSuite conforme descrito em Materiais e Métodos. A coluna foi eluída com tampão acetato de sódio 30 mM, pH 5,0, com 5 mM EDTA e fluxo de 21 mL/h. A eluição foi monitorada a 280 nm e as frações (0,5 mL/tubo) coletadas. A atividade para DNase II (—) foi medida. (B) SDS-PAGE do pool de frações ativas para DNase II da ConA-Sepharose. 1 – Marcadores de massa molecular; 2 – Pool ativo de ConA-Sepharose.

Tabela 3.2: Purificação e rendimento da DNase II de *B. alternatus*.

	Proteína (mg)	Proteína (mg/mL)	Volume (mL)	Atividade (U/mL)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento protéico (%)	Rendimento atividade (%)	Fator de purificação
Peçonha	100	100	1	6500	6500	65	100	100	1,0
SP-Sepharose	41	5,125	8	439	3513	86	41	54	1,3
Heparina-Seph.	11	3,633	3	656	1967	180	11	30,3	2,8
Superdex 75	7,2	3,6	2	935	1870	260	7,2	28,8	4,0
ConA-Sepharose	1,4	0,575	2,5	592	1480	2156	1,4	22,8	15,8
BioSuite UHR	0,18	0,36	0,5	1256	628	3489	0,18	9,7	53,7

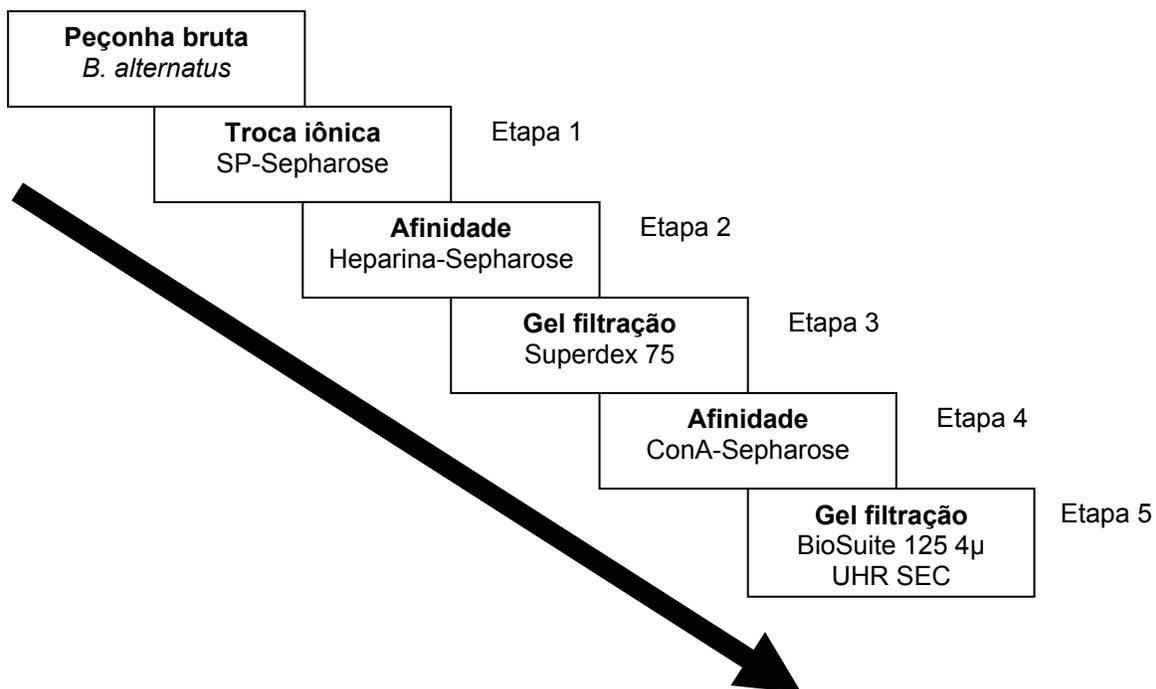


Figura 3.10: Esquema das etapas cromatográficas utilizadas na purificação da DNase II.

Caracterização físico-química da DNase II purificada de *B. alternatus*

O contato com solventes como acetonitrila para cromatografia de fase reversa por HPLC resultou em perda de atividade enzimática, o que excluiu o seu uso para obtenção de enzima ativa. Entretanto, a cromatografia do pool da ConA-Sepharose por fase reversa em uma coluna SOURCE 15 RPC para verificar a pureza da DNase resultou no perfil mostrado na figura 3.11, sendo um dos picos majoritário em relação aos outros. Embora destituída de atividade enzimática (devido à inativação causada pela acetonitrila usada como solvente na cromatografia), o pico principal correspondeu a uma proteína com a mesma massa molecular (figura 3.11b) que a DNase II encontrada no esquema de purificação descrita acima. Portanto, assumimos que este pico correspondia à DNase II e ele foi usado para testes de caracterização que não exigiam atividade, e.g. eletroforese 2D para determinar o pI da proteína.

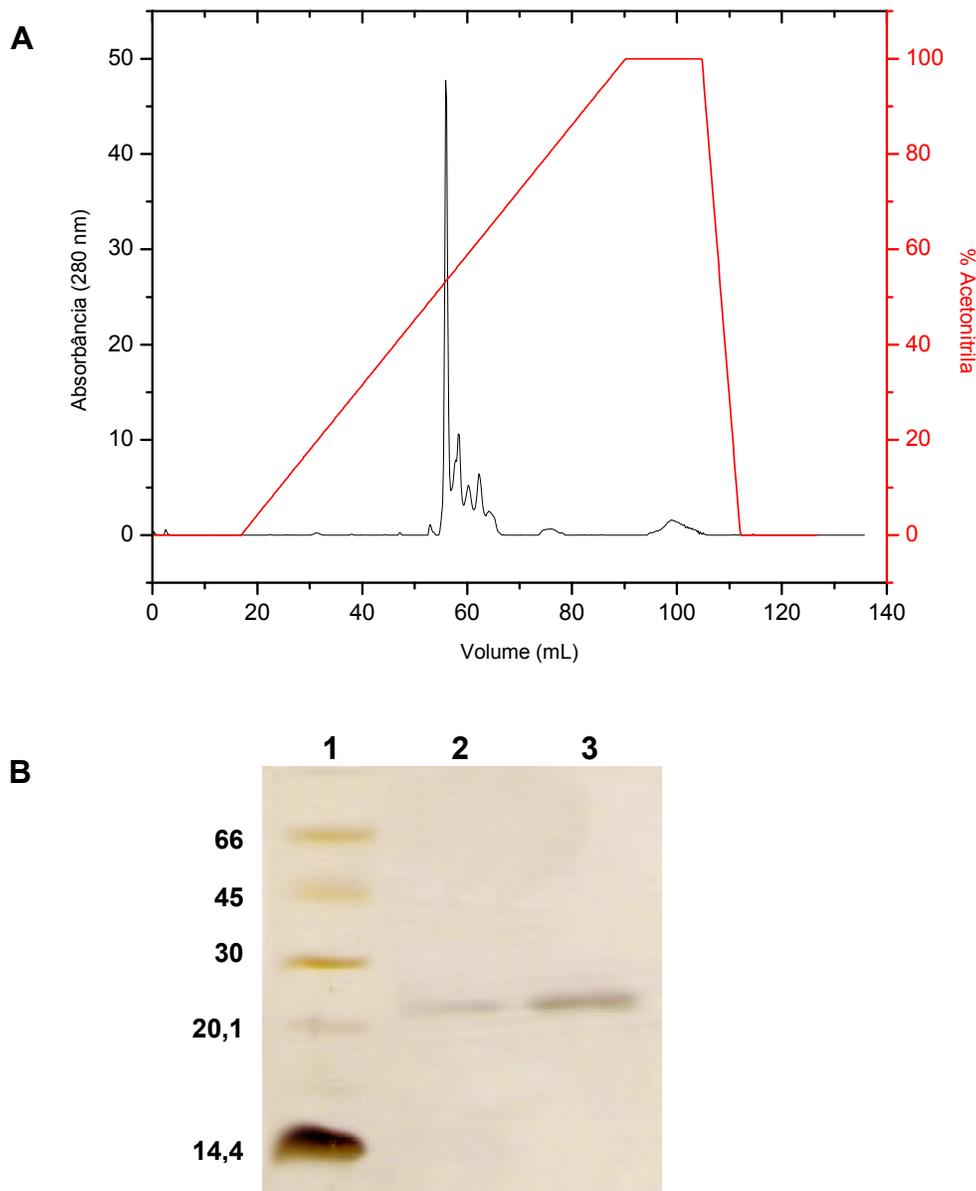


Figura 3.11: (A) Cromatografia de fase reversa em coluna SOURCE 15 RPC. O pool de frações (500 μ g) contendo atividade de DNase II da etapa anterior foi aplicado à coluna SOURCE 15 RPC conforme descrito em Materiais e Métodos. A coluna foi eluída com acetonitrila (fluxo de 60 mL/h), a eluição foi monitorada a 280 nm e as frações coletadas manualmente. (B) SDS-PAGE do pico principal da SOURCE 15 RPC 1 – Marcadores de massa molecular; 2 e 3 – DNase II sem e com DTT, respectivamente.

Eletroforese bidimensional (2D)

Analizamos a amostra da DNase II obtida a partir da cromatografia de fase reversa SOURCE 15 RPC em eletroforese de duas dimensões (2D-PAGE) para determinar o pI da enzima. Conforme mostrado na figura 3.12, a primeira dimensão de 2D foi feita em uma fita contendo um gradiente de pH linear de 3 a 10, e a segunda dimensão foi realizada por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida de 10%. Foram identificados quatro *spots* (numerados de 1 a 4, começando da esquerda para a direita/cima para baixo). Os dois primeiros *spots* mostraram uma maior intensidade quando comparados aos outros dois. Uma análise de regressão linear obtida baseada na migração eletroforética relativo aos padrões de massa molecular indicou uma mesma massa molecular de aproximadamente 25,3 kDa (figura 3.13a), mas com pI distintos (*spot* 1: pI 4,4 e *spot* 2 pI 4,7; figura 3.13b). Os outros dois *spots*, menos intensos e definidos, possuem uma mesma massa molecular de 24 kDa com pI de 4,7 (*spot* 3) e 5,2 (*spot* 4).

A presença destes *spots* distintos, porém com massa molecular e pI muito próximos, nos fez questionar a presença de isoformas da DNase II na amostra, ou então modificações da proteína, como por exemplo fosforilação ou carbamilação devido à presença de urea. No SDS-PAGE anterior ao 2D, a banda observada era única, assim como o pico da SOURCE 15RPC de onde foi coletada.

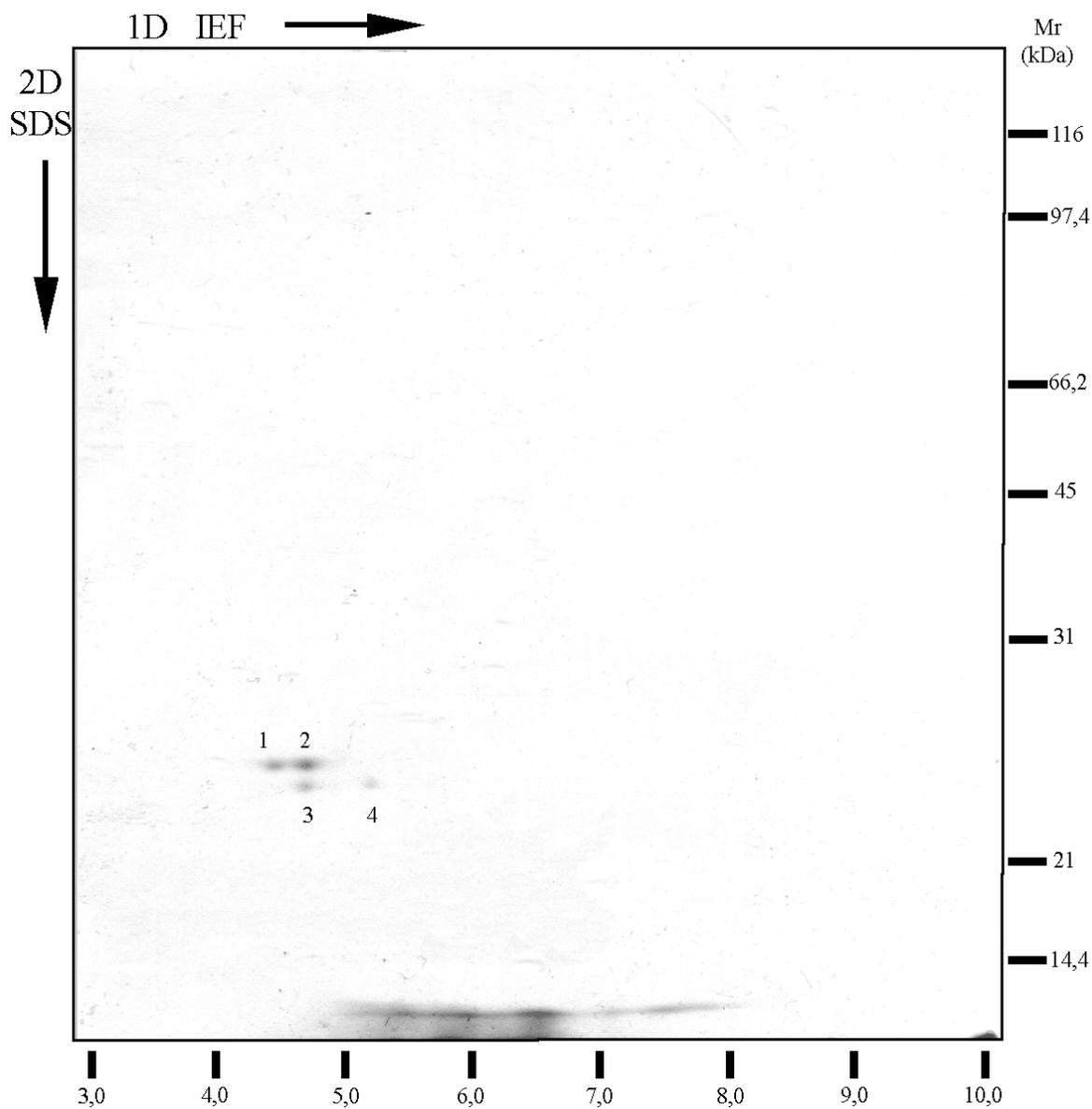


Figura 3.12: 2D-PAGE da DNase II purificada (80 ug, obtida da SOURCE 15 RPC). A eletroforese foi feita conforme descrita em Materiais e Métodos. A *strip* de IPG utilizada para a isoeletrofocalização (IEF) foi de pI 3 a 10, em escala linear. O padrão de massa molecular correu juntamente com a amostra.

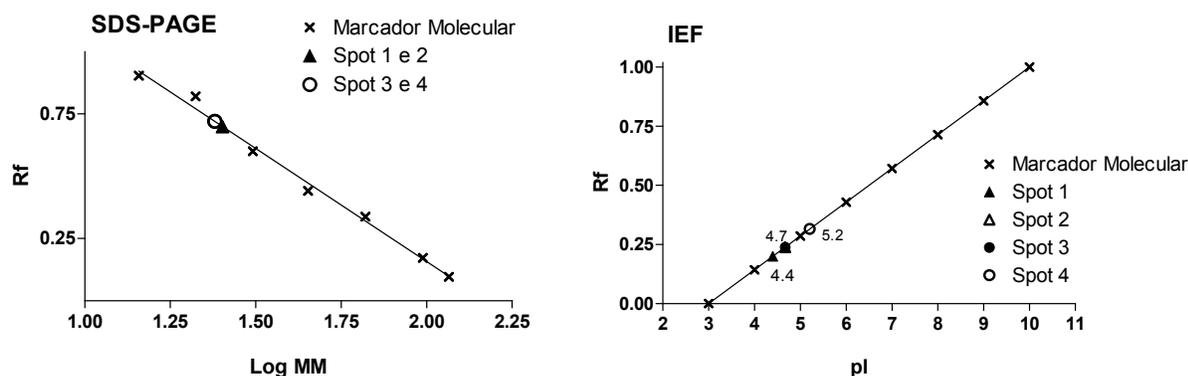


Figura 3.13: Estimativas da massa molecular e do pI da DNase II calculados a partir do gel de 2D-PAGE. (A) Massa molecular dos *spots*, (B) pI dos *spots*.

Espectrometria de massas

Analizamos a massa molecular da proteína intacta em espectrometria de massas. A figura 3.14 mostra o espectro da DNase obtido em MALDI-TOF, ou seja, correspondendo ao pico I obtido da gel filtração em HPLC. Observou-se um sinal mais intenso em m/z 31.481,5, que corresponde ao íon da forma mais abundante da proteína na amostra (DNase+H)⁺. Outros sinais menos intensos, com valores de m/z 15611.4 (DNase+H)²⁺ (menor que 50% de intensidade) ou 7975.3 Da (75% de intensidade) representariam outras formas iônicas da mesma proteína, provavelmente duplamente ou triplamente protonadas, pois não se observou outros sinais com intensidade suficiente para representar uma proteína contaminante.

Este espectro de massa também mostra que não existem sinais em massas aproximadas, que representariam os *spots* obtidos em gel 2-D, o que confirma a presença de apenas uma isoforma da DNase em nossa purificação.

O motivo da discrepância entre este valor de massa molecular para a DNase (31,5 kDa) e aquela obtida por métodos eletroforéticos (SDS-PAGE, 2D; ~24-26 kDa) pode refletir em parte a maior sensibilidade e precisão da espectrometria de massas quando comparada aos métodos eletroforéticos. Pode também ser que as condições desnaturantes usadas na eletroforese poderiam ter causado alguma modificação na proteína, eventualmente afetando sua migração no campo elétrico.

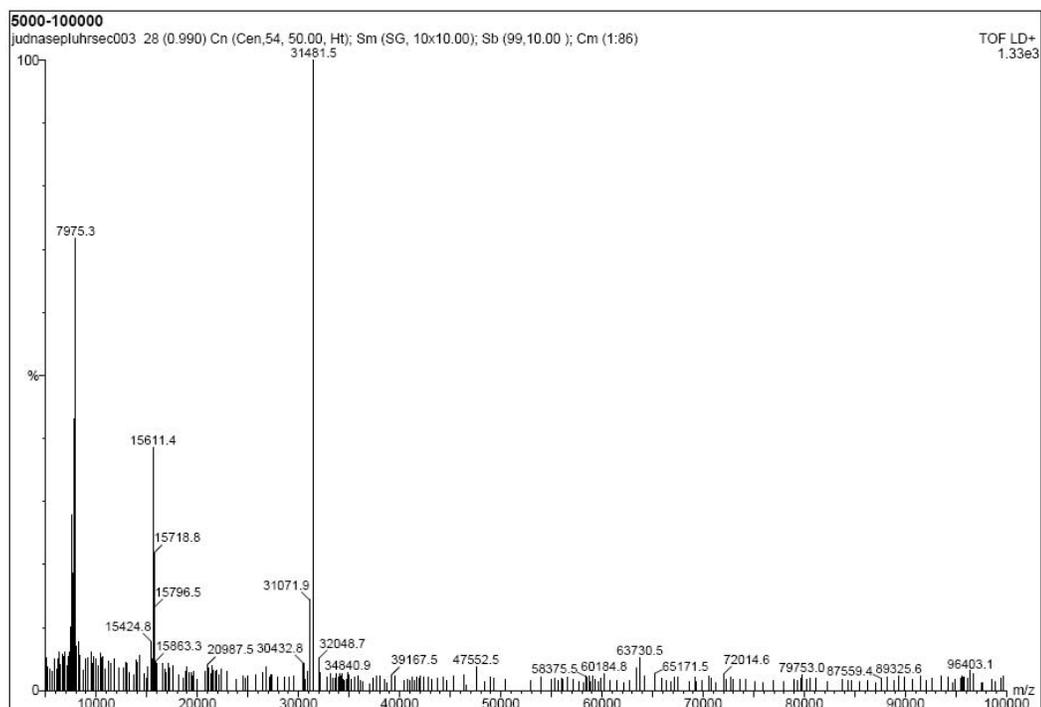


Figura 3.14: Espectro de massa MALDI-MS da amostra obtida no pico I da BioSource UHR SEC. Os valores de m/z estão indicados em cada sinal.

A tabela 3.2 mostra uma comparação preliminar da composição de aminoácidos da DNase II com outras enzimas correlatas descritas na literatura. A DNase de *B. alternatus* possui uma grande quantidade de aminoácidos hidrofóbicos,

principalmente glicina (G), leucina (L) e fenilalanina (F) e outros aminoácidos que são peculiares à DNase de *B. alternatus*, tais como aspartato (D) e glutamato (E). Há uma quantidade menor de cisteína (C) em relação às outras DNases, possivelmente devido ao fato de que a DNase de *B. alternatus* não possui subunidades, como algumas das DNases utilizadas para comparação na tabela 3.2, e portanto teria um número menor de pontes dissulfetos. O método de hidrólise converte os aminoácidos Asn em Asp, Gln em Glu e Trp é destruído, por isso não observamos a presença deste na tabela 3.3.

Tabela 3.3: Composição de aminoácidos da DNase de *B. alternatus* comparada com outras DNases II.

AA	<i>Mus musculus</i>		<i>Bos taurus</i>		<i>B. taurus α</i>		<i>Drosophila melanogaster</i>		<i>Gallus gallus</i>		<i>Trichinella spiralis</i>		<i>B. alternatus</i>	
Ala	25	7%	20	7%	25	7%	19	5%	22	6%	39	11%	10	4%
Cys	7	2%	6	2%	7	2%	7	2%	9	2%	6	2%	1	0%
Asp	17	5%	11	4%	17	5%	26	7%	15	4%	17	5%	25	11%
Glu	10	3%	11	4%	13	4%	17	5%	18	5%	11	3%	35	15%
Phe	18	5%	16	6%	19	5%	14	4%	15	4%	17	5%	28	12%
Gly	33	9%	26	9%	35	10%	27	7%	27	7%	19	6%	34	14%
His	9	3%	8	3%	10	3%	11	3%	10	3%	6	2%	4	2%
Iso	6	2%	4	1%	5	1%	10	3%	18	5%	19	6%	8	3%
Lys	17	5%	17	6%	19	5%	22	6%	16	4%	24	7%	6	3%
Leu	37	10%	24	9%	36	10%	35	10%	42	12%	22	6%	18	8%
Met	3	1%	2	1%	3	1%	3	1%	5	1%	6	2%	4	2%
Asn	12	3%	9	3%	13	4%	18	5%	16	4%	13	4%	-	-
Pro	25	7%	20	7%	24	7%	18	5%	16	4%	19	6%	8	3%
Gln	23	7%	17	6%	19	5%	19	5%	21	6%	15	4%	-	-
Arg	10	3%	9	3%	12	3%	15	4%	12	3%	7	2%	7	3%
Ser	33	9%	27	10%	35	10%	31	8%	38	10%	26	8%	24	10%
Thr	22	6%	15	5%	23	6%	18	5%	17	5%	31	9%	10	4%
Val	21	6%	15	5%	23	6%	28	8%	16	4%	25	7%	10	4%
Trp	12	3%	10	4%	13	4%	10	3%	11	3%	4	1%	-	-
Tyr	13	4%	9	3%	14	4%	17	5%	19	5%	16	5%	6	3%
TOTAL	353 ¹		276 ²		365 ³		365 ⁴		363 ⁵		342 ²		239	

Fontes: ¹BAKER *et al.*, 1998; ²MACLEA *et al.*, 2003; ³KRIESER e EASTMAN, 1998; ⁴ADAMS *et al.*, 2000;

⁵MACLEA e CHENG, 2006.

Caracterização imunológica da DNase II

A técnica de ELISA sanduíche direto (figura 3.15) mostrou reatividade entre IgG anti-botrópica purificada de antiveneno comercial por afinidade em coluna de proteína G-Sepharose e a DNase II da peçonha, porém ~200 vezes menor que a da peçonha (deslocamento da curva para a direita em pouco mais de duas unidades logarítmicas). A DNase também reagiu com a IgG crotálica (purificada por afinidade da mesma forma que a botrópica), sugerindo certa semelhança imunológica entre as enzimas destas duas peçonhas (dados não mostrados). Estes resultados indicam que apesar do conteúdo reduzido da DNase II na peçonha (~2%), a enzima é imunogênica e possui uma boa reatividade com o antiveneno.

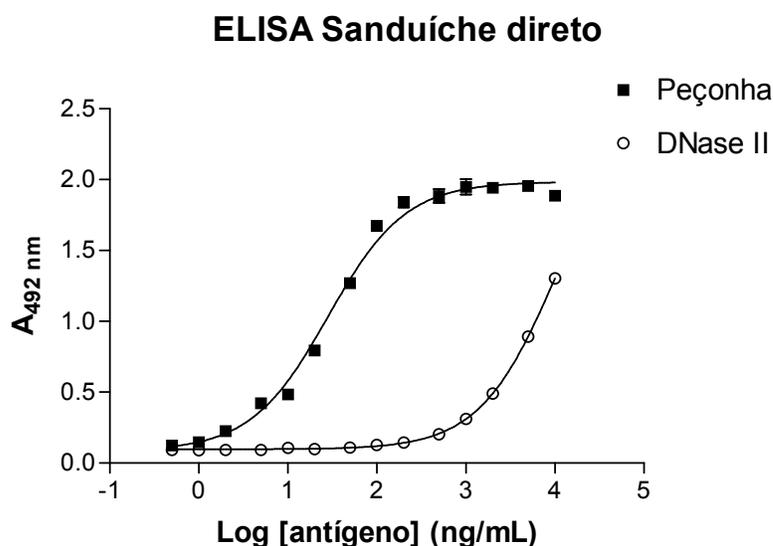


Figura 3.15: Imunorreatividade de IgGs totais de antiveneno botrópico purificadas com a DNase II da peçonha de *B. alternatus*. Os poços foram sensibilizados com IgG purificada seguida de incubação com a peçonha e/ou a DNase II e então com um conjugado IgG total peroxidase. A absorbância (492 nm) foi determinada após incubação com substrato e paralisação da reação com H₂SO₄. Os pontos da curva correspondem à média ± DP (n=3).

O *western blotting*, outro método imunológico, foi também realizado para verificar a reatividade com antiveno botrópico comercial. Este foi utilizado em paralelo ao SDS-PAGE para verificar se havia contaminação da amostra por outras proteínas que não DNase. O *western blotting* mostrou que a DNase II (obtida da última etapa em gel filtração) reagiu com antiveneno do Instituto Butantan. Apenas uma única banda imunoreativa, com massa molecular entre 20 e 25 kDa (semelhante à massa obtida por SDS-PAGE), foi vista no imunoblot (figura 3.16a).

O *western blotting* foi usado para analisar a reatividade cruzada entre a DNase II purificada e um anticorpo contra DNase II de origem humana. Conforme mostrado na figura 3.16b (faixa 2), a proteína purificada de *B. alternatus* foi reconhecida por este anticorpo. Observamos também que algumas bandas próximas à banda principal são reconhecidas na peçonha (figura 3.16b, faixa 1). A DNase II suína foi utilizada como comparação, e observamos que esta (figura 3.16b, faixa 3) resultou em duas bandas distintas, devido à utilização de DTT no tampão de amostra. Esses resultados mostram que a DNase II de *B. alternatus*, apesar de ser um polipeptídeo único sem subunidades, tem similaridades com DNases de mamíferos, no caso DNase II humana, que é composta por três cadeias polipeptídicas.

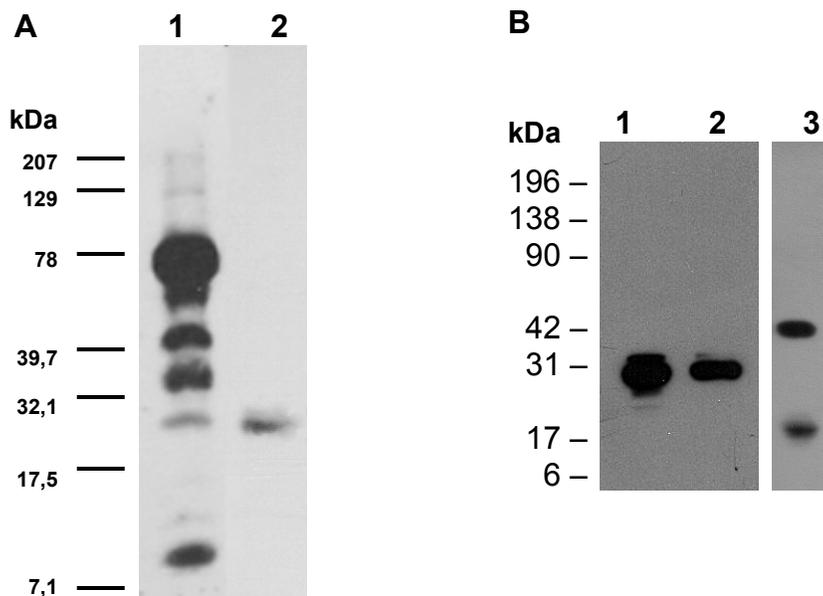


Figura 3.16: *Western blotting* da DNase II com antiveneno botrópico comercial (A) e com anticorpo anti-DNase II humana (B). A eletroforese da enzima purificada e ativa foi realizada em gel de poliácridamida de 10% a 100 V e as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF. Os marcadores moleculares (BioRad) correram em conjunto com a amostra e suas respectivas posição de migração estão indicadas à esquerda do gel acima. 1 – Peçonha de *B. alternatus* (25 µg em A e 5 µg em B); 2 – DNase II purificada (20 µg em A, 5 µg em B); 3 – DNase II suína (5 µg).

Caracterização Cinética da DNase II

A DNase II purificada possui um pH ótimo de atividade em 4,7 (figura 3.17a), porém ainda há atividade entre pH 4,5 e 6,5. A temperatura ótima para o ensaio enzimático é 37°C (dados não mostrados). Na avaliação da estabilidade térmica (figura 3.17b), a enzima reteve 60% da atividade após 15 min a 40°C, mas perdeu totalmente sua atividade quando aquecida por 15 min a $\geq 50^\circ\text{C}$. As DNases II relatadas na literatura variam quanto à sua estabilidade térmica: a DNase de baço (SHACK, 1959; LIAO, 1985), assim como a de *B. alternatus*, não é estável ao aquecimento, já a DNase II de células CHO (BARRY e EASTMAN, 1993) e de *Euglena gracilis* (IKEDA e TAKATA, 2002) são inativadas somente à 70°C e 80°C, respectivamente, enquanto que a DNase de *Cordyceps sinensis* tem atividade ótima a 50°C (YE *et al.*, 2004). A enzima pôde ser mantida a temperatura de 4°C durante as etapas cromatográficas sem perder atividade. Para armazenamento em longo prazo, o congelamento a -20°C foi adequado. A molaridade ideal para o tampão do ensaio enzimático foi de 150 mM de acetato de sódio (figura 3.17c).

A DNase II mostrou atividade sobre o DNA dupla fita (dsDNA ou *double-strand* DNA; Sigma) íntegro (ensaio padrão), e também sobre o mesmo DNA desnaturado por aquecimento a 100°C (porém com um terço da atividade vista sobre DNA íntegro); a enzima não mostrou atividade sobre polyA e RNA (figura 3.18). A DNase II também mostrou atividade sobre DNA circular dos plasmídeos pGEM (figura 3.18a) e pBR322 (figura 3.19b), de forma que podemos afirmar que esta enzima seja mesmo uma endonuclease.

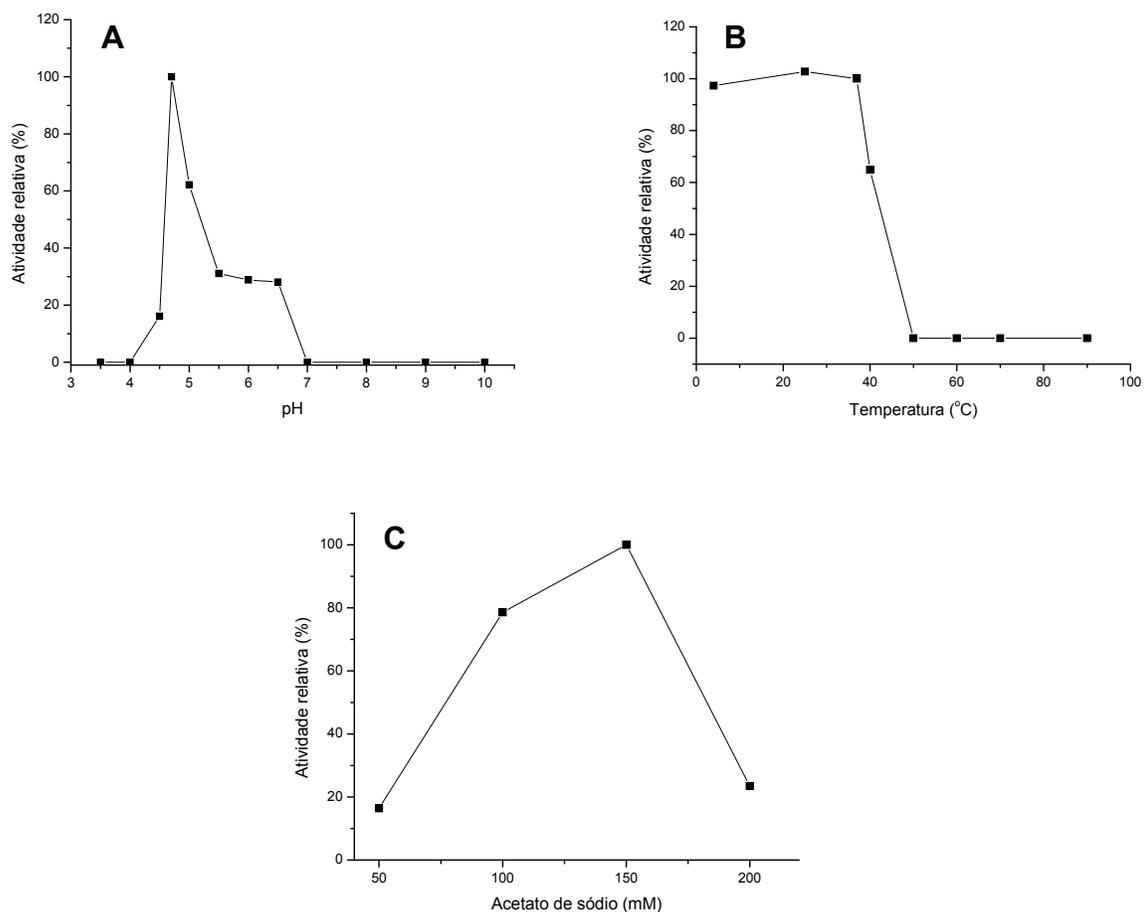


Figura 3.17: Efeito do pH, estabilidade térmica e concentração de sal do tampão na atividade enzimática da DNase II. Os gráficos mostram a atividade relativa ao ensaio em tampão acetato de sódio 150 mM, pH 4,7, contendo 75 µg de DNA/mL. (A) Efeito de pH – tampão glicina-HCl 10 mM, pH 3,5; tampão acetato de sódio 150 mM, pH 4,0 a 6,0; tampão Tris-HCl 10 mM, pH 6,5 a 8,0; tampão glicina-NaOH 10 mM, pH 9,0 e 10,0. (B) Estabilidade térmica – amostras de enzima foram aquecidas na temperatura indicada durante 15 min seguida por dosagem da atividade enzimática residual usando-se o ensaio enzimático padrão. (C) Influência da concentração (molaridade) de sal (acetato, pH 4,7) sobre a atividade enzimática. Os pontos são a média de três determinações.

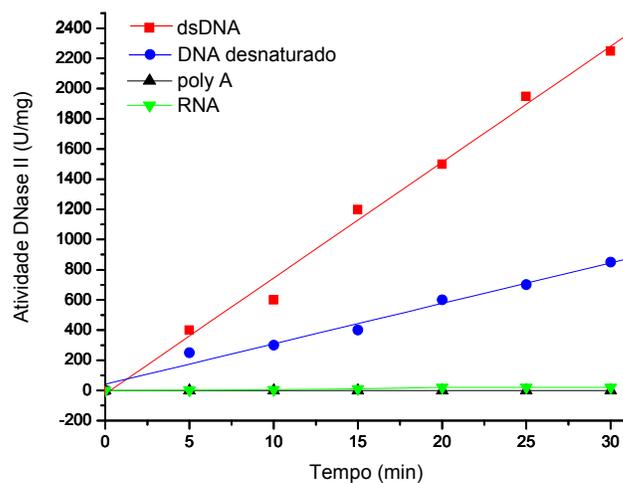


Figura 3.18: Atividade da DNase II sobre diversos substratos. Todos os ensaios foram realizados a 37°C, em tampão acetato de sódio 150 mM, pH 4,7.

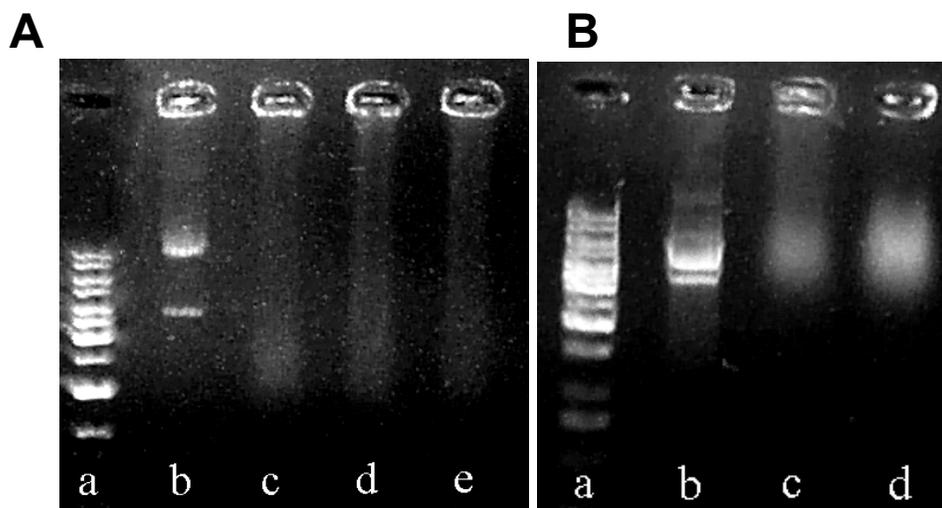


Figura 3.19: Atividade endonucleolítica da DNase II sobre DNA circular de plasmídeos. (A) plasmídeo pGEM: (a) marcador 1 kb, (b) controle sem enzima, e incubação com enzima por (c) 30 min, (d) 1 h, e (e) 2 h. (B) plasmídeo pBR322: (a) marcador 1 kb, (b) controle sem enzima, e incubação com enzima por (c) 30 min e (d) 1 h. Os ensaios foram realizados a 37°C, em tampão acetato de sódio 150 mM, pH 4,7.

A DNase II de *B. alternatus*, como determinado cineticamente, possui um $K_m = 10,1 \mu\text{g/mL}$ e $V_{\text{máx}} = 352,5 \text{ U/mg}$ (figura 3.20). A figura 3.21 mostra o efeito de cátions na atividade da DNase II de *B. alternatus*. As ações de Mg^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} foram semelhantes, sendo que com 1 mM houve inibição da atividade em 50% com os três; porém, na concentração de 10 mM dos íons a atividade se manteve inalterada ou aumentada (com Mn), e acima disso, com 100 mM ocorreu inativação da enzima com Mg^{2+} e Zn^{2+} , mas não com Mn^{2+} que ainda manteve uma atividade residual em 50%. Com o Ca^{2+} ocorreu uma inativação da DNase II concentração-dependente. SHIOMI *et al.* (2004) relataram que a plancitoxina (DNase II encontrada em *Acanthaster planci*) é também inibida por cátions divalentes, como Mg^{2+} . Estes dados, associados ao de que o EDTA não é capaz de inibir a enzima (tabela 3.4), confirmaram que atividade enzimática da DNase ácida de *B. alternatus* é cátion independente, como ocorre com a maioria das DNases do tipo II encontradas na literatura (BERNARDI *et al.*, 1966; OSHIMA e PRICE, 1973; LIAO *et al.*, 1989; BARRY e EASTMAN, 1993; WANG *et al.*, 1998; COUNIS e TORRIGLIA, 2000; IKETA e TAKATA, 2002; EVANS e AGUILERA, 2003; CHENG *et al.*, 2006).

A tabela 3.4 mostra a ação de outras substâncias sobre a atividade endonucleásica. A N-etilmaleimida, iodoacetamida e DTT, mesmo em baixas concentrações, inibiram a atividade da DNase, o que não tem sido observado em outras DNases, ou somente ocorre inibição parcial (DULANEY e TOUSTER, 1972; BARRY e EASTMAN, 1993). O ácido aurintricarboxílico é reconhecido como um potente inibidor de nucleases, bloqueando a fragmentação de DNA, e isso foi confirmado aqui com inibição total da atividade da DNase II purificada (tabela 3.4).

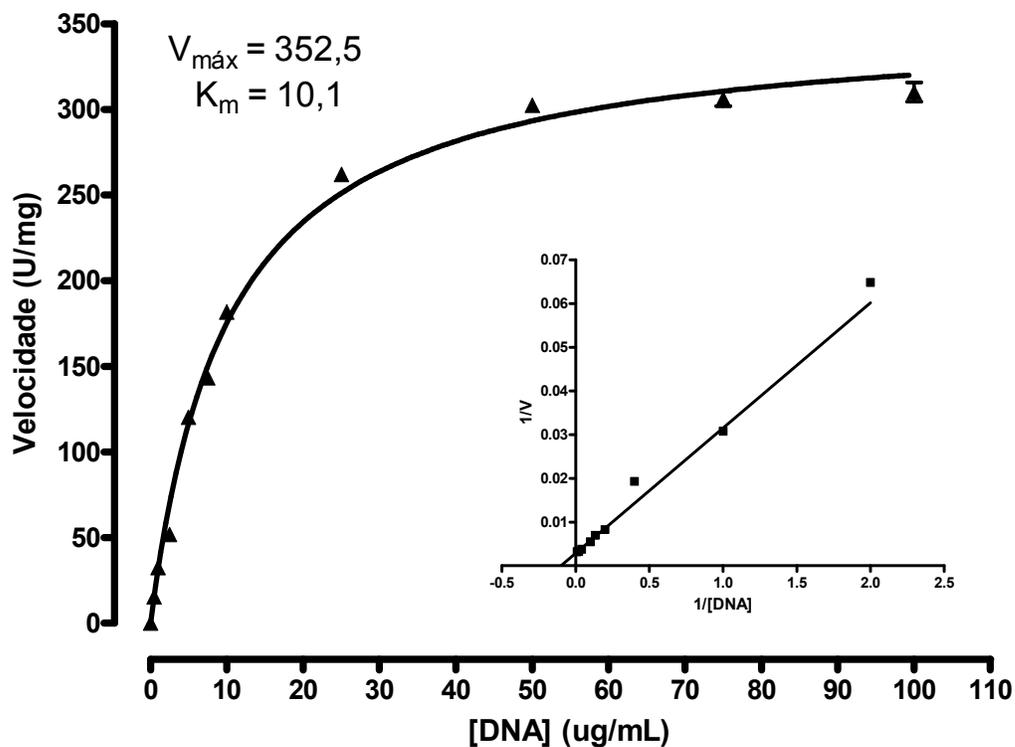


Figura 3.20: Efeito da concentração de DNA na atividade da DNase II de *B. alternatus*, e determinação dos parâmetros cinéticos. Os pontos representam a média \pm DP ($n=3$).

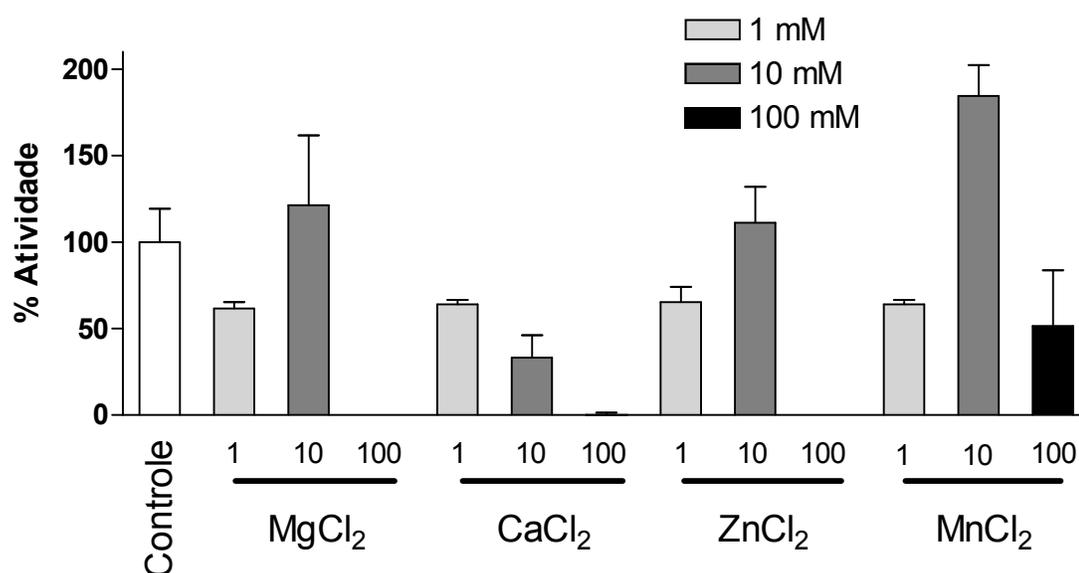


Figura 3.21: Influência de cátions bivalentes na atividade da DNase II. Os íons foram adicionados ao ensaio para fornecer as concentrações indicadas. Os pontos representam a média + DP de três ensaios independentes realizados em duplicata.

Tabela 3.4: Influência de diferentes reagentes na atividade da DNase II. As substâncias testadas foram adicionadas ao ensaio para fornecer as concentrações indicadas. Os valores são a média de três ensaios independentes realizados em duplicata.

Inibidores	Concentração (mM)	Inibição da DNase <i>B. alternatus</i> (%)	Inibição da DNase II suína (%)	Inibição da DNase I bovina (%)
N-Etilmaleimida	1	98	0	0
	10	98	10	0
Iodacetamida	1	87	0	0
	10	100	0	0
Ácido aurintricarboxílico	25	100	100	100
EDTA	1	0	0	0
	5	0	0	0
DTT	1	96	0	0

DISCUSSÃO

Os estudos sobre DNases e sua atividade em diferentes tecidos, células e organismos têm como objetivo revelar a estrutura e função desta classe de enzimas (CYMERMAN *et al.*, 2005; CHENG *et al.*, 2006), principalmente relacionando-a com a atividade pró-apoptótica (BARRY e EASTMAN, 1993; EVANS e AGUILERA, 2003; MACLEA *et al.*, 2006; COUNIS e TORRIGLIA, 2006). Apesar desta intensa investigação e caracterização bioquímica das DNases nos mais diversos organismos, pouco se conhece sobre a atividade destas enzimas extraídas de peçonhas, e o foco tem sido principalmente a DNase I (TABORDA *et al.*, 1952; GEORGATSOS e LASKOWSKI, 1962; LASKOWSKI, 1980; SITTENFELD *et al.*, 1991; DE ROODT *et al.*, 2003) sendo que apenas GEORGATSOS e LASKOWSKI (1962) realizaram uma caracterização mais detalhada.

Conforme demonstrado aqui, isolamos a DNase ácida da peçonha de *B. alternatus* usando uma combinação de cinco etapas cromatográficas. Esta metodologia resultou em um fator de purificação de ~54 vezes com recuperação de 180 µg de proteína a partir de 100 mg da peçonha de *B. alternatus*. A escolha do tampão acetato de sódio em pH 5,0 ou 6,0 foi muito importante para o sucesso da purificação, pois, além de permitir a estabilidade da enzima, ainda eliminou a presença de outras enzimas com atividade sobre ácidos nucleicos ou grupamentos fosfato, como a fosfodiesterase, a 5'-nucleotidase e fosfatase ácida. Nas condições de purificação usadas aqui, tais enzimas não eram estáveis nestas, e nem ativas neste pH. Em comparação com as DNases purificadas de outros organismos, onde o rendimento

pode ser >10% (DULANEY e TOUSTER, 1972; SHIOMI *et al.*, 2004), o rendimento (em µg de proteína) da enzima de *B. alternatus* (0,18%) foi baixa, porém está dentro da faixa observada para muitas enzimas que ocorrem em baixas concentrações em peçonhas ofídicas, como por exemplo, a fosfodiesterase desta mesma peçonha (VALÉRIO *et al.*, 2002).

A DNase II de *B. alternatus* possui uma massa molecular de 25,4 kDa, (SDS-PAGE) (31,1 kDa por espectrometria de massas), valor este que não foi afetado por redução com β-mercaptoetanol ou DTT, indicando que se trata de uma proteína de cadeia única. Este valor é bastante semelhante à maioria das DNases ácidas, que normalmente possuem massa molecular entre 26 e 46 kDa (LESCA, 1975; LIAO *et al.*, 1989; YASUDA *et al.*, 1992; RIBEIRO e CARSON, 1993; SHIOKAWA *et al.*, 1994). A análise de aminoácidos também indicou que a DNase II se assemelha a outras DNases II quanto ao seu conteúdo de resíduos.

SHIOMI *et al.* (2004) relataram que a plancitoxina por eles purificada (com atividade de DNase) foi reduzida por DTT porém não por β-mercaptoetanol. Há varios estudos mostrando que as DNases II podem conter diferentes subunidades em forma de heterodímeros com massas moleculares de 35 kDa e 10 kDa, ou heterotrimeros (LIAO, 1985; WANG *et al.*, 1998; TAKESHITA *et al.*, 1998; SHIOMI *et al.*, 2004). Com base em estudos de expressão, MACLEA *et al.* (2002) propuseram que a DNase II humana é composta por um polipeptídeo contíguo, e que a observação de cadeias diferentes seria resultado de proteólise durante a purificação da proteína. Outros estudos também sugerem que a DNase II é um polipeptídeo de cadeia única, com

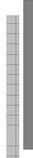
diferentes massas moleculares variando de 25 kDa a 40 kDa. Exemplos disso incluem DNases II de fígado de rato ~36-38 kDa (DULANEY e TOUSTER, 1972), urina humana ~32 kDa (YASUDA *et al.*, 1992), mucosa gástrica e cervix humano ~38 kDa (YAMANAKA *et al.*, 1974), fígado bovino ~26 kDa (LESCA, 1975), linfoblastos humanos ~45 kDa (HAROSH *et al.*, 1991), o fungo *Cordyceps sinensis* ~34 kDa, e 42 kDa do bivalve *Chlamys islandica* (OVERBO e MYRNES, 2006). Nossos resultados indicam que a DNase II purificada de *B. alternatus* é um polipeptídeo de cadeia única como a DNase II bovina (LESCA, 1975), ao contrário da DNase II suína (WANG *et al.*, 1998) e humana (MACLEA *et al.*, 2003), e a da estrela do mar *Acanthaster planci* (SHIOMI *et al.*, 2004). O pI da DNase II de 4,4-5,2 também se assemelha a várias outras DNases.

As condições ótimas para a atividade enzimática da DNase de *B. alternatus* foram determinadas. A atividade específica foi de 3.489 U/mg de proteína em tampão acetato de sódio 150 mM, pH 4,7, a 37°C. A enzima foi 3,6 vezes mais ativa sobre o dsDNA íntegro do que sobre o DNA desnaturado. A enzima mostrou atividade máxima em pH 4,7, porém a atividade também foi vista (em graus variados) entre pH 4,5 e 6,5, o que condiz com a maioria das DNases descritas na literatura (DULANEY e TOUSTER, 1972; LIAO, 1985; YASUDA *et al.*, 1992; IKEDA e TAKATA, 2002; MACLEA *et al.*, 2002; YE *et al.*, 2004; OVERBO e MYRNES, 2006). A capacidade de digerir os plasmídeos pBR322 e pGEM, em ensaio em pH 4,7 a 37°C, confirmou a atividade endonucleásica da enzima. A atividade da DNase de *B. alternatus* é independente de íons bivalentes, mantendo-se inalterada com a adição de EDTA. Por outro lado, esta atividade pode ser completamente inibida por altas concentrações (100 mM) de Ca^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+} , ou parcialmente inibida, no caso de Mn^{2+} quando estes são adicionados ao

tampão de reação; este perfil de ação de íons é semelhante ao de outras DNases II (BERNARDI *et al.*, 1966; OSHIMA e PRICE, 1973; LIAO *et al.*, 1989; BARRY e EASTMAN, 1993; WANG *et al.*, 1998; COUNIS e TORRIGLIA, 2000; IKETA e TAKATA, 2002; EVANS e AGUILERA, 2003; YE *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2006). A atividade da DNase também foi inibida pela adição de DTT, N-etilmaleimida, iodacetamida, ao contrário do observado com a DNase lisossomal de ratos ou em células de hãmsster chinês (CHO) (DULANEY e TOUSTER, 1972; BARRY e EASTMAN, 1993), e por ácido aurintricarboxílico, um potente inibidor de nucleases (HALLICK *et al.*, 1977; BARRY e EASTMAN, 1993).

A reatividade imunológica da DNase purificada foi comprovada através de ELISA e imunoblotting, utilizando antiveneno botrópico (em *western blotting*) e IgGs totais purificados de antiveneno botrópico (em ELISA). Ao contrário do DE ROODT *et al.* (2003), que não observaram imunorreatividade entre DNase II e um antisoro bivalente (*B. alternatus* e *B. neuwiedii*) (talvez devido a um déficit de DNase na mistura imunogênica utilizada por eles), a DNase de *B. alternatus* aqui purificada reagiu tanto com antisoro botrópico quanto crotálico. Este resultado mostra a existência de reatividade cruzada entre DNases das peçonhas de *Bothrops* spp. e *Crotalus* spp., e indica também que, apesar da pequena quantidade de DNase II presente na peçonha, esta enzima é imunogênica. O imunoblotting também revelou a reatividade da DNase II purificada de *B. alternatus* com um anticorpo anti-DNase II de origem humana, o que sugere a existência de epítomos comuns e, conseqüentemente, uma estrutura geral parecida com a enzima humana.

Em conclusão, os resultados descritos acima mostram a purificação da DNase II, uma DNase ácida, da peçonha de *B. alternatus*. A enzima apresenta atividade sobre DNA linear e circular, porém não sobre RNA e ácidos nucléicos derivados de ribonucleotídeos. Além disso, possui várias características em comum com DNases II de outros organismos, inclusive a DNase II humana.



CAPÍTULO 4

DNase II: uma enzima de *Bothrops alternatus* com atividade apoptótica sobre células MDCK em cultura

INTRODUÇÃO

Morte celular – apoptose e necrose

A morte celular é um evento que pode ocorrer de duas formas principais bastante distintas: apoptose e necrose. A necrose caracteriza-se por alterações no ambiente celular, em resposta a formas patológicas de injúria, modificando um grande número de células. A partir da ruptura das organelas e extravasamento do conteúdo celular para o espaço extracelular, resultado direto de danos à membrana, ocorre a perda de seletividade na permeabilidade desta membrana, causando uma resposta inflamatória tecidual (uma forma de identificar morfológicamente a necrose) (ALLEN *et al.*, 1997). Conseqüentemente, ocorre a ativação de resposta imune secundária, resultando em alteração no tecido ou órgão em que a célula necrótica se encontra (KAUFMANN, 1997; BRÜNE *et al.*, 1998a).

Definido em 1972 por KERR e colaboradores (KERR *et al.*, 1972), o termo apoptose foi baseado em alterações morfológicas, como a condensação da cromatina na periferia do núcleo, alteração da membrana plasmática (perda da assimetria, com presença de fosfatidilserina na camada externa de fosfolipídios de membrana) e

fragmentação de DNA por endonucleases, formando nucleossomos de aproximadamente 180 pb (que aparecem em gel de agarose na forma de escada), enquanto outras organelas citoplasmáticas, como os lisossomos, se mantêm estruturalmente intactas. Estas alterações culminam na formação de corpos apoptóticos, os quais posteriormente são fagocitados pelas células vizinhas ou fagócitos, não causando inflamação no local (EASTMAN *et al.*, 1994; WEBB *et al.*, 1997; COUNIS e TORRIGLIA, 2000; SARASTE e PULKKI, 2000).

A apoptose pode ser iniciada por estímulos patológicos e fisiológicos como, por exemplo, radiação ionizante, glicocorticóides, hipertermia, toxinas, oxidantes, radicais livres, remoção de fatores crescimento, e ativação de receptores de citocina, dentre outros (OTANI *et al.*, 1993; PERICLE *et al.*, 1994; SUHR e KIM, 1996). É uma morte celular que ocorre de maneira sincronizada, dividida em fases bioquímica e morfologicamente distintas (BRÜNE *et al.*, 1998a,b; SARASTE e PULKKI, 2000).

Diversos estudos sugerem a ativação de caspases como um dos eventos essenciais na morte celular apoptótica. As caspases são enzimas da família das cisteína proteases que clivam seus substratos especificamente após resíduos de aspartato (BRÜNE *et al.*, 1998; SARASTE e PULKKI, 2000; KAUFMANN e HENGARTNER, 2001). A ativação das caspases de iniciação, como as caspases 2, 8, 9 e 10, por sinais pró-apoptóticos conduz à ativação proteolítica das caspases efetoras, como caspases 3, 6 e 7. Estas por sua vez, clivam proteínas vitais, como por exemplo as proteínas componentes do citoesqueleto (LING *et al.*, 2001), iniciando e executando a fase de degradação celular.

Duas vias principais de sinalização e ativação de caspases já foram caracterizadas (figura 4.1) (KAUFMANN e HENGARTNER, 2001). Uma é iniciada pela ativação de receptores de morte, que inclui receptores da família Fas e TNF (fator de necrose tumoral) por ligantes específicos (FasL e TNF- α , respectivamente). Após a ligação do FasL ou TNF- α ao seu receptor ocorre recrutamento de um adaptador protéico (FADD ou TRADD) que contém o domínio efetor de morte (DED) ao domínio DD (*Death domain*, ou domínio de morte) do receptor, onde uma pró-caspase será ligada, formando um complexo protéico na membrana plasmática. Esta pró-caspase é ativada e liberada para o citosol, iniciando a cascata ativadora de caspases. Esta via de sinalização ativa diversas caspases, mas principalmente a caspase 8 (SARASTE e PULKKI, 2000; KAUFMANN e HENGARTNER, 2001).

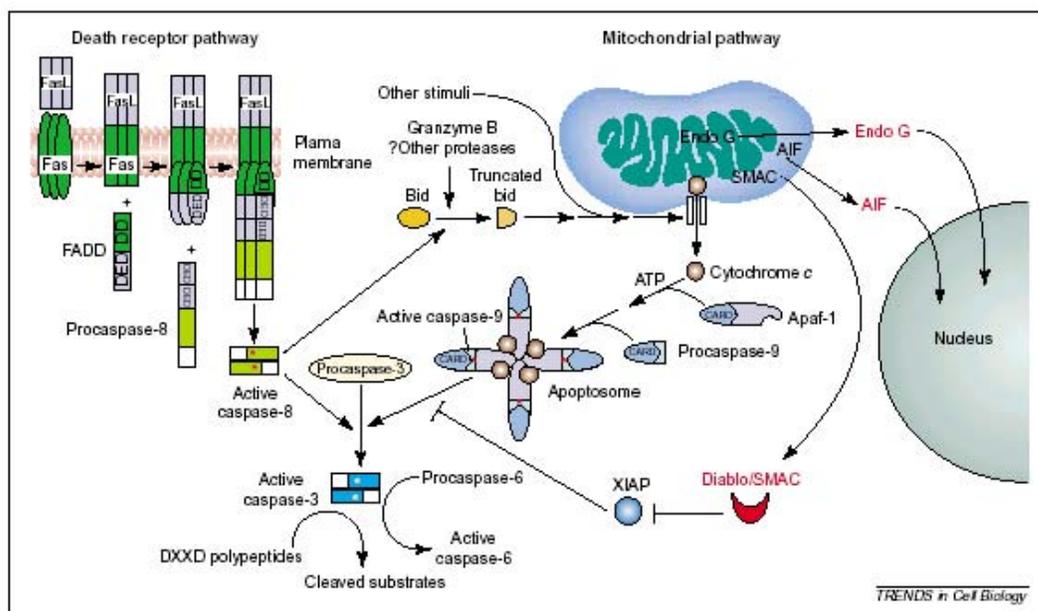


Figura 4.1: Vias intracelulares de ativação de caspases e indução da apoptose (KAUFMANN e HENGARTNER, 2001).

A outra via, conhecida como a via mitocondrial, integra sinais causados por vários agentes citotóxicos, a expressão de oncogenes e p53, e a ativação de proteínas presentes na membrana mitocondrial interna - Bad e Bax (membros da família Bcl-2), as quais atuam na formação de poros que permitem a saída do citocromo c do espaço intramembranar para o citosol. O citocromo c, juntamente com a proteína Apaf1 e ATP, ativam a caspase 9, que por sua vez ativa outras caspases, como a caspase 3, culminando na apoptose (BRÜNE *et al.*, 1998; SARASTE e PULKKI, 2000; KAUFMANN e HENGARTNER, 2001; GREEN, 2005; WANG *et al.*, 2005; GARRIDO *et al.*, 2006).

As proteínas Bcl-2 e Bcl-X_L apresentam função antiapoptótica e, portanto, regulam a apoptose, pois impedem a formação dos poros na membrana mitocondrial, e conseqüentemente a saída de citocromo c (BRÜNE *et al.*, 1998; KAUFMANN e HENGARTNER, 2001).

A integração de toda esta variedade de sinais, alguns favorecendo a apoptose outros a sobrevivência, e a decisão de vida ou morte, é conhecida como fase de julgamento. Uma vez que a célula entre irreversivelmente em apoptose, inicia-se a fase de execução ou degradação (GOTTLIEB, 1996).

Peçonhas e apoptose

Muitas peçonhas ofídicas, incluindo as botrópicas, produzem efeitos locais marcantes que incluem edema, hemorragia, e necrose. Em muitos casos, o dano local é causado por metaloproteinases presentes nestas peçonhas (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2003). ARAKI *et al.* (1993) foram os primeiros a mostrar que peçonhas hemorrágicas de serpentes, como as das famílias Crotalidae e Viperidae, são capazes de induzir apoptose em células endoteliais vasculares (VEC), enquanto que peçonhas neurotóxicas causam a morte celular por necrose nestas células.

Atualmente, sabe-se que há diferentes componentes (não relacionados entre si) envolvidos na apoptose induzida por peçonhas (ARAKI *et al.*, 2002). Vários estudos identificaram metaloproteinases que, devido à sua similaridade com a convertase de TNF- α , são capazes de causar apoptose *in vitro* (MASUDA *et al.*, 1997, 1998, 2000, 2001a,b; CLISSA *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2001). As desintegrinas também são conhecidas por participarem da morte celular apoptótica, por interferir na adesão celular (HYNES, 1992; YEH *et al.*, 1998; COMINETTI *et al.*, 2003). Porém, as integrinas também foram relacionadas à via de transdução de sinal da fosfolipase C fosfatidilcolina-específica (PC-PLC), assim como a indução da expressão de p53 (ZHAO *et al.*, 2004), o que também leva à apoptose. Outros componentes de peçonhas com capacidade de induzir apoptose incluem a enzima L-aminoácido oxidase (L-AAO), que gera H₂O₂ em sua reação catalítica, produzindo apoptose como efeito secundário (LI *et al.*, 1994; TAN e PONNUDURAI, 1994; SUHR e KIM, 1996; SUZUKI *et al.*, 1997;

TORII *et al.*, 1997; para revisão, ver DU e CLEMETSON, 2002), PLA₂ (ZHAO *et al.*, 2001, 2002a,b), e neurotoxinas (STRIZHKOV *et al.*, 1994; HERKERT *et al.*, 2001). As cardiotoxinas, por sua vez, podem ativar apoptose tanto pela via caspase-dependente (caspases 9 e 3) como pela via mitocondrial, com a liberação de citocromo c (YANG *et al.*, 2005; CHIEN *et al.*, 2008).

Estas moléculas presentes em diferentes peçonhas são capazes de induzir apoptose em uma variedade de tipos celulares normais e tumorais, tais como HUVEC, fibroblastos (MASUDA *et al.*, 1997; GALLANGHER *et al.*, 2003, 2005; SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2005; TANJONI *et al.*, 2005), EC304 (WAN *et al.*, 2006), CHO (WANG e JI, 2005), VEC (ARAKI *et al.*, 1993; MARUYAMA *et al.*, 2005), mioblastos, MPAC, TEnd (LOMONTE *et al.*, 1999; TANJONI *et al.*, 2005), HL-60, carcinoma ovariano A2780, carcinoma gástrico CRL5971, células endoteliais de camundongo KN-3 (AHN *et al.*, 1997; TORII *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 1999; CHIEN *et al.*, 2008), linfoblastóide B CRL8062 (MORA *et al.*, 2005), e leucemia humana K562 (YANG *et al.*, 2005, 2007; YAN *et al.*, 2006).

O mecanismo para o dano tecidual local após o envenenamento por serpentes envolve uma cascata de eventos que, freqüentemente, inclui a ativação de macrófagos teciduais e monócitos sangüíneos (VOPRONOV *et al.*, 1999). A ativação de monócitos resulta na liberação de um amplo espectro de mediadores, dos quais IL-1 e TNF- α desempenham um importante papel (CYBULSKY *et al.*, 1988), contribuindo para o dano local severo produzido por peçonha botrópica (MOURA DA SILVA *et al.*, 1996; CLISSA *et al.*, 2001). Neste contexto, alguns estudos sugerem que a apoptose induzida por

peçonhas ofídicas ocorre predominantemente através de um ligante do receptor Fas e não de TNF- α (GALLANGER *et al.*, 2003).

Peçonhas ofídicas também são conhecidas por gerarem espécies reativas de oxigênio (ROS) em alguns tipos celulares e, de acordo com a concentração gerada, podem causar apoptose ou necrose nestas células (SUZUKI *et al.*, 1997; ANDE *et al.*, 2006; CHAVES *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2007). Na verdade, os mecanismos moleculares destes efeitos ainda não estão totalmente elucidados, mas parecem envolver bloqueio de integrinas (ARAKI *et al.*, 2002; COMINETTI *et al.*, 2003), ativação de p53 (MIAO *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 2004) e fosfolipase C (MIAO *et al.*, 1997; ZHAO *et al.*, 2004) (no caso de metaloproteinases/desintegrinas), formação de H₂O₂ (no caso de L-AAO) (SUHARA *et al.*, 1998; DU e CLEMETSON, 2002; ANDE *et al.*, 2006), produção de ceramida (no caso de PLA₂) (ZHAO *et al.*, 2002a), e ativação de vias intracelulares independentes de caspase (após internalização via ligação a canais de potássio dependentes de voltagem), no caso da β -bungarotoxina (HERKERT *et al.*, 2001), e dependentes de caspase, bem como a via mitocondrial (no caso da cardiotoxina III) (YANG *et al.*, 2005; CHIEN *et al.*, 2008) (figura 4.2).

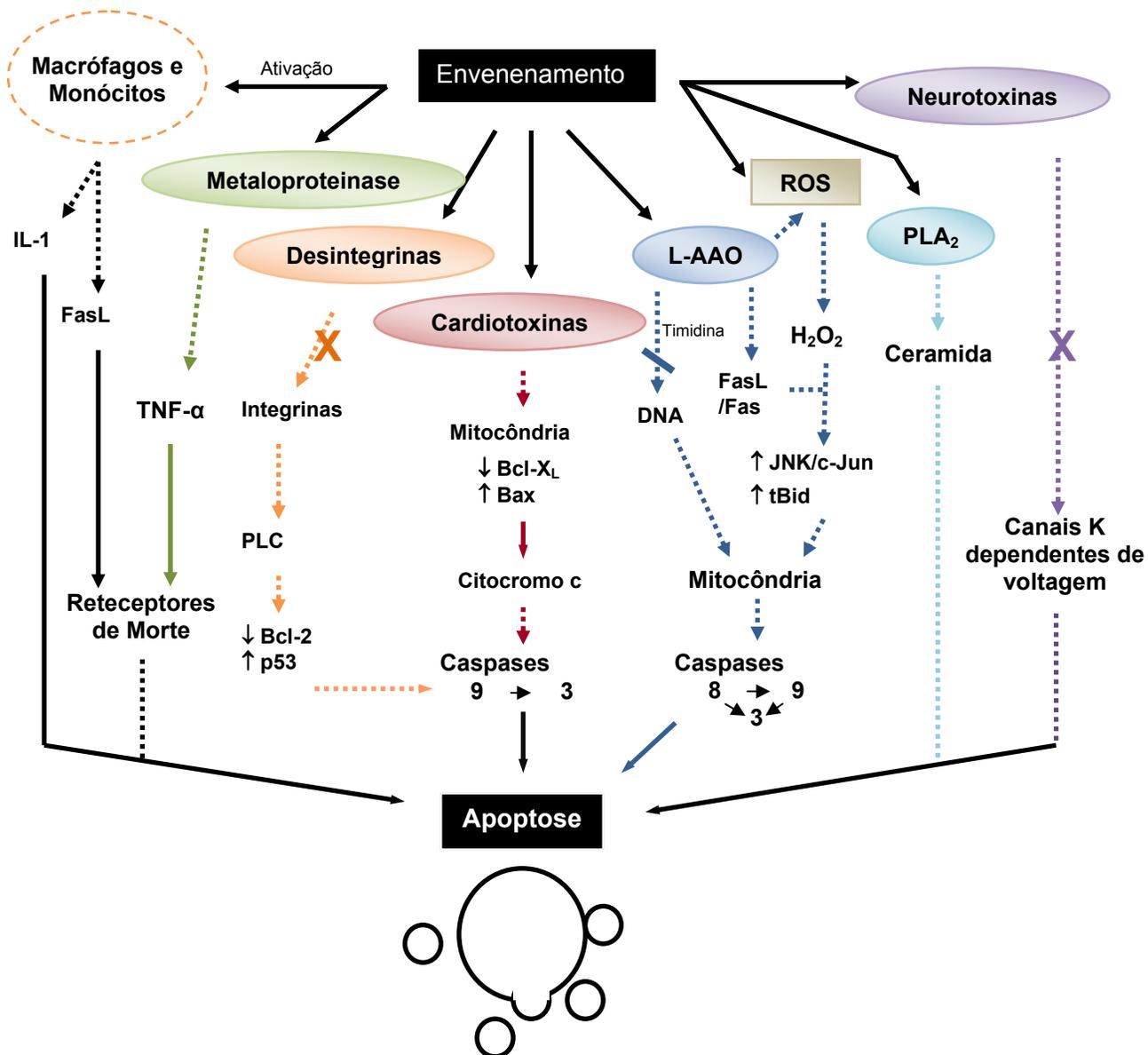


Figura 4.2: Esquema da ação de componentes de peçonhas ofídicas na morte celular apoptótica. As setas tracejadas indicam as possíveis vias de ação das enzimas/toxinas da peçonha em nas células. As setas contínuas indicam vias já estabelecidas na literatura. FasL = ligante de Fas; IL-1 = interleucina 1; L-AAO = L-aminoácido oxidase; PLA₂ = fosfolipase A₂; PLC = fosfolipase C; ROS = espécies reativas de oxigênio; TNF- α = fator de necrose tumoral; \ = danos irreparáveis; X = bloqueio de integrinas ou canais iônicos. \uparrow = aumento na expressão; \downarrow = redução na expressão.

DNase II e apoptose

A degradação de DNA foi o primeiro fenômeno bioquímico caracterizado em apoptose (WYLLIE, 1980). Desde então, uma variedade de endonucleases envolvidas no processo têm sido caracterizadas (BARRY e EASTMAN, 1993; RIBEIRO e CARSON, 1993; SHIOKAWA *et al.*, 1994; COUNIS e TORRIGLIA, 2000). HEWISH e BURGOYNE (1973) foram os primeiros a sugerir que a degradação do DNA seria mediada por uma endonuclease dependente de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, com pH ótimo entre 7,0-8,0 (DNase I). De fato, a participação desta enzima tem sido confirmada por vários outros autores (RIBEIRO e CARSON, 1993; SHIOKAWA *et al.*, 1994; COUNIS e TORRIGLIA, 2006). Entretanto, vários estudos de degradação de DNA têm mostrado a DNase II (independente de cátion) ou CAD (desoxirribonuclease ativada por caspase) como endonucleases envolvidas na apoptose, possuindo maior atividade que a DNase I (BARRY e EASTMAN, 1993; GOTTLIEB *et al.*, 1995; COUNIS e TORRIGLIA, 2000; KAUFMANN e HENGARTNER, 2001; COUNIS e TORRIGLIA, 2006).

A apoptose é precedida de uma acidificação do meio intracelular, com conseqüente modificação do estado metabólico celular, sendo que esta queda de pH leva à ativação da DNase II e à fragmentação do DNA celular, produzindo grupos 3'-fosfato livres. Este processo é irreversível, pois a maioria das enzimas de reparo de DNA trabalha adicionando bases ao terminal 5'-fosfato (GOTTLIEB, 1996). A acidificação representaria o mecanismo celular de resposta aos múltiplos sinais recebidos, e seria o ponto onde o processo apoptótico torna-se irreversível (BARRY e

EASTMAN, 1993; EASTMAN *et al.*, 1994; GOTTLIEB *et al.*, 1995; GOTTLIEB, 1996; TORRIGLIA *et al.*, 1998; COUNIS e TORRIGLIA, 2000).

O envolvimento de DNase II na degradação de DNA genômico durante apoptose foi inicialmente demonstrado na diferenciação de células de cristalino (BARRY e EASTMAN, 1993; TORRIGLIA *et al.*, 1995). COUNIS e TORRIGLIA (2000) propuseram uma via independente de caspase (figura 4.3), ou via dependente de serino-proteases (GORMAN e ZHIVOTOVSKY, 1999), além das vias mitocondrial e de receptores de morte, para a ação de DNase II (L-DNase II) encontrada nestas células.

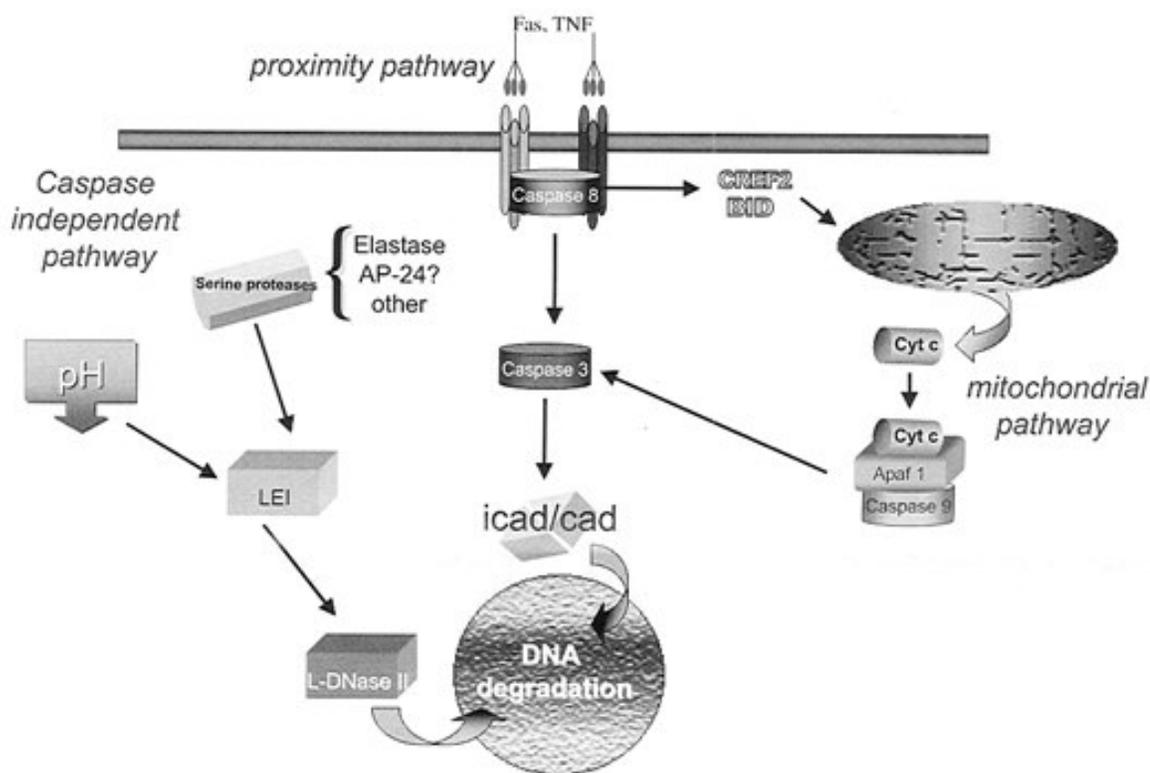


Figura 4.3: Vias apoptóticas descritas por COUNIS e TORRIGLIA (2000) envolvendo DNases [L-DNase II (LEI – inibidor da elastase de leucócitos, DNase II) e CAD (DNase dependente de caspase)].

Sabe-se que o dano ao DNA pode dar início à morte celular (RICH *et al.*, 2000) e, portanto, um ataque nucleolítico direto ao DNA genômico pode ser um mecanismo de indução de apoptose. KRIESER e EASTMAN (1998) demonstraram em células CHO (de ovário de hamster chinês), que a superexpressão de DNase II resulta em apoptose. A tabela 4.1 resume os resultados de diversos estudos sobre a presença de diferentes nucleases implicadas na degradação de DNA durante a apoptose.

Neste capítulo descrevemos a avaliação da atividade biológica da DNase II purificada de *B. alternatus* em células epiteliais renais MDCK.

Tabela 4.1: Resumo de resultados obtidos por diferentes grupos descrevendo a degradação de DNA durante a apoptose. (adaptado de COUNIS e TORRIGLIA, 2000, 2006).

Enzima	MW (kDa)	Tecido/organismo	Implicação em apoptose	Via de ativação	Autores
Ca-Mg-dependente					
DNase I	30	Pâncreas, glândula paratireóide, timócito	Incerto	Desconhecida	PEITSCH <i>et al.</i> (1993); WALKER e SIRKOSKA (1997)
DNase	33	Baço, nódulos linfóides, timo	Sim	Desconhecida	SHIOKAWA <i>et al.</i> (1997a,b); LIU <i>et al.</i> (1998);
Nuc 18	18	Timo	Sim	Desconhecida	GAIDO e CIDLOWSKI (1991)
	27	Baço humano	Provavelmente	Desconhecida	RIBEIRO e CARSON (1993)
	40	Linfócitos	Sim	Desconhecida	UCKER <i>et al.</i> (1992)
	97	Hepatoma	Sim	Desconhecida	PANDEY <i>et al.</i> (1997)
	120	Fígado	Provavelmente	Desconhecida	LEBEDEVA <i>et al.</i> (1995)
	110-130	Timócitos	Sim	Desconhecida	ARENDS <i>et al.</i> (1990)
Nuc 70	60	Células fibra do cristalino	Provavelmente	Desconhecida	ARRUTI <i>et al.</i> (1995)
	70	Células humanas hematopoiéticas	Sim, restrita a células humanas	Caspases	URBANO <i>et al.</i> (1998)
	25-250	Timócitos apoptóticos	Sim	Serino proteases	HUGHES <i>et al.</i> (1988)
Mg-dependente					
CAD/DFF40	40	Linfoma	Sim	Caspase 3	ENARI <i>et al.</i> (1998); HALENBECK <i>et al.</i> (1998)
Cátion independente					
DNase II α	42-44	Ubíquo	Sim	-	YASUDA <i>et al.</i> (1998) KRIESER e EASTMAN (1998) MCILROY <i>et al.</i> (2000) KAWANE <i>et al.</i> (2001) MACLEA <i>et al.</i> (2002) KAWANE <i>et al.</i> (2003) NAGATA (2005) SAMEJIMA e EARNSHAW (2005)
DNase II β	42-44	Glândula salivar e lente	Sim	Desconhecida	KRIESER <i>et al.</i> (2001)
L-DNase II	42-47	Baço	Sim	Serino-proteases	TORRIGLIA <i>et al.</i> (1998) ALTAIRAC <i>et al.</i> (2003)
Nuclease acídica		HeLa	Sim	Caspase-independente	FAMULSKI <i>et al.</i> (1999)
DNase	42	<i>Chlamys islandica</i>	-	-	OVERBO e MYRNES (2006)
CSDNase	31	<i>Cordyceps sinensis</i>	-	-	YE <i>et al.</i> (2004)
BAF3 nuclease	45	BAF3	Sim	-	COLLINS <i>et al.</i> (1996)

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

Ácido bórico, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA, sal sódico), acrilamida, anticorpo anti-camundongo acoplado à peroxidase, anticorpo secundário anti-coelho acoplado à peroxidase, azul de bromofenol, azul brilhante de Coomassie R250, brometo de etídio, caspases humanas recombinantes 3, 8 e 9, DNA (tipo I, de salmão), DNase I de pâncreas bovino (>1000 unidades de Kunitz/mg sólida), DNase II de baço suíno (>800 unidades de Kunitz/mg sólida), glicina, inibidores para caspases 3 (Ac-DEVD-CHO), 8 (Ac-IETD-CHO) e 9 (N-CBZ-LEDH-FMK), β -mercaptoetanol, N,N-metileno-bis-acrilamida, persulfato de amônio, substratos para caspases 3 (Ac-DEVD-pNa) e 8 (Ac-IETD-pNa), N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina (TEMED), Tris base, Tween 20 e Triton X-100 foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Substrato para caspase 9 (Ac-LEHD-pNA) e albumina bovina foram obtidos da EMD - Calbiochem Brand (San Diego, CA, EUA). Anticorpos primários anti-caspase 3, anti-caspase 8, anti-caspase 9, anti-Bcl-2, anti-PARP, anti-p53 foram obtidos da Upstate (Millipore, EUA). Marcadores de massa molecular para SDS-PAGE foram obtidos da BioRad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, EUA) e marcadores de DNA 1 kb foram obtidos da Fermentas Inc. (Hannover, MD, EUA). Plásticos para cultivo celular foram obtidos da Corning (Acton, MA, EUA). O meio de cultura e demais reagentes estéreis foram obtidos da Cultilab (Campinas, SP, Brasil). O kit TACSTM Annexin V-FITC foi

obtido da Trevigen Inc. (Gaithersburg, MD, EUA). Os demais reagentes (de grau p.a.) foram obtidos de fornecedores locais.

Peçonha

A peçonha liofilizada foi adquirida do Centro de Extração de Toxinas Animais (CETA, Morungaba, SP, Brasil) e foi extraída manualmente de espécimes adultas de *B. alternatus* de ambos os sexos.

Quantificação de proteínas

As concentrações protéicas foram determinadas pelo método de BRADFORD (1976), usando albumina bovina como padrão.

Purificação da DNase II

A DNase II foi purificada da peçonha de *B. alternatus* em cinco etapas conforme descrito no Capítulo 3.

Cultura de células

Células epiteliais renais caninas Madin-Darby (MDCK A) (passagens 80 a 95) foram cultivadas em frascos plásticos, com meio mínimo essencial de Eagle (MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 UI de penicilina/mL e 100 µg de

estreptomicina/mL, e mantidas à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ em ar. Para fins experimentais, as células foram semeadas em alta densidade (0,5-1,0 x 10⁶ células/cm²) em placas com 6, 12 ou 96 poços (Corning) ou em coverslips de vidro (Kinitell). As monocamadas de células MDCK foram usadas três dias após a semeadura.

Viabilidade celular

Incorporação de vermelho neutro

A citotoxicidade da peçonha foi avaliada pelo método da coloração por vermelho neutro (BORENFREUND e PUERNER, 1984). As células foram cultivadas em placas de 96 poços. Após exposição à DNase (100 a 10.000 U/mL, correspondendo de ~5 a ~500 µg/mL) por intervalos de 24, 48 e 72 h, o meio foi removido, e foram adicionados a cada poço 200 µL de MEM contendo 50 µg de vermelho neutro/mL, e as placas foram incubadas à 37°C durante 3 h. O meio contendo o corante foi removido e os poços foram lavados uma vez por 2-3 minutos com formol-cálcio (40% de formaldeído e 10% de cloreto de cálcio, p/p) para remover corante não incorporado. Finalmente, 200 µL de ácido acético-etanol (1 mL de ácido acético glacial em 100 mL de etanol 50%) foram adicionados a cada poço durante 15 minutos à temperatura ambiente e, então, a placa foi lida a 540 nm em um leitor de microplacas SpectraMax340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Liberação de LDH

A citotoxicidade das células MDCK tratadas com DNase II também foi avaliada pela liberação de lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura. As células foram cultivadas em placas de 96 poços. Após exposição à DNase II (100 ou 10.000 U/mL) por intervalos de 24, 48 e 72 h, 50 µL do meio de cultura foi retirado e colocado em uma nova placa de 96 poços, onde o ensaio foi realizado com o kit TOX-7 (Sigma) de acordo com as instruções do fabricante, num volume final de 100 µL. Após 30 minutos de ensaio enzimático, a reação foi paralisada com 10 µL de 1 N HCl e a absorbância foi lida em 490 nm em um leitor de microplacas SpectraMax340. Como controle positivo, algumas células foram tratadas com 0,1% de Triton X-100 durante 45 minutos e a absorbância resultante foi considerada como sendo 100% de liberação de lactato desidrogenase.

Avaliação de apoptose com Anexina V– FITC

A apoptose foi avaliada utilizando-se o ensaio de detecção da anexina V usando o kit TACS™ Annexin V-FITC. As células MDCK (1×10^6) foram tratadas com a DNase II por 24 a 72 h. Após o tratamento, o meio foi coletado e centrifugado a 500 x g por 10 min para coletar células em suspensão. As células aderidas à placa foram lavadas em PBS três vezes e tripsinizadas (2,5 g de tripsina/L/0,02% EDTA) para destacá-las da placa. Estas células foram adicionadas às anteriores e centrifugadas a 500 x g por 10 minutos. As células foram analisadas de acordo com o protocolo do

fabricante usando um citômetro de fluxo FACSCanto™ (BD Biosciences) e o software FACSDiva™ (BD Biosciences).

Avaliação da via de morte celular

Atividade de caspases

A atividade de caspases 3, 8 e 9 foi determinada usando substratos colorimétricos específicos, de acordo com o protocolo do fabricante (Sigma ou Calbiochem) e tendo como base KUMAR (2004). Células MDCK tratadas com DNase II por 24, 48 e 72 h foram lisadas em 200 µL de tampão de lise (250 mM HEPES, pH 7,4, 25 mM CHAPS, 25 mM DTT), incubadas por 30 min a 4°C e centrifugadas a 16.000 x g por 10 min para, em seguida, serem congeladas em freezer -80°C até realização das atividades. Os ensaios foram feitos com 50 µL de lisado celular (65 µg de proteína), em um volume final de reação de 100 µL.

Para o ensaio de caspase 3, utilizou-se 200 µM do substrato Ac-DEVD-pNA em tampão 20 mM HEPES pH 7,4, 1% CHAPS, 50 mM DTT e 20 mM EDTA, e o inibidor Ac-DEVD-CHO (20 µM) em todas as amostras para o cálculo da atividade; a caspase 3 humana recombinante (0,05 µg, >1.000 U/mg proteína) foi usada como controle positivo neste ensaio.

Para a atividade de caspase 8, utilizou-se 200 µM do substrato Ac-IETD-pNA (20 µM) em tampão 20 mM HEPES, pH 7,4, 0,1% CHAPS, 5 mM DTT e 2 mM EDTA, e o inibidor Ac-IETD-CHO (20 µM) para o cálculo da atividade; a caspase 8 humana recombinante (0,1 µg, >500 U/mg proteína) foi usada como controle positivo.

Para a atividade de caspase 9, utilizou-se 200 μ M do substrato Ac-LEDH-pNA em tampão 50 mM MES pH 6,5, 10% PEG 6.000, 0,1% CHAPS, 5 mM DTT e 1 mM EDTA, e o inibidor N-LEDH-FMK (10 μ M) para o cálculo da atividade; a caspase 9 humana recombinante (0,5 μ g, >2.000 U/mg proteína) foi usada como controle positivo.

As atividades foram expressas em μ mol de pNA/min/mL calculada a partir de uma curva padrão de p-nitroanilina (pNA). Em todos os ensaios a absorbância foi lida a 405 nm em um leitor de microplacas SpectraMax340.

Inibição da atividade de caspases

Para verificarmos se a morte celular causada pela DNase II era dependente de caspase, pré-tratamos as células MDCK com inibidores de caspase Z-DQMD-FMK para caspase 3, Z-IETD-FMK para caspase 8 e Z-LEDH-FMK para caspase 9, e em seguida com 1.000 U DNase II/mL por 48 h. Após decorrido o tempo de tratamento, as células foram processadas como descrito para atividade de caspases acima.

Expressão de caspases 3 e 8 avaliada através de western blotting

Células MDCK tratadas com DNase II purificada (400-4.000 U/mL) por 24, 48 ou 72 h, foram removidas da placa, lavadas em PBS e ressuspensas em 30 μ L de tampão de lise (250 mM HEPES, pH 7,4, 25 mM CHAPS, 25 mM DTT) contendo coquetel anti-protease (10 mM imidazole, 4 mM EDTA, 1 mM EGTA, 200 μ M PMSF, 200 KIU de aprotinina/mL, 2,5 μ g de leupeptina/mL, 0,5 μ g de pepstatina/mL e 30 μ g de

inibidor de tripsina/mL), incubadas 30 minutos a 4°C e centrifugadas a 16.000 x g antes de serem congeladas a -80°C até o uso.

Após SDS-PAGE de um lisado de células MDCK (5 µg) em géis de 10% acrilamida (LAEMMLI, 1970) num sistema eletroforético Mighty Small SE260 (Hoefer-Pharmacia) a 100 V constantes, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (Millipore) (TOWBIN *et al.*, 1979) em uma cuba de transferência Mighty Small TE22 (Hoefer-Pharmacia). Marcadores moleculares foram incluídos na corrida. Após a transferência, sítios inespecíficos na membrana foram bloqueados *overnight* a 4°C com 5% de leite desnatado em solução basal (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl e 0,5% Tween 20). As membranas foram então incubadas por 12 h a 4°C com anticorpo anti-Bcl-2, anti-PARP, anti-caspase 3 ou anti-caspase 8 (diluído 1:1.000 em solução basal contendo 3% de albumina bovina) separadamente. Após lavagens em solução basal, as membranas foram incubadas com um conjugado IgG-peroxidase anti-coelho de cabra (diluídos de acordo com a tabela 4.2). Ao final de 2 h, as membranas foram lavadas e as bandas imunorreativas foram detectadas usando um kit de quimioluminescência (Millipore) e documentadas em filme fotográfico (Kodak).

Tabela 4.2: Resumo dos anticorpos utilizados.

Anticorpo primário					
Proteína	Bcl-2	PARP	Caspase 3	Caspase 8	β -actina
Organismo alvo	Humano	Humano	Humano	Humano	Humano
Organismo hospedeiro	Camundongo	Coelho	Coelho	Coelho	Camundongo
Diluição	1:1.000	1:1.000	1:1.000	1:1.000	1:500
Origem	Upstate	Upstate	Upstate	Upstate	Sigma
Anticorpo secundário					
Organismo alvo	Camundongo	Coelho	Coelho	Coelho	Camundongo
Organismo hospedeiro	Coelho	Cabra	Cabra	Cabra	Coelho
Diluição	1:5.000	1:5.000	1:20.000	1:20.000	1:5.000
Conjugado	Peroxidase	Peroxidase	Peroxidase	Peroxidase	Peroxidase
Origem	Sigma	Sigma	Sigma	Sigma	Sigma
Técnica	<i>Western blotting</i>				

Fragmentação de DNA e eletroforese em gel de agarose

Células MDCK A, cultivadas em placas com seis poços, foram tratadas com DNase II de *B. alternatus* (100 a 800 U/mL) durante 24 e 48 h a 37°C. A fragmentação de DNA foi avaliada utilizando metodologia de extração descrita por MATASSOV *et al.* (2004). As células foram raspadas, e juntamente com o meio foram centrifugadas para obter células em suspensão. O meio descartado, as células foram lavadas em PBS gelado três vezes consecutivas a 200 x g por 3 minutos. A última centrifugação foi realizada em 1.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante armazenado (tubos B). O precipitado foi diluído em tampão Tris-EDTA (TE - 89 mM de Tris base, 1 mM de EDTA, pH 8) contendo 0,1% Triton X-100, para lise das células. Após 15 minutos de banho em

gelo, as células foram centrifugadas a 20.000 x *g* por 10 minutos. O sobrenadante, que poderia conter DNA em fragmentos menores, foi armazenado (tubos T) e, o precipitado foi redissolvido em tampão TE com 0,1% Triton X-100 (tubos P). As amostras foram então digeridas com RNase A (100 µg/mL) por 1 h. Adicionamos então 50 µL de NaCl 5 M e 500 µL de isopropanol gelado, deixando as amostras a -20°C *overnight*. Após este tempo as amostras foram centrifugadas a 20.000 x *g* por 30 minutos e lavadas com etanol 70% (20.000 x *g* por 10 minutos). Ao final, o etanol foi removido e o DNA secado ao ar. Antes da corrida em gel de agarose 1,2% em tampão TBE (90 mM Tris-borato, pH 8,0, contendo 4 mM EDTA), as amostras de DNA foram hidratadas com 50 µL de tampão TE e NaOH 1 M durante pelo menos 5 h em banho 37°C. Padrões de DNA (ladder de 1 kb) foram corridas simultaneamente com as amostras. O gel foi corado com brometo de etídio (1 µg/mL) e as bandas visualizadas em luz UV e documentados (sistema de fotodocumentação da BioRad).

Microscopia de luz

Células MDCK A ($0,6 \times 10^6$) foram cultivadas em *coverslips* de vidro para avaliarmos os efeitos da peçonha de *B. alternatus* em núcleos celulares e na morfologia geral destas células. Após tratamento com 10 µg/mL ou 100 µg/mL de peçonha durante 1 e 3 h, as células foram lavadas em PBS e fixadas em etanol/ácido acético (3:1), em seguida foi realizada a reação de Feulgen: as células foram hidrolisadas em HCl 4 N durante 75 minutos, lavadas e tratadas com reativo de Schiff por 40 minutos. Os

coverslips foram então montados em lâminas de vidro e selados, para análise em microscópio de luz.

Análise estatística

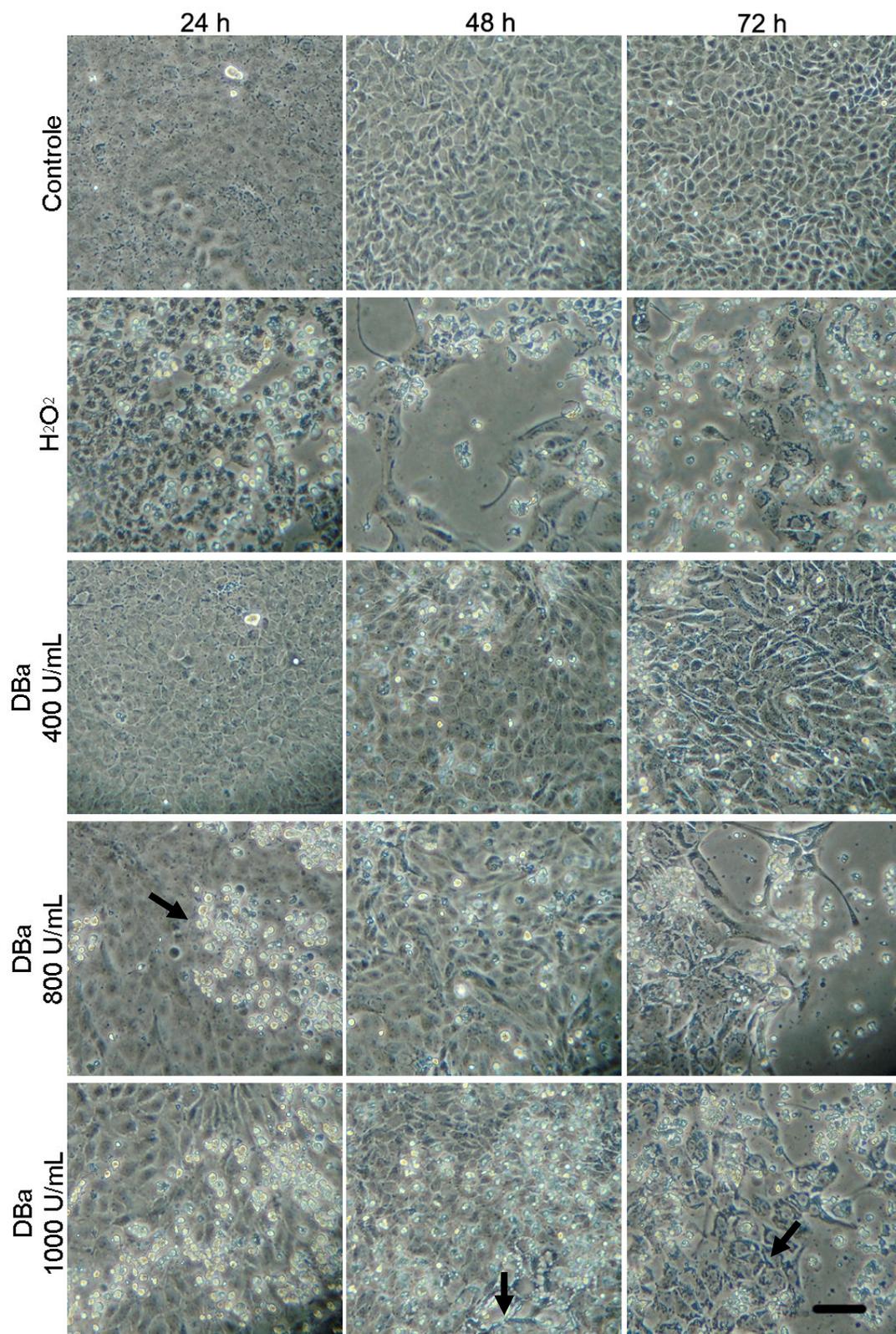
Quando conveniente, os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP) do número de experimentos indicado. As comparações estatísticas foram feitas usando o teste *t* de Student ou a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ indicou significância.

RESULTADOS

A citotoxicidade e atividade apoptótica da DNase II purificada foram avaliadas em células MDCK. Para isso, baseamo-nos na atividade da enzima onde trabalhos com DNases ácidas de mamíferos mostram que 100 unidades (U) de atividade enzimática/mL poderia dar início ao processo apoptótico a partir de 6 h de incubação (BARRY e EASTMAN, 1993). A partir disto, utilizamos 100 U de enzima/mL, que correspondem a ~5 µg de DNase II purificada/mL, como ponto de partida para os ensaios. Nos testes iniciais, utilizamos também a DNase II suína (mamífero) para comparação (devido à indisponibilidade da DNase II bovina, embora as características físico-químicas e enzimáticas da DNase II de *B. alternatus* sejam mais semelhantes a esta enzima).

A incubação de células MDCK com DNase II de *B. alternatus* resultou em algumas alterações sutis em relação ao controle mesmo a partir de 24 h de tratamento, tais como a presença de um número maior de células que se destacaram do substrato (figura 4.4, 800 e 1.000 U/mL) e que apresentavam um formato ligeiramente arredondado (figura 4.4, seta em 800 U/mL em 24 h). Com 800 U/mL em 48 h e também 400 U/mL em 72 h de tratamento, observamos as células mais alongadas, ocupando espaços deixados pelas células que se desprenderam. Observamos, a partir de 48 h de tratamento (figura 4.4, seta em 1.000 U/mL, 48 h) a presença de células volumosas e de citoplasma vacuolados (figura 4.4, seta em 1000 U/mL, 72 h). Quando comparadas aos efeitos observados em células tratadas com H₂O₂ (2 mM, controle positivo), estas alterações eram mais marcantes com a concentração de 1000 U/mL,

em 48 h em diante, e com 800 U/mL em 72 h. No tratamento com H₂O₂, utilizado com controle positivo, houve uma grande perda de células por destacamento do substrato além da observação de marcantes alterações morfológicas, efeitos estes tempo-dependentes.

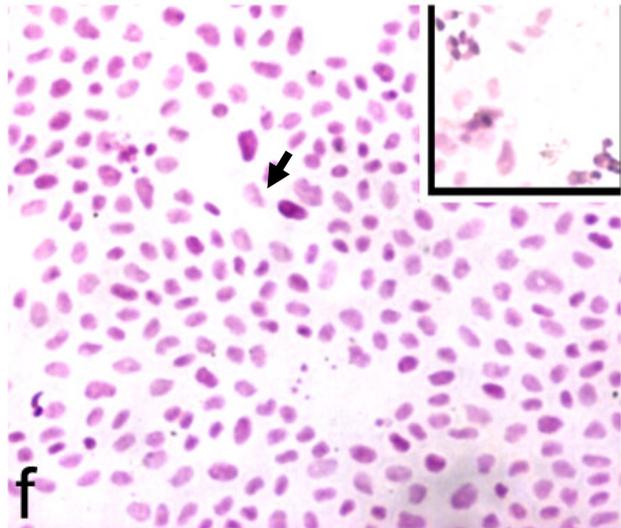
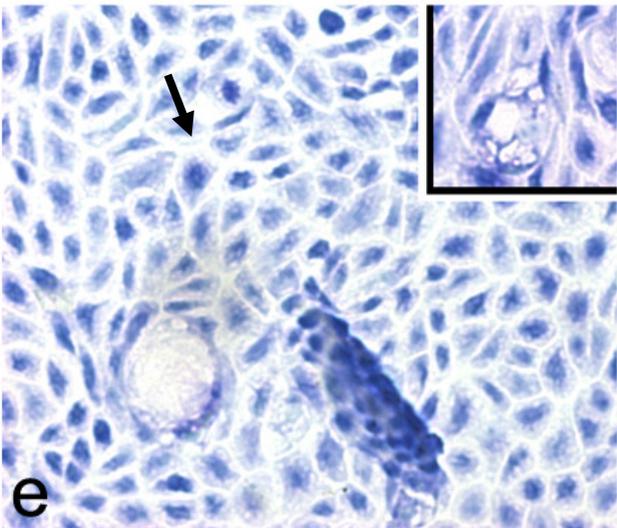
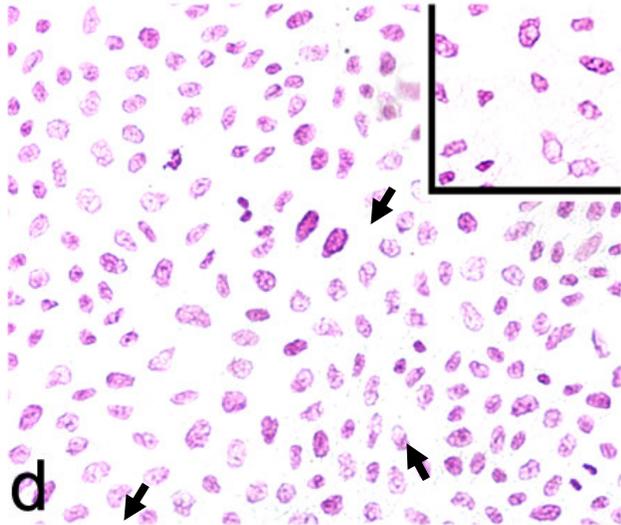
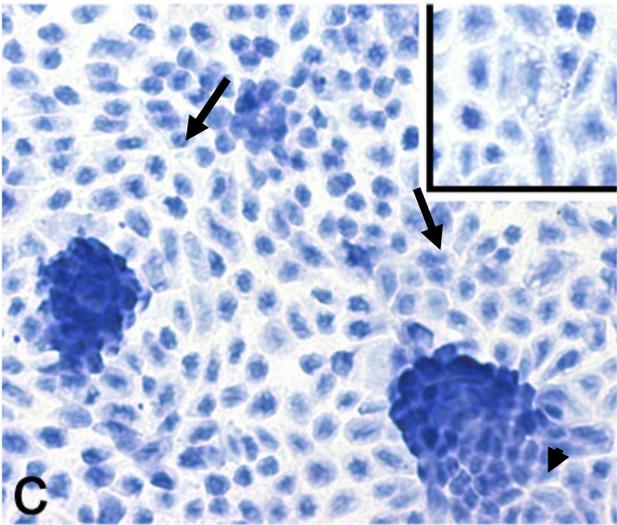
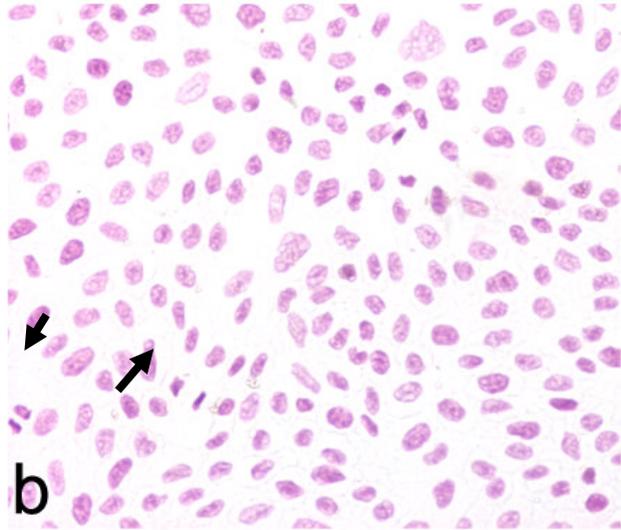
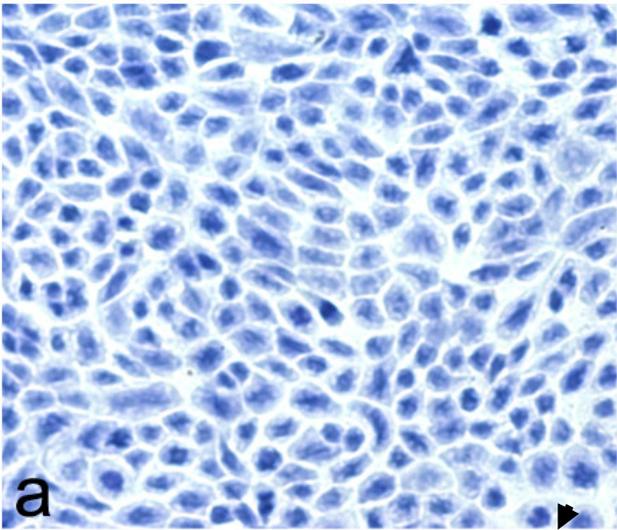


Legenda na página 135

Figura 4.4: Alterações em células MDCK após incubação com DNase de *B. alternatus* (DBa), fotografadas em microscópio de contraste de fase. As células controle receberam apenas meio de cultura durante o período descrito. Barra = 30 μ m.

Estabelecemos o tratamento de 24 h para observarmos as alterações na morfologia celular e nuclear com as colorações de azul de toluidina e Feulgen (respectivamente), pois, como indicado acima, períodos mais prolongados de incubação com a DNase de *B. alternatus* resultaram em grande descolamento de células e fragilidade destas no período. A figura 4.5 mostra alguns dos efeitos causados pela ação da DNase em células MDCK, como o descolamento de grupos de células da monocamada (figura 4.5c, seta), desorganização da monocamada e a presença de células volumosas e com citoplasma vacuolado (nos quadros menores destacados, figura 4.5c, e pontas de setas), ou de formato alongado (figura 4.5e, seta).

A coloração dos núcleos celulares pela reação de Feulgen mostrou outros efeitos. Verificou-se a presença de núcleos picnóticos, com cromatina muito condensada que indica células já em estado de morte celular (figura 4.5d, seta), e a fragmentação de núcleos no tratamento com 800 U DNase/mL (figura 4.5f, setas). Na coloração por Feulgen também foram observadas poucas células em divisão celular, em contraste com o grupo controle, que possui mais figuras de mitose (figura 4.5b, setas). Ainda, observou-se um espaçamento maior entre os núcleos em algumas regiões da monocamada, indicativo de perda celular e/ou aumento do volume celular (fig 4.5f). Também observamos no tratamento com 400 U de DNase/mL, núcleos com cromatina alterada apresentando regiões pouco coradas (figura 4.5d, inserto).



Legenda na página 137

Figura 4.5: Células MDCK tratadas com DNase II por 24 h e coradas com azul de toluidina (a,c,e) e pela reação de Feulgen (b,d,f). As células controle (a,e,b) permaneceram em meio de cultura completo pelo período de tratamento. (c,d) foram tratadas com 400 U DNase II/mL e (e,f) 800 U DNase II/mL. Cada quadro é representativo de um dos campos obtidos por microscopia de luz nos diferentes tratamentos. Os destaques mostram outros efeitos representativos. Barras = 50 μ m.

A figura 4.6 mostra que houve fragmentação de DNA nas células tratadas com 400 e 800 U/mL a partir de 24 h (figura 4.6a), e com maior intensidade em 48 h (fig. 4.6b). No tratamento com H_2O_2 observamos pelas figuras 4.4 e 4.5 que havia desprendimento de células e uma grande quantidade de alterações morfológicas, que aumentaram conforme o tempo. Esta degradação celular também refletiu em degradação de DNA, e esta é maior com o tratamento de 48 h, de modo que o DNA não foi detectado no gel, talvez por ter sido muito degradado.

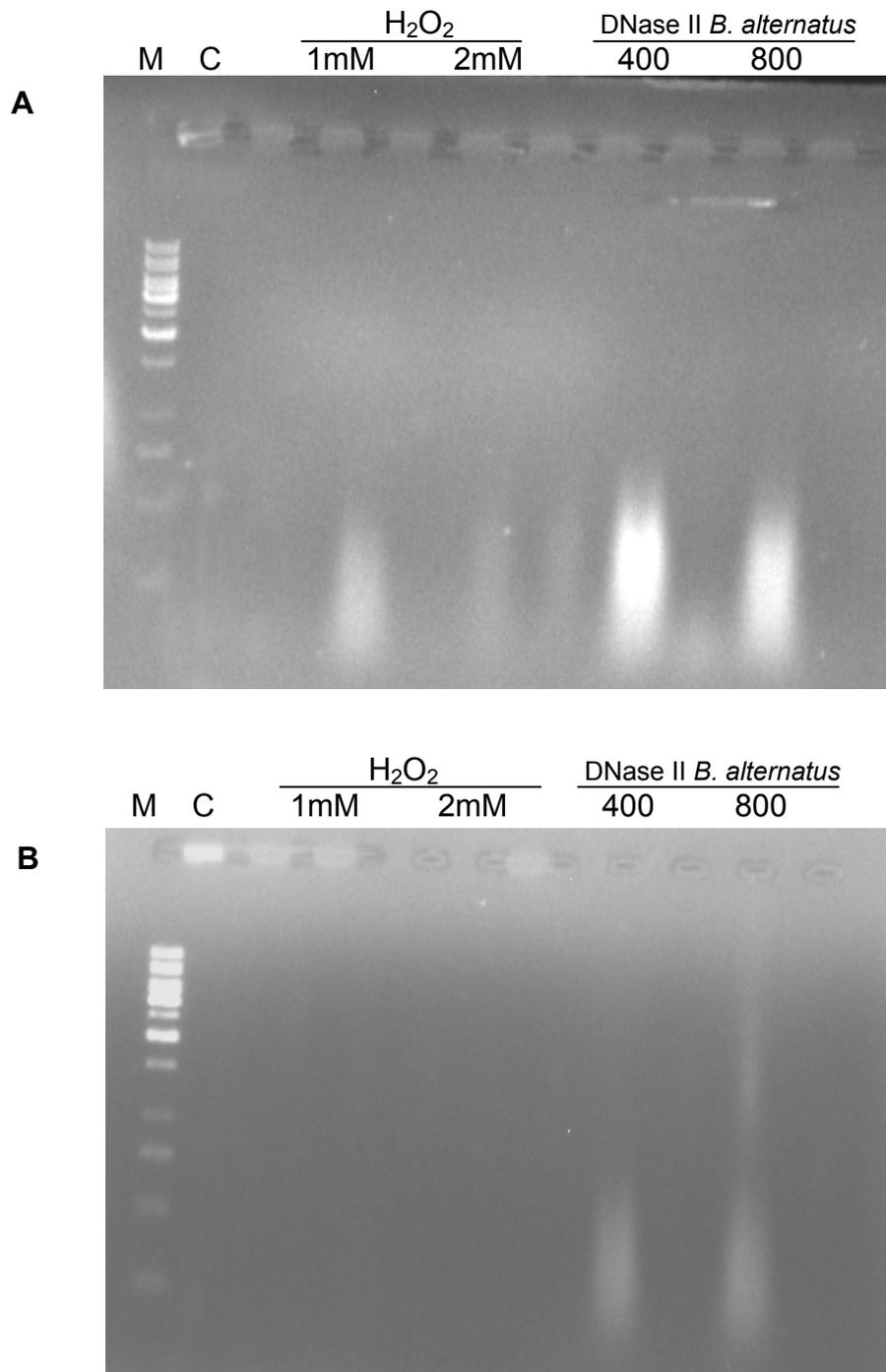


Figura 4.6: Análise eletroforética da fragmentação de DNA em células MDCK tratadas com DNase II de *B. alternatus* ou H₂O₂ 1 e 2 mM. Após os tratamentos o DNA foi extraído conforme descrito em Materiais e Métodos e feita a eletroforese em gel de 1,2% de agarose com brometo de etídio. Realizamos tratamentos de (A) 24 h e (B) 48 h conforme indicado na figura. M – marcador de DNA (1 kb); C – controle negativo; DNase - 400 U/mL e 800 U/mL.

Captação de vermelho neutro

Comparamos a citotoxicidade da DNase II de *B. alternatus* em células MDCK em cultura com a de duas DNases de mamíferos: DNase II suína e DNase I bovina (ambas da Sigma). As duas DNases de mamíferos causaram reduções na viabilidade de células MDCK significativamente quando na concentração de 4.000 U/mL, após 72 h de tratamento, DNase I bovina reduziu a viabilidade em $21,3 \pm 9\%$ (n=12) e a DNase II suína reduziu a viabilidade celular em $22,5 \pm 13\%$ (n=12) (figura 4.7a). Em concentrações menores, mesmo após tratamento durante 72 h, tanto a DNase II suína (800 U/mL) quanto a DNase I bovina (400 U/mL) não causaram reduções significativas na viabilidade celular.

No entanto, para o tratamento com a DNase II de *B. alternatus*, concentrações a partir de 400 U/mL em 72 h de tratamento já causaram uma significativa redução da viabilidade em $14,4 \pm 10\%$ (n=6), enquanto que em 48 h a concentração de 800 U/mL causou uma significativa redução da viabilidade em $22,4 \pm 12\%$ (n=6).

A DNase II de *B. alternatus* nas concentrações de 8.000 U/mL e 10.000 U/mL reduziu a viabilidade em $32,3 \pm 11,7\%$ (n=6) e $40,8 \pm 2\%$ (n=6) após 24 h de tratamento, e em $91,6 \pm 1,3\%$ (n=6) e $92,6 \pm 0,8\%$ (n=6) após 72 h, respectivamente. Após 48 h de tratamento, a DNase II em concentrações a partir de 800 U/mL ($21,4 \pm 9,5\%$, n=6) começou a demonstrar citotoxicidade significativa, e, no caso da DNase II suína esta mesma concentração utilizada produziu uma ação menos rápida, e até 72 h ainda não observamos citotoxicidade significativa. Já a concentração de 4.000 U/mL teve uma redução de $44,2 \pm 22,8\%$ (n=6) na viabilidade celular no tempo de 48 h. Em

72 h de tratamento, 400 U de DNase II/mL causou uma redução de $21,9 \pm 18,3\%$ (n=6), e 4.000 U/mL uma redução de $65,4 \pm 18,7\%$ (n=6) em relação ao controle.

Liberação de LDH

Na avaliação da viabilidade celular através da dosagem no meio de cultura de lactato desidrogenase (LDH), um indicador da integridade da membrana plasmática (a lactato desidrogenase é uma enzima presente no citoplasma celular que é liberada no meio de cultura quando esta membrana se encontra lesada, e pode ser quantificada extracelularmente), foi possível detectar alterações celulares e conseqüente citotoxicidade depois de 24 h de tratamento com 400 U de DNase II/mL ($55,4 \pm 3,7\%$ de liberação, n=3), e de 48 h de tratamento com 100 U de DNase II/mL ($27,2 \pm 4,1\%$, n=6), sendo que após 72 h de incubação com 800 U de DNase II/mL houve liberação de LDH de $84,7 \pm 5\%$ (n=6) (figura 4.7b).

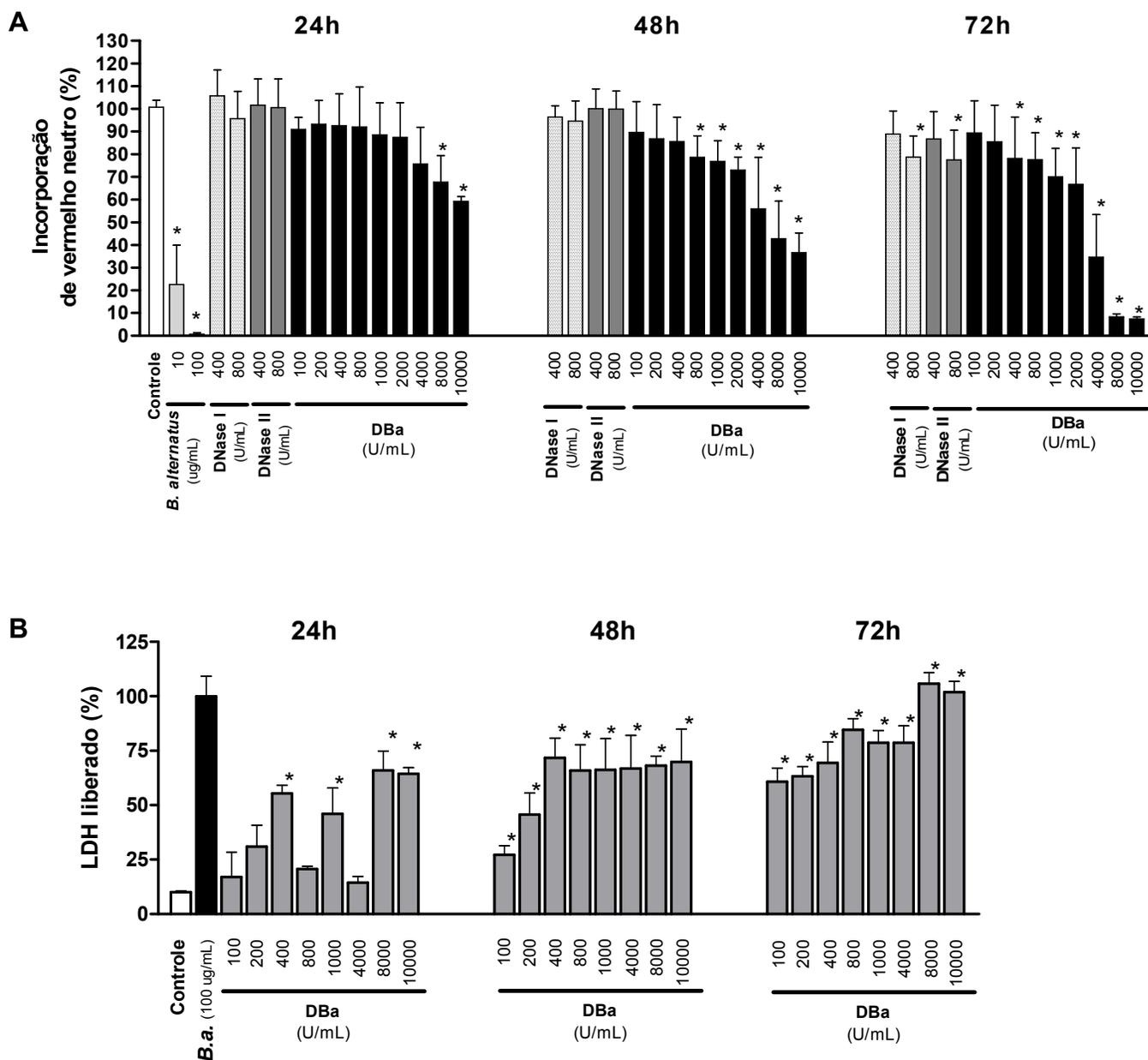


Figura 4.7: Viabilidade de células MDCK após incubação com DNase II de *B. alternatus* (DBa). (A) Incorporação de vermelho neutro e (B) Liberação de lactato desidrogenase (LDH) pelas células, conforme descrito em Materiais e Métodos. As células do grupo controle foram tratadas com apenas meio de cultura durante os tempos indicados. Os valores são a média + DP de 12 (DNases de mamíferos) e 6 (DNase de *B. alternatus*) experimentos independentes, realizados em triplicata. * $p < 0,05$ em comparação com o controle (ANOVA seguido de teste de Tukey).

Atividade apoptótica da DNase II

A partir destes dados selecionamos três concentrações de tratamento com DNase II de *B. alternatus* (DNase 400 U/mL, 1.000 U/mL e 4.000 U/mL) para avaliarmos o tipo de morte celular e porcentagem de apoptose e necrose através de citometria de fluxo com anexina V. As concentrações usadas basearam-se principalmente nos experimentos de viabilidade celular por vermelho neutro: a concentração de 400 U/mL (~20 µg/mL) induziu poucas alterações e mostrou um início de morte celular, a concentração de 1.000 U de DNase/mL (~50 µg/mL) foi tóxica, com liberação de LDH, e a concentração de 4.000 U/mL (~200 µg/mL) resultou em <50% de viabilidade após 72 h. As avaliações foram realizadas em uma mesma sessão experimental, com um controle que não recebeu toxina e foi tratado somente com meio de cultura (2.5% de apoptose e 13% de necrose) e um controle positivo para apoptose (2 mM de H₂O₂) (21,3% de apoptose e 9% de necrose), em todos os períodos de tempo.

Conforme mostrado na figura 4.8, a DNase II causou maior quantidade de apoptose do que necrose, evidenciado pelo aumento na quantidade células ao longo dos quadrantes 4 (Q4) e 2 (Q2), que representam apoptose recente e tardia, respectivamente, sendo que na concentração de 400 U/mL observamos 3,4% de apoptose e 12% de necrose em 24 h, 14% de apoptose e 4,3% de necrose em 48 h e 20,3% de apoptose e 8,2% de necrose em 72 h. Já na concentração de 1.000 U/mL, observamos uma aparente recuperação em 48 h, mas que não foi mantida por mais tempo, já que de 8,9% de apoptose e 9.1% de necrose em 24 h, foi para 28,6% de apoptose e 8,2% em necrose em 72 h. Ao contrário do que se esperava, a concentração de 4.000 U/mL, apesar de ter uma grande porcentagem de células em

apoptose nas primeiras 24 h (21,8%), e um aumento em 48 h (29,6%), mostrou uma diminuição em 72 h (14,7%); a porcentagem de células em necrose após 24 h foi de 10,1%, e após 72 h foi de 5,4%.

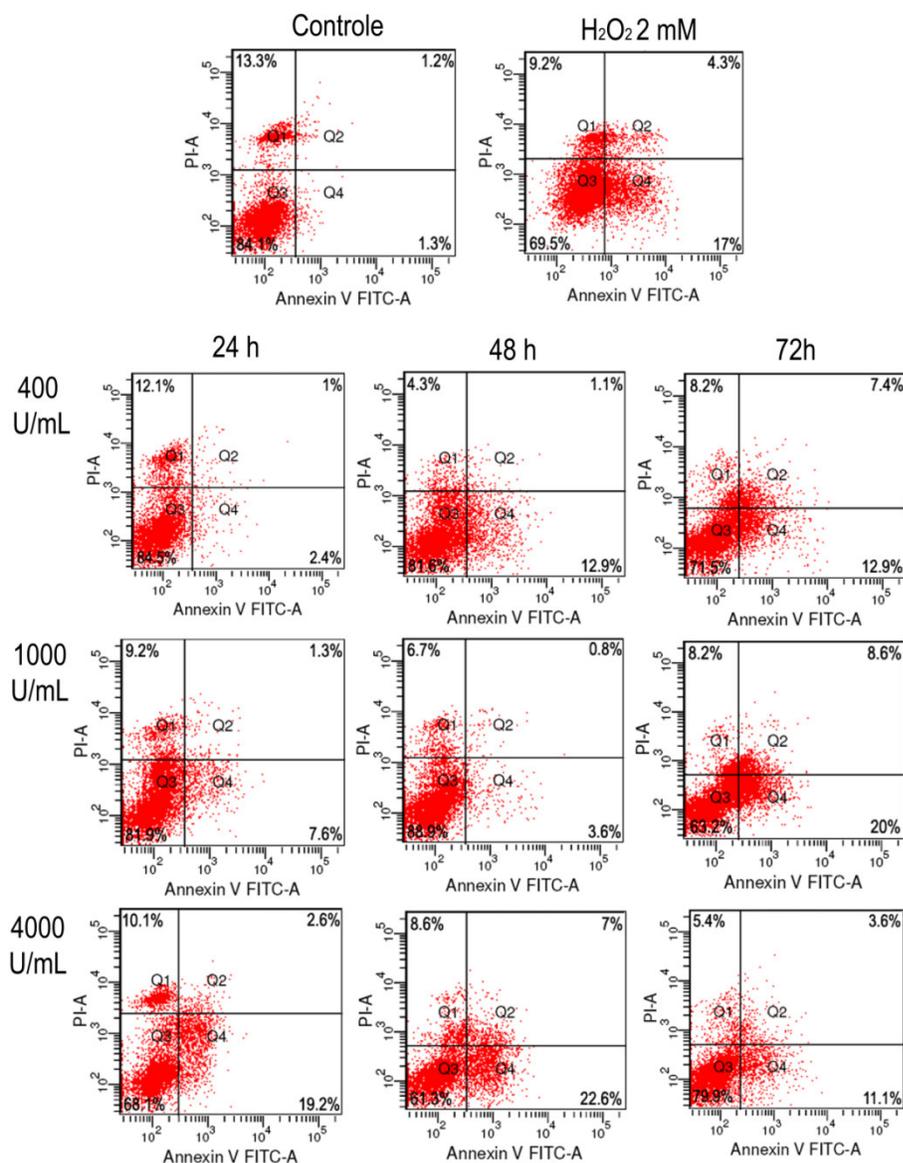


Figura 4.8: Análise por citometria de fluxo de células MDCK tratadas com DNase II de *B. alternatus*. As células foram coletadas e incubadas com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (PI) conforme descrito nos Métodos, para subsequente análise da fluorescência.

Atividade de caspases após tratamento com DNase II

Tendo em vista os resultados acima apontando para a ocorrência de apoptose, avaliamos se havia ativação da via das caspases nas células MDCK tratadas com DNase II. Para isso, medimos a atividade destas enzimas sobre substratos específicos. O substrato Ac-DEVD-pNA foi usado para avaliar a atividade de caspase efetora 3 (ou 7, pois o substrato seria o mesmo), chave no processo de apoptose, sendo responsável por clivar e iniciar a degradação da grande maioria das proteínas celulares.

A figura 4.9 mostra que houve ativação da caspase 3 a partir de 24 h, nas maiores concentrações utilizadas (1.000 U/mL e 4.000 U/mL), maior até que o controle positivo de peróxido de hidrogênio. A partir de 48 h, as outras concentrações (400 U/mL e 800 U/mL) também ativaram caspase 3, e as concentrações de 1.000 U/mL e 4.000 U/mL mostraram um aumento em relação à 24 h. Em 72 h, o mesmo efeito observado na avaliação de anexina-V ocorreu com ativação de caspase 3, ou seja, a atividade desta enzima diminuiu com a concentração de 4.000 U/mL, mas manteve-se elevada após tratamento com 1.000 U/mL.

Em seguida, avaliamos a atividade das caspases iniciadoras 8 e 9, que representariam as vias dos receptores de morte e mitocondrial, respectivamente. Para avaliar a atividade de caspase 8, utilizamos o substrato específico Ac-IETD-pNA, e para caspase 9, o substrato específico Ac-LEDH-pNa. Conforme mostrado na figura 4.9, a atividade de ambas estas caspases aumentou após o tratamento de células MDCK com DNase II. Porém, o aumento na atividade de caspase 8 iniciou-se já nas primeiras 24 horas de tratamento, quando 800 U de DNase II/mL apresentou atividade de $1,7 \pm 1,2$

$\mu\text{mol pNA}/\text{min}/\text{mL}$ ($n=3$) e a partir de 48 horas todas as concentrações causaram aumentos, com as menores causando aumentos maiores que as concentrações maiores.

Com relação à caspase 9, houve ativação após 24 h de tratamento apenas na concentração de 4.000 U/mL. Com intervalos maiores de tratamento (48 h e 72 h), concentrações menores também causaram ativação desta enzima (após 72 h de tratamento com DNase todas as concentrações resultaram em ativação), porém a ativação com a maior concentração (4.000 U/mL) foi menor que aquela vista após 24 h.

Estes dados sugerem um possível envolvimento da caspase 8 como iniciadora dos efeitos apoptóticos da DNase II, e que este estímulo direta ou indiretamente ativa a caspase 9. A ativação de caspase 8 pode dar início à clivagem e ativação de caspase 3 (efetora), já que esta está ativa antes da caspase 9 estar ativada. Mas também é possível que haja a ativação de caspase 3, aumentando o sinal apoptótico e a via de degradação dependente de caspase.

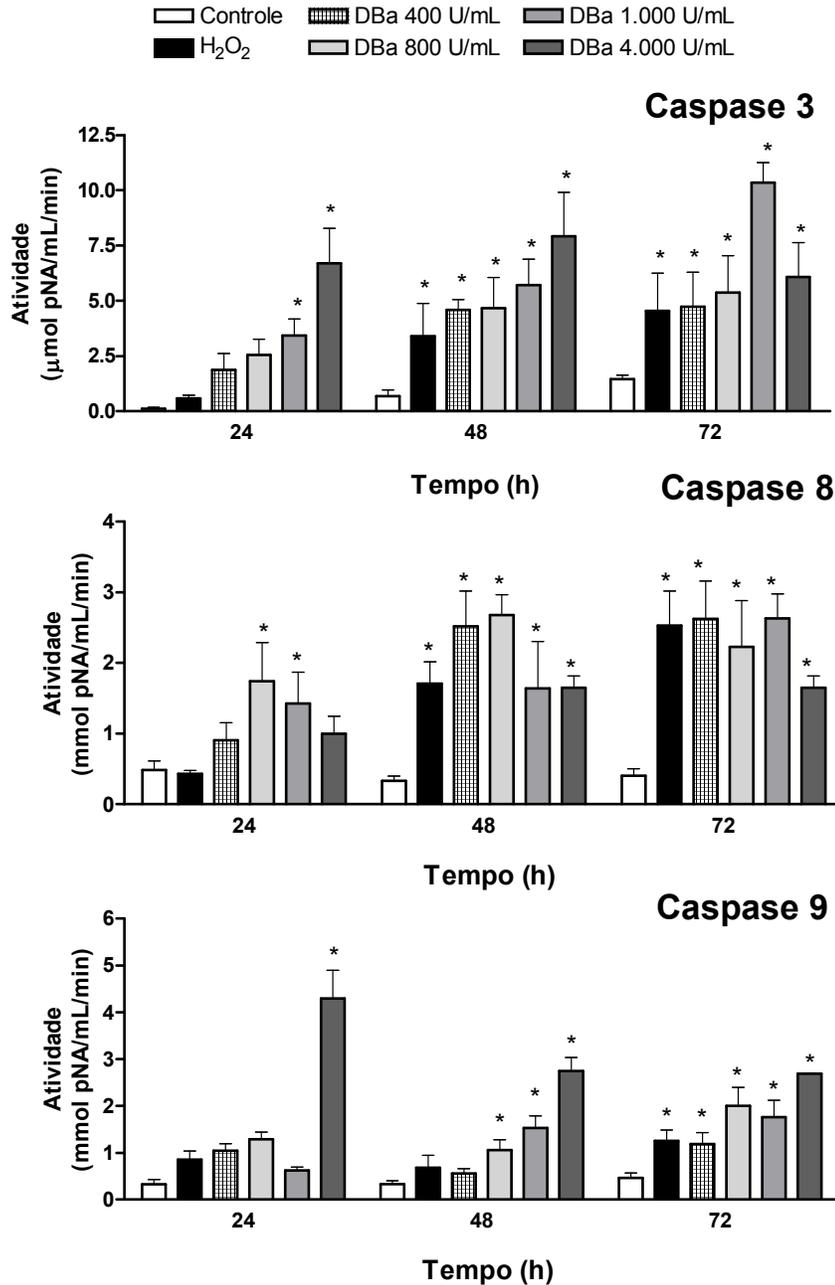


Figura 4.9: Atividade de caspases 3 (com o substrato Ac-DEVD-pNA; n=5), 8 (com o substrato Ac-IETD-pNA; n=3) e 9 (com o substrato Ac-LEHD-pNA; n=3) em células MDCK tratadas com DNase II. As atividades foram calculadas com base em uma curva padrão de p-nitroanilina. As barras representam a média + DP. *p<0,05 em comparação com o controle (ANOVA seguido de teste de Tukey).

Os resultados de ativação da via das caspases indicam um envolvimento desta via na toxicidade da DNase II de *B. alternatus*. Para avaliarmos a relação entre estes dois fenômenos, tratamos as células com inibidores específicos das três caspases estudadas. Utilizamos, neste experimento, a concentração de 1.000 U de DNase II /mL em 48 h de tratamento, porque, como observado na figura 4.9, nesta concentração há ativação de todas as caspases.

Como mostra a figura 4.10 os resultados iniciais com inibidores para as três caspases testadas. Verificamos que a atividade de caspase 3 é inibida pelo pré-tratamento das células com os três inibidores utilizados Z-DQMD-FMK, mais específico para caspase 3 e 7; Z-IETD-FMK, que é mais específico para caspase 8; e Z-LEDH-FMK, mais específico para caspase 9, antes do tratamento com DNase II. Este resultado já era esperado porque a caspase 3 pode ser clivada tanto por caspase 8 quanto por caspase 9, portanto, a inibição do início da cascata, leva a interrupção do sinal apoptótico via caspases, e não ocorre a clivagem de pró-caspase 3 em caspase 3 ativa.

A atividade de caspase 8 foi também inibida por todos os inibidores utilizados, apesar deste resultado ser inesperado, é conhecido que a especificidade de inibidores não pode ser garantida, e que um mesmo inibidor pode inativar mais de uma caspase. (BOATRIGHT e SALVESEN, 2003). A caspase 9, ao contrário, foi apenas inibida pelo inibidor desenhado para sua inibição. Porém, mesmo com a ativação de caspase 9, não houve a clivagem da caspase 3, ou esta ativação foi mínima e indetectável em nosso ensaio.

A inibição das caspases resultou em células com aspecto normal na visualização em microscópio de contraste de fase (resultado não mostrado), porém ensaios de viabilidade celular ainda precisarão ser realizados, para confirmar a ação da DNase II na via dependente de caspase.

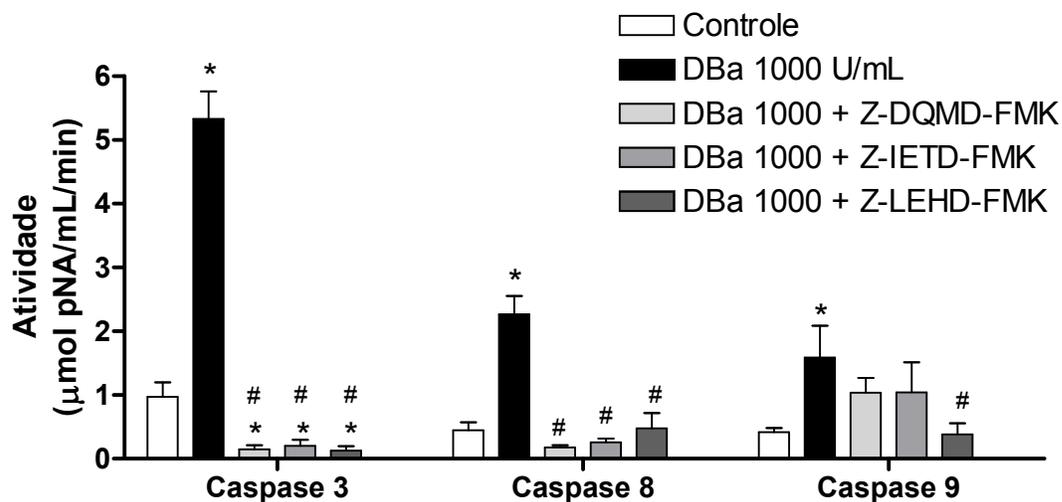


Figura 4.10: Atividade de caspases 3, 8 e 9 após tratamento das células MDCK com DNase II e inibidores de caspases: Z-DQMD-FMK - inibidor de caspase 3, Z-IETD-FMK - inibidor de caspase 8 e Z-LEHD - inibidor de caspase 9. As atividades foram calculadas com base em uma curva padrão de p-nitroanilina. As barras representam a média + DP. * $p < 0,01$ em comparação com o controle e # $p < 0,05$ em comparação com o tratado com DNase II somente (ANOVA seguido de teste de Tukey).

Investigamos a expressão de algumas proteínas envolvidas em apoptose nas células MDCK tratadas com DNase II. Observamos que, a partir de 48 h de tratamento, a proteína Bcl-2 (anti-apoptótica) foi menos expressa nas células tratadas com 1.000 U

de DNase/mL, mas é bem nítido a falta desta proteína nas células que foram tratadas com 4.000 U de DNase/mL, o que também ocorre com o tratamento por 72 h (figura 4.11a). Também observamos, nestas concentrações mais altas, em 48 h (figura 4.11b), que ocorre a diminuição da expressão de pró-caspase 8 (54 kDa), indicando a clivagem e dimerização desta proteína. O anticorpo é específico para a forma pró, portanto não reconhece a forma ativa da enzima (fragmento de ~20 kDa). Já para caspase 3, podemos observar tanto a da expressão da forma pró (~32 kDa) e aumento da expressão da forma ativa, que na figura 4.11c é observada pelo aumento da expressão do fragmento de 20 kDa. Também confirmamos a ativação da cascata de caspases pelo aumento da clivagem de um substrato natural destas proteases, a proteína nuclear poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), que atua na reparação de DNA clivado. O anticorpo utilizado neste experimento reconhece apenas o fragmento clivado, portanto, somente células que estejam em apoptose. Observamos na figura 4.11d que no tratamento das células com concentrações a partir de 800 U DNase/mL por 48 h, ocorre a clivagem de PARP, caracterizando a apoptose. Esta expressão é bastante evidente no tratamento com a concentração de 4.000 U/mL, como observado para outras proteínas, a partir de 48 h prolongando-se por 72 h.

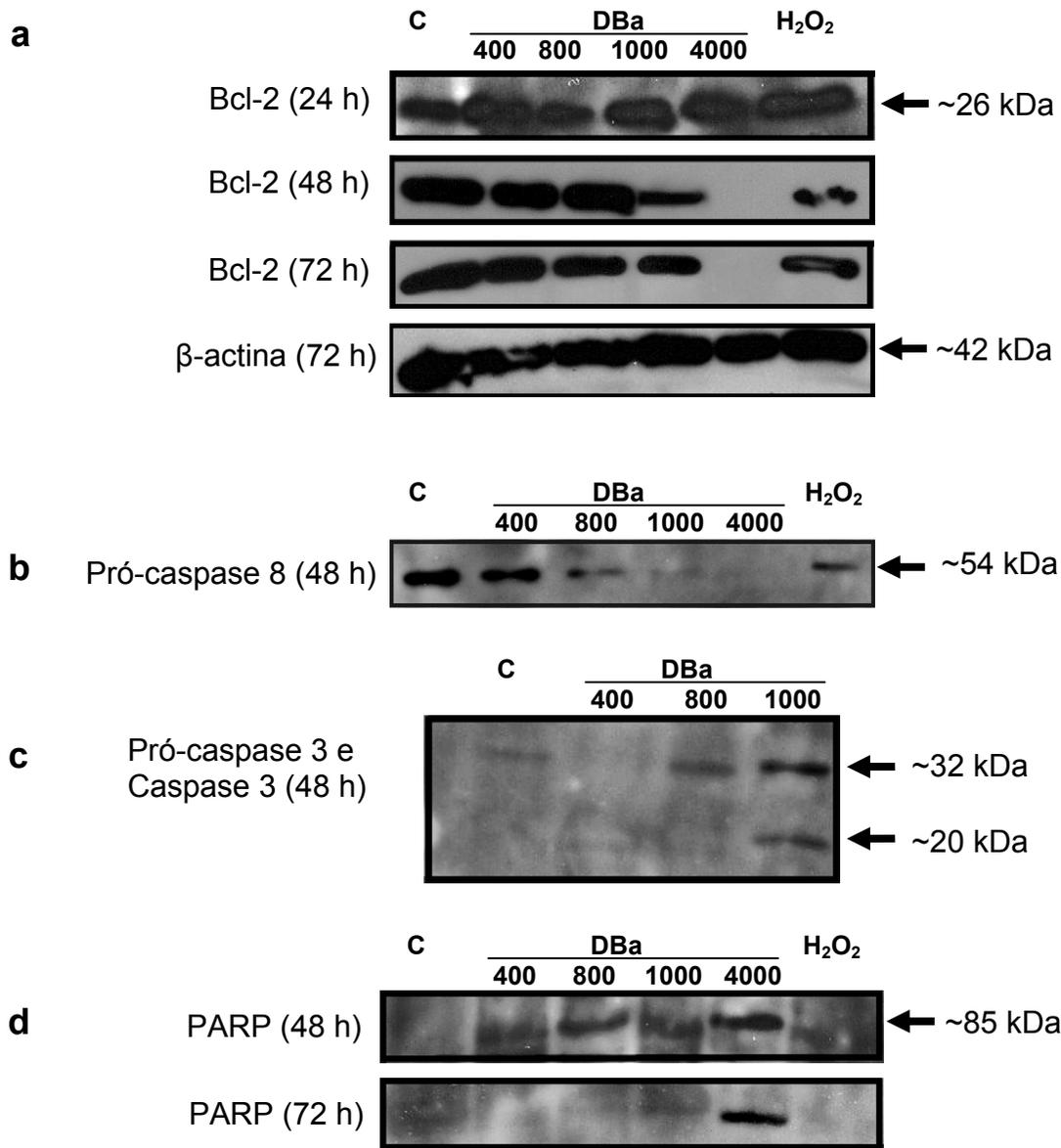


Figura 4.11: Western blotting das proteínas envolvidas em apoptose. Tratamento das células MDCK com DNase II nas concentrações indicadas na figura. (a) Bcl-2, (b) pró-caspase 8, (c) caspase 3 e (d) PARP. C = controle; DBa = DNase II de *B. alternatus*, H₂O₂ = peróxido de hidrogênio. As figuras mostradas são representativas: (a) de 3 e (b,c,d) de 2 experimentos independentes.

DISCUSSÃO

Os estudos sobre DNases, especialmente as formas ácidas, têm aumentado nos últimos anos, com a demonstração da sua participação nas vias apoptóticas em diferentes tecidos, células e organismos (BARRY e EASTMAN, 1993; EVANS e AGUILERA, 2003; COUNIS e TORRIGLIA, 2006; FOMBONNE *et al.*, 2006; MACLEA e CHENG, 2006; NAKAHARA *et al.*, 2007; PADRON-BARTHE *et al.*, 2007). Paralelamente, outros trabalhos têm investigado a estrutura e função destas enzimas (CYMERMAN *et al.*, 2005; CHENG *et al.*, 2006; NAGAI *et al.*, 2006) nos mais diversos organismos (SHIOMI *et al.*, 2004; YE *et al.*, 2004; OVERBO e MYRNES, 2006; SEONG *et al.*, 2006).

Por outro lado, pouco se conhece sobre a atividade de DNases em peçonhas, sendo a DNase I (alcalina) mais estudada (TABORDA *et al.*, 1952; LASKOWSKI, 1980; SITTENFELD *et al.*, 1991; DE ROODT *et al.*, 2003; SALES e SANTORO, 2007) que a DNase II (ácida) (AIRD, 2002). Até o momento, nenhum trabalho relatou o possível envolvimento de DNases II ofídicas em apoptose durante o dano tecidual causada por acidentes ofídicas. Por isso investigamos a citotoxicidade e atividade apoptótica da DNase II descrita no capítulo 3.

A incorporação de vermelho neutro e a liberação de LDH são comumente usadas para avaliar a citotoxicidade de peçonhas e toxinas em células em cultura (LOMONTE *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2004; PONCE-SOTO *et al.*, 2007), embora a sensibilidade dos dois métodos varie de acordo com a injúria causada à célula (ARECHABALA *et al.*, 1999). Conforme demonstrado aqui usando

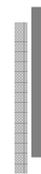
estas duas abordagens (LOBNER *et al.*, 2000), a DNase II de *B. alternatus* foi citotóxica a células MDCK, sendo que o efeito variava com a concentração de toxina usada e a duração de exposição à mesma. Comparada à DNase II de *Acanthaster planci* (SHIOMI *et al.*, 2004; OTA *et al.*, 2006), em que 10 µg da toxina/mL produziu efeito citotóxico em células hepáticas, a DNase de *B. alternatus* foi menos potente em células MDCK renais. Quanto à comparação com DNases I e II de mamíferos, podemos concluir que a DNase II purificada da peçonha de *B. alternatus* é mais tóxica que as DNases de mamíferos, pois causa morte celular em concentrações menores e em menos tempo que estas.

Os nossos resultados demonstram que a DNase II é capaz de induzir apoptose e que há também uma ativação da via das caspases. Porém, ainda não está totalmente claro se esta apoptose e citotoxicidade ocorrem por mecanismos dependentes de caspase ou não. Julgamos que a caspase 8 inicia os estímulos citotóxicos, pois é a caspase que atinge o pico de ativação mais cedo. Caspase 8 encontra-se na forma de uma pró-enzima e sinais externos recebidos através de receptores de morte levam ao recrutamento e agregação de pró-caspases 8, que mutuamente se clivam e ativam-se em caspase 8 (SALVESEN e DIXIT, 1999; HENGARTNER, 2000). Estes estímulos ativam direta ou indiretamente a caspase 3, um homodímero também encontrado sob a forma de pró-caspase, que é clivada por caspases iniciadoras.

A caspase 9, ao contrário das anteriores, forma um complexo, conhecido como apoptossomo, do qual fazem parte a pró-caspase 9 (STENNICKE *et al.*, 1999) ou caspase 9 clivada, de citocromo c, Apaf-1, e é dependente de ATP (ADAMS e CORY, 2002; BAO e SHI, 2007). Ou seja, para que haja ativação do apoptossomo, a mitocôndria deve liberar citocromo c para o citoplasma, em resposta a dano tecidual.

Esta liberação de citocromo c é regulada pela família de proteínas Bcl-2 (ADAMS e CORY, 1998, 2002; GREEN e KROEMER, 1998, 2004). Células tratadas com toxinas derivadas de peçonhas ofídicas, como cardiotoxina III (YANG *et al.*, 2005; 2007; TSAI *et al.*, 2006; CHIEN *et al.*, 2008) e algumas L-AAO (ZHANG e WEI, 2007), morrem por apoptose via diminuição da expressão de Bcl-2 (TSAI *et al.*, 2006), uma proteína contida na membrana mitocondrial e conhecida por ser anti-apoptótico (CORY e ADAMS, 2002), e maior expressão de Bax, pró-apoptótica, ou outra proteína da família Bcl-2, como Bad, que faria com que a relação anti/pró-apoptótica diminua. Observamos aqui que a ação citotóxica da DNase II ocorreu através da diminuição da expressão de Bcl-2. Estas alterações levariam à apoptose (TANJONI *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2006), e a liberação de citocromo c para o citosol (CHIEN *et al.*, 2008).

Proteínas da família de Bcl-2 (domínio BH3) são substratos para caspase 8 (GREEN e KROEMER, 1998; KRUIDERING e EVAN, 2000). Portanto, a ativação de caspase 8 (conforme visto aqui) levaria à redução de Bcl-2 (também visto aqui), o que pode resultar na liberação de citocromo c, e à formação do apoptossomo e ativando caspase 9. O que os nossos resultados indicam é que a ativação de ambas as caspases (8 e 9), inter-relacionadas ou não, ativa a caspase 3 (figura 4.12), e aumenta o sinal de morte por apoptose (COHEN, 1998). Recentemente, ZHANG e CUI (2007) demonstraram que a ACTX-6 (L-AAO de *Agkistrodon acutus*) ativa a via de receptor de Fas, que ativa caspase 8. A caspase 8 por sua vez, cliva Bid, que, uma vez ativada, modifica Bax, formando poros na membrana mitocondrial, o que leva à liberação de citocromo c e outros sinais de morte; observaram também a ativação de caspase 9 após ativação de caspases 8 e 3.



CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste projeto mostram que:

1. A peçonha de *B. alternatus* exerce um efeito bastante citotóxico em células em MDCK em cultura, com a reorganização do citoesqueleto, e morte celular predominantemente por necrose.
2. A citotoxicidade parece envolver espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio, particularmente H₂O₂.
3. A peçonha de *B. alternatus* contém uma DNase ácida com propriedades físico-químicas semelhantes a outras DNases ácidas.
4. Esta DNase é citotóxica em células MDCK em cultura, causando apoptose que envolve a ativação de caspases normalmente associadas a este fenômeno, e esta ação ocorre também pela via mitocondrial.



CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A., RAEL, E.D., MADDUX, N.L., LIEB, C.S. (1993). Detection of alkaline phosphatase in venom by blotting methods. **Toxicon** 32: 227-231.
- ADAMS, J.M., CORY, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science** 281: 1322-1326.
- ADAMS, J.M., CORY, S. (2002). Apoptosomes: engines for caspase activation. **Curr. Opin. Cell Biol.** 14: 715-720.
- ADAMS, M.D., CELNIKER, S.E., HOLT, R.A., EVANS, C.A., GOCAYNE, J.D., AMANATIDES, P.G., SCHERER, S.E., LI, P.W., HOSKINS, R.A., GALLE, R.F., GEORGE, R.A., LEWIS, S.E., RICHARDS, S., ASHBURNER, M., HENDERSON, S.N., SUTTON, G.G., WORTMAN, J.R., YANDELL, M.D., ZHANG, Q., CHEN, L.X., BRANDON, R.C., ROGERS, Y.H., BLAZEJ, R.G., CHAMPE, M., PFEIFFER, B.D., WAN, K.H., DOYLE, C., BAXTER, E.G., HELT, G., NELSON, C.R., GABOR, G.L., ABRIL, J.F., AGBAYANI, A., AN, H.J., ANDREWS-PFANNKOCH, C., BALDWIN, D., BALLEW, R.M., BASU, A., BAXENDALE, J., BAYRAKTAROGLU, L., BEASLEY, E.M., BEESON, K.Y., BENOS, P.V., BERMAN, B.P., BHANDARI, D., BOLSHAKOV, S., BORKOVA, D., BOTCHAN, M.R., BOUCK, J., BROKSTEIN, P., BROTTIER, P., BURTIS, K.C., BUSAM, D.A., BUTLER, H., CADIEU, E., CENTER, A., CHANDRA, I., CHERRY, J.M., CAWLEY, S., DAHLKE, C., DAVENPORT, L.B., DAVIES, P., DE PABLOS, B., DELCHER, A., DENG, Z., MAYS, A.D., DEW, I., DIETZ, S.M., DODSON, K., DOUP, L.E., DOWNES, M., DUGAN-ROCHA, S., DUNKOV, B.C., DUNN, P., DURBIN, K.J., EVANGELISTA, C.C., FERRAZ, C., FERRIERA, S., FLEISCHMANN, W., FOSLER, C., GABRIELIAN, A.E., GARG, N.S., GELBART, W.M., GLASSER, K., GLODEK, A., GONG, F., GORRELL, J.H., GU, Z., GUAN, P., HARRIS, M., HARRIS, N.L., HARVEY, D., HEIMAN, T.J., HERNANDEZ, J.R., HOUCK, J., HOSTIN, D., HOUSTON, K.A., HOWLAND, T.J., WEI, M.H., IBEGWAM, C., JALALI, M., KALUSH, F., KARPEN, G.H., KE, Z., KENNISON, J.A., KETCHUM, K.A., KIMMEL, B.E., KODIRA, C.D., KRAFT, C., KRAVITZ, S., KULP, D., LAI, Z., LASKO, P., LEI, Y., LEVITSKY, A.A., LI, J., LI, Z., LIANG, Y., LIN, X., LIU, X., MATTEI, B., MCINTOSH, T.C., MCLEOD, M.P., MCPHERSON, D., MERKULOV, G., MILSHINA, N.V., MOBARRY, C., MORRIS, J., MOSHREFI, A., MOUNT, S.M., MOY, M., MURPHY, B., MURPHY, L., MUZNY, D.M., NELSON, D.L., NELSON, D.R., NELSON, K.A., NIXON, K., NUSSKERN, D.R., PACLEB, J.M., PALAZZOLO, M., PITTMAN, G.S., PAN, S., POLLARD, J., PURI, V., REESE, M.G., REINERT, K., REMINGTON, K., SAUNDERS, R.D., SCHEELER, F., SHEN, H., SHUE, B.C., SIDEN-KIAMOS, I., SIMPSON, M., SKUPSKI, M.P., SMITH, T., SPIER, E., SPRADLING, A.C., STAPLETON, M., STRONG, R., SUN, E., SVIRSKAS, R., TECTOR, C., TURNER, R., VENTER, E., WANG, A.H., WANG, X., WANG, Z.Y., WASSARMAN, D.A., WEINSTOCK, G.M., WEISSENBACH, J., WILLIAMS, S.M., WOODAGE, T., WORLEY, K.C., WU, D., YANG, S., YAO, Q.A., YE, J., YEH, R.F., ZAVERI, J.S., ZHAN, M., ZHANG, G., ZHAO, Q., ZHENG, L., ZHENG, X.H., ZHONG, F.N., ZHONG, W., ZHOU, X., ZHU, S., ZHU, X., SMITH, H.O., GIBBS, R.A., MYERS, E.W., RUBIN, G.M., VENTER, J.C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science** 287: 2185-2195.
- AHN, M.Y., LEE, B.M., KIM, Y.S. (1997). Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 29: 911-919.
- AIRD, S.D. (2002). Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon** 40: 335-393.

- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. (Ed.). (2002). **Molecular Biology of the Cell**. New York, Garland Science.
- ALLEN, R.T., HUNTER III, W.J., AGRAWAL, D.K. (1997). Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. **J. Pharmacol. Toxicol. Meth.** 37: 215-228.
- ALTAIRAC, S., ZEGGAI, S., PERANI, P., COURTOIS, Y., TORRIGLIA, A. (2003). Apoptosis induced by Na^+/H^+ antiport inhibition activates the LEI/L-DNase II pathway. **Cell Death Differ.** 10: 548-557.
- AMARAL, C.F.S., DA SILVA, O.A., GODOY, P., MIRANDA, D. 1985. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. **Toxicon** 23: 877-885.
- AMARAL, C.F.S., RESENDE, N.A., DA SILVA, O.A., RIBEIRO, M.M.F., MAGALHÃES, R.A., REIS, R.J., CARNEIRO, J.G., CASTRO, J.R.S. (1986). Insuficiência renal aguda secundária à acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Rev. Int. Med. Trop. São Paulo** 28: 220-227.
- ANDE, S.R., KOMMOJU, P.R., DRAXL, S., MURKOVIC, M., MACHEROUX, P., GHISLA, S., FERRANDO-MAY, E. (2006). Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis** 11: 1439-1451.
- ANTUNES, E., RODRIGUES-SIMIONI, L., PRADO-FRANCESCHI, J. (1989). Cross-neutralization on the histamine-releasing activity of snake venoms. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.** 39: 431-438.
- ARAKI, S., ISHIDA, T., YAMAMOTO, T., KAJI, K., HAYASHI, H. (1993). Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venom in vascular endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 190: 148-153.
- ARAKI, S., MASUDA, S., MAEDA, H., YING, M.J., HAYASHI, H. (2002). Involvement of specific integrins in apoptosis induced by vascular apoptosis-inducing protein 1. **Toxicon** 40: 535-542.
- ARECHABALA, B., COIFFARD, C., RIVALLAND, P., COIFFARD, L.J., DE ROECK-HOLTZHAUER, Y. (1999). Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. **J. Appl. Toxicol.** 19: 163-5
- ARENDS, M.J., MORRIS, R.G., WYLLIE, A.H. (1990). Apoptosis. The role of the endonuclease. **Am. J. Pathol.** 136: 593-608.
- ARRUTI, C., CHAUDUN, E., DEMARIA, A., COURTOIS, Y., COUNIS, M.F. (1995). Characterization of eye-lens DNases: long term persistence of activity in post apoptotic lens fibre cells. **Cell Death Differ.** 2: 47-56.
- BAILEY, G.S. (Ed.). (1998). **Enzymes from Snake Venom**. Fort Collins, Alaken Press Inc.
- BAKER, K.P., BARON, W.F., HENZEL, W.J., SPENCER, S.A. (1998). Molecular cloning and characterization of human and murine DNase II. **Gene** 215: 281-289.
- BALDO, C., TANJONI, I., LEÓN, I.R., BATISTA, I.F., DELLA-CASA, M.S., CLISSA, P.B., WEINLICH, R., LOPES-FERREIRA, M., LEBRUN, I., AMARANTE-MENDES, G.P., RODRIGUES, V.M., PERALES, J., VALENTE, R.H., MOURA-DA-SILVA, A.M. (2008). BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. **Toxicon** 51: 54-65.
- BAO, Q., SHI, Y. (2007). Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. **Cell Death Differ.** 14: 56-65.
- BARBOSA, P.S.F., HAVT, A., FACÓ, P.E.G., SOUSA, T.M., BEZERRA, I.S.A.M., FONTELES, M.C., TOYAMA, M.H., MARANGONI, S., NOVELLO, J.C., MONTEIRO, H.S.A. (2002). Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. **Toxicon** 40: 1427-1435.

- BARRAL-NETTO, M., SCHRIEFER, A., BARRAL, A., ALMEIDA, A.R.P., MANGABEIRA, A. (1991). Serum levels of bothropic venom in patients without antivenom intervention. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 45: 751-754.
- BARRY, M.A., EASTMAN, A. (1993). Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. **Arch. Biochem. Biophys.** 300: 440-450.
- BAUAB, F.A., JUNQUEIRA, G.R., CORRADINI, M.C., SILVEIRA, P.V., NISHIOKA, A.S. (1994). Clinical and epidemiological aspects of the 'urutu' lance-headed viper (*Bothrops alternatus*) bite in Brazilian hospital. **Trop. Med. Parasitol.** 45: 243-245.
- BEGHINI, D.G., TOYAMA, M.H., HYSLOP, S., SODEK, L., NOVELLO, J.C., MARANGONI, S. (2000). Enzymatic characterization of a novel phospholipase A₂ from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (maracambóia) venom. **J. Protein Chem.** 19: 603-607.
- BELLUOMINI, H.E. (1984). Conhecimentos sobre as serpentes brasileiras e medidas de prevenção de acidentes. **Rev. Bras. Saúde Ocup.** 12: 82-95.
- BERNARDI, G. (1966). Spleen acid deoxyribonuclease. In: CANTONI, G.L., DAVIES, D.R. (eds.), **Procedures in Nucleic Acid Research**, Harper and Row, New York, EUA, pp. 102-121.
- BERNARDI, G. (1971). Spleen acid deoxyribonuclease. In: BOYER, P. (Ed.). **Enzymes**. New York, Academic Press, pp. 271-287.
- BERNARDI, G., APPELA, E., ZITO, R. (1965). Studies on acid deoxyribonuclease. III. Physical and chemical properties of hog spleen acid deoxyribonuclease. **Biochemistry** 4: 1725-1729.
- BERNARDI, G., BERNARDI, A., CHERSI, A. (1966). Studies on acid hydrolases. I. A procedure for the preparation of acid deoxyribonuclease and other acid hydrolases. **Biochem. Biophys. Acta** 129:1-11.
- BIEBER, A. (1979). Metal and nonprotein constituents in snake venom. In: **Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology**. LEE, C.Y. (Ed.). Berlin, Springer Verlag, v. 52. pp. 295-306.
- BJARNASON, J.B., FOX, J.W. (1988/89) *J. Toxicol.- Toxin Rev.* 7, 121-209.
- BJÖRK, W. (1963). Purification of phosphodiesterase from *Bothrops atrox* venom, with special consideration of the elimination of monophosphatases. **J. Biol. Chem.** 238: 2487-2490.
- BOATRIGT, K.M., SALVESEN, G.S. (2003). Mechanisms of caspase activation. **Curr. Opin. Cell Biol.** 15: 725-731.
- BOER-LIMA, P.A., GONTIJO, J.A., CRUZ-HÖFLING, M.A. (1999). Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 61: 698-706.
- BOER-LIMA, P.A., GONTIJO, J.A., CRUZ-HÖFLING, M.A. (2002). *Bothrops moojeni* snake venom-induced glomeruli changes in rat. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 67: 217-222.
- BORENFREUND, E., PUERNER, J.A. (1984). A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **J. Tissue Cult. Meth.** 9: 7-9.
- BOUDREAU, N.J., JONES, P.L. (1999). Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. **Biochem. J.** 339: 481-488.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 172: 248-254.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2001). **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Fundação Nacional de Saúde.
- BRAZIL, V., 1901. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. **Rev. Méd. São Paulo** IV: 255-260.
- BRÜNE, B., SANDAU, K.B., VON KNETHEN, A. (1998a). Apoptotic cell death and nitric oxide: activation and antagonistic transducing pathways. **Biochemistry (Moscow)**. 63: 817-825.

- BRÜNE, B., VON KNETHEN, A., SANDAU, K.B. (1998b). Nitric oxide and its role in apoptosis. **Eur. J. Pharmacol.** 351: 261-272.
- BUCARETCHI, F., HERRERA, S.R., HYSLOP, S., BACARAT, E.C., VIEIRA, R.J. (2001). Snakebites by *Bothrops spp* in children in Campinas, São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 43: 329-333.
- BURDMANN, E.A., WORONIK, V., PRADO, E.B., ABDULKADER, R.C., SALDANHA, L.B., BARRETO, O.C., MARCONDES, M. (1993). Snakebite-induced acute renal failure: an experimental model. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 48: 82-88.
- CAMPBELL, J.A., LAMAR, W.W. (2004). **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Ithaca, Comstock, Publishing Associates/Cornell University Press.
- CARDOSO, J.L., FAN, H.W., FRANÇA, F.O., JORGE, M.T., LEITE, R.P., NISHIOKA, S.A., AVILA, S., SANO-MARTINS, I.S., TOMY, S.C., SANTORO, M.L., CHUDZINSKI, A.M., CASTRO, S.C.B., KAMIGUTI, A.S., KELEN, E.M.A., HIRATA, M.H., MIRANDOLA, R.M.S., THEAKSTON, R.D.G., WARRELL, D.A. (1993). Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **Q. J. Med.** 86: 315-325.
- CASTEL, S., PAGAN, R., GARCÍA, R., CASAROLI-MARANO, R.P., REINA, M., MITJANS, F., PIULATS, J., VILARÓ, S. (2000). Alpha v integrin antagonists induce the disassembly of focal contacts in melanoma cells. **Eur. J. Cell. Biol.** 79: 502-512.
- CASTRO, H.C., DUTRA, D.L.S., OLIVEIRA-CARVALHO, A.L., ZINGALI, R.B. (1998). Bothroaltein, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon** 36: 1903-1912.
- CASTRO, I., BURDMANN, E.A., SEGURO, A.C., YU, L. (2004). *Bothrops* venom induces direct renal tubular injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. **Toxicon** 43: 833-839.
- CATCHESIDE, D.G., HOLMES, B. (1947). The action of enzymes on chromosomes. **Symp. Soc. Exp. Biol.** 1: 225-231.
- CHAVES, F., TEIXEIRA, C.F.P., GUTIÉRREZ, J.M. (2006). Role of nitric oxide in the local and systemic pathophysiological effects induced by *Bothrops asper* snake venom in mice. **Inflam. Res.** 55: 245-253.
- CHENG, Y.C., HSUEH, C.C., LU, S.C., LIAO, T.H. (2006). Identification of three crucial histidine residues (His115, His132 and His297) in porcine deoxyribonuclease II. **Biochem. J.** 398: 177-185.
- CHIEN, C.M., YANG, S.H., YANG, C.C., CHANG, L.S., LIN, S.R. (2008). Cardiotoxin III induces c-jun N-terminal kinase-dependent apoptosis in HL-60 human leukaemia cells. **Cell Biochem. Funct.** 26: 111-118.
- CHIPPAUX, J.P., WILLIAMS, V., WHITE, J. (1991). Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon** 29: 1279-303.
- CHOU, S.F., CHEN, H.L., LU, S.C. (2002). Up-regulation of human deoxyribonuclease II gene expression during myelomonocytic differentiation of HL-60 and THP-1 cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 296: 48-53.
- CLISSA, P.B., LAING, G.D., THEAKSTON, R.D.G., MOTA, I., TAYLOR, M.J., MOURA-DA-SILVA, A.M. (2001). The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon** 39: 1567-1573.
- COELHO, A.L., DE FREITAS, M.S., OLIVEIRA-CARVALHO, A.L., MOURA-NETO, V., ZINGALI, R.B., BARJA-FIDALGO, C. (1999). Effects of jarastatin, a novel snake venom disintegrin, on neutrophil migration and actin cytoskeleton dynamics. **Exp. Cell. Res.** 251: 379-387.
- COHEN, G.M. (1998). Caspases: the executioner of apoptosis. **Biochem. J.** 326: 1-16.

- COLLARES-BUZATO, C., LE SEUR, L.P., CRUZ-HÖLFING, M.A. (2002). Impairment of cell-to-matrix adhesion and cytotoxicity induced by *Bothrops moojeni* snake venom in cultured renal tubular epithelia. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 181: 124-132.
- COLLARES-BUZATO, C.B., JEPSON, M.A., McEWAN, G.T.A., SIMMONS, N.L., HIRST, B.H. (1994). Junctional uvomorulin/E-cadherin and phosphotyrosine-modified protein content are correlated with paracellular permeability in Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelia. **Histochemistry** 101: 185-194.
- COLLARES-BUZATO, C.B., JEPSON, M.A., SIMMONS, N.L., HIRST, B.H. (1998). Increased tyrosine phosphorylation causes redistribution of adherens junction and tight junction proteins and perturbs paracellular barrier function in MDCK epithelia. **Eur. J. Cell Biol.** 76: 85-92.
- COLLINS, M.K.L., FURLONG, I.J., MALDE, P., ASCASO, R., OLIVER, J. (1996). An apoptotic endonuclease activated either by decreasing pH or by increasing calcium. **J. Cell Sci.** 109: 2393-2399.
- COMINETTI, M.R., RIBEIRO, J.U., FOX, J.W., SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. (2003). BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the *Bothrops alternatus* snake venom that interacts with $\alpha_5\beta_1$ integrin. **Arch. Biochem. Biophys.** 416: 171-179.
- COMINETTI, M.R., TERRUGGI, C.H.B., RAMOS, O.H.P., FOX, J.W., MARIANO-OLIVEIRA, A., DE FREITAS, M.S., FIGUEIREDO, C.C., MORANDI, V., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. (2004). Alternagin-c, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. **J. Biol. Chem.** 279: 18247-18255.
- CORY, S., ADAMS, J.M. (2002). The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Rev. Cancer** 2: 647-656.
- COSTA, E.P., SANTOS, M.F. (2004). Jararhagin, a snake venom metalloproteinase-disintegrin, stimulates epithelial cell migration in an in vitro restitution model. **Toxicon** 44: 861-870.
- COUNIS, M.F., TORRIGLIA, A. (2000). DNases and apoptosis. **Biochem. Cell Biol.** 78: 405-414.
- COUNIS, M.F., TORRIGLIA, A. (2006). Acid DNases and their interest among apoptotic endonucleases. **Biochimie** 88: 1851-1858.
- CRUZ-HÖFLING, M.A., PARONETTO, C.C., COGO, J.C., RODRIGUES-SIMIONI, L., D'ABREU, A.C. (2001). Histopathological changes in avian kidney caused by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) venom and a phospholipase A₂-containing fraction. **Histol. Histopathol.** 16: 185-195.
- CUNNINGHAM, L., LASKOWSKI, M. (1953). Presence of two different desoxyribonucleodepolymerases in veal kidney. **Biochim. Biophys. Acta** 11: 590-591.
- CYBULSKY, M.I., CHAN, M.K.W., MOVAT, H.Z. (1988). Acute inflammation and microthrombosis induced by endotoxin, interleukin-1, tumor necrosis factor and the implications in Gram-negative infection. **Lab. Invest.** 58: 365-371.
- CYMERMAN, I.A., MEISS, G., BUJNICKI, J.M. (2005). DNase II is a member of the phospholipase D superfamily. **Bioinformatics.** 2005 21:3959-62
- DAMICO, D.C., NASCIMENTO, J.M., LOMONTE, B., PONCE-SOTO, L.A., JOAZEIRO, P.P., NOVELLO, J.C., MARANGONI, S., COLLARES-BUZATO, C.B. (2007). Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A(2) (LmTX-I) in cultured cells. **Toxicon** 49: 678-92.
- DAVIES, K.J. (1999). The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. **IUBMB Life** 48: 41-47.

- DE ROODT, A.R., LITWIN, S., ANGEL, S.O. (2003). Hydrolysis of DNA by 17 snake venoms. **Comp. Biochem. Physiol. C** 135: 469-479.
- DELEZENNE, C., MOREL, H. (1919). Action catalytique des venins de serpents sur les acides nucléiques. **Compt. Hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris** 168: 244-246.
- DOMINGOS, M.O., TAKEHARA, H.A., LAING, G., SNOWDEN, K.F., SELLS, P.G., MOTA, I., THEAKSTON, R.D.G. (1994). Detection and neutralization of *B. jararaca* venom in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 27: 2613-2622.
- DU, X.Y., CLEMETSON, K.J. (2002). Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon** 40: 659-665.
- DULANEY, J.T., TOUSTER, O. (1972). Isolation of deoxyribonuclease II of rat liver lysosomes. **J. Biol. Chem.** 247: 1424-1432.
- DUMÉRIL, A.M.C., BIBRON, G., DUMÉRIL, A.H.A. (1854). **Erpétologie générale ou histoire naturelle complète des reptiles**. Paris, Librairie Encyclopédique de Roret, pp. 1512.
- EASTMAN, A., BARRY, M.A., DEMARCO, C., LI, J., REYNOLDS J.E. (1994). Endonucleases associated with apoptosis. In: **Apoptosis**, MIHICH, E., SCHIMKE, R.T. (Ed.). New York, Plenum, pp. 249-259.
- ELLIOTT, W.B. (1978). Chemistry and immunology of reptilian venoms. In: GANS, C. GANS K.A. (Ed.). **Biology of the Reptilia**. New York, Academic Press, pp. 163-436.
- ENARI, M., SAKAHIRA, H., YOKOYAMA, H., OKAWA, K., IWAMATSU, A., NAGATA, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature** 391: 43-50.
- EVANS, C.J., AGUILERA, R.J. (2003). DNase II: genes, enzymes and function. **Gene** 322: 1-15.
- FAMULSKI, K.S., MACDONALD, D., PATERSON, M.C., SIKORA, E. (1999). Activation of a low pH-dependent nuclease by apoptotic agents. **Cell Death Differ.** 6: 281-289.
- FAN, H.W., CARDOSO, J.L.C. (1995). Clinical toxicology of snake bites in South America. In: **Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**. MEIER, J., WHITE, J., (Ed.), Boca Raton, CRC Press. pp. 667-688.
- FERNLEY, H.N. (1971). Alkaline phosphatases. In: BOYER, P.D. (Ed.). **The Enzymes**. New York, Academic Press, v. 4, pp. 55-71.
- FLORES, C.A., ZAPPELLINI, A., PRADO-FRANCESCHI, J. (1993). Lipoxygenase-derived mediators may be involved in *in vivo* neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon** 31: 1551-1559.
- FOMBONNE, J., PADRON, L., ENJALBERT, A., KRANTIC, S., TORRIGLIA, A. (2006). A novel paraptosis pathway involving LEI/L-DNaseII for EGF-induced cell death in somato-lactotrope pituitary cells. **Apoptosis**. 11: 367-75.
- FRANÇA, F.O., BÁRBARO, K.C., FAN, H.W., CARDOSO, J.L., SANO-MARTINS, I.S., TOMY, S.C., LOPES, M.H., WARRELL, D.A., THEAKSTON, R.D., BUTANTAN INSTITUTE ANTIVENOM STUDY GROUP (2003) Envenoming by *Bothrops jararaca* in Brazil: association between venom antigenaemia and severity at admission to hospital. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 97: 312-317.
- FRANÇA, F.O.S., MÁLAQUE, C.M.S. (2003). Acidente botrópico. In: CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., WEN, F.H., MÁLAQUE, C.M.S., HADDAD, Jr V. (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo, Sarvier/FAPESP, pp. 72-86.
- FRIEDHOFF, P., KOLMES, B., GIMADUTDINOW, O., WENDE, W., KRAUSE, K.L., PINGOUD, A. (1996). Analysis of the mechanism of the *Serratia* nuclease using site-directed mutagenesis. **Nucleic Acids Res.** 24: 2632-2639.

- FRISCH, S.M., FRANCIS, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. **J. Cell Biol.** 124: 619-626.
- FRY, B.G., VIDAL, N., NORMAN, J.A., VONK, F.J., SCHEIB, H., RAMJAN, S.F., KURUPPU, S., FUNG, K., HEDGES, S.B., RICHARDSON, M.K., HODGSON, W.C., IGNJATOVIC, V., SUMMERHAYES, R., KOCHVA, E. (2006). Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature** 439: 584-588..
- FURTADO, M.F.D., MARUYAMA, M., KAMIGUTI, A.S., ANTONIO, L.C. (1991). Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon** 29: 219-226.
- GAIDO, M.L., CIDLOWSKI, J.A. (1991). Identification, purification and characterization of a calcium-dependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocytes. NUC18 is not histone H2B. **J. Biol. Chem.** 266: 18580-18585.
- GALLAGHER, P.J., BAO, Y., SERRANO, S.M.T., KAMIGUTI, A.S., THEAKSTON, R.D.G., FOX, J.W. (2003). Use of microarrays for investigating the subtoxic effects of snake venoms: insights into venom-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. **Toxicon** 41: 429-440.
- GALLAGHER, P.J., BAO, Y., SERRANO, S.M.T., LAING, G.D., THEAKSTON, R.D.G., GUTIÉRREZ, J.M., ESCALANTE, T., ZIGRINO, P., MOURA-DA-SILVA, A.M., NISCHT, R., MAUCH, C., MOSKALUK, C., FOX, J.W. (2005). Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: *in vitro* and *in vivo* gene expression analysis of the effects of the toxin. **Arch. Biochem. Biophys.** 441: 1-15.
- GARRIDO, C., GALLUZZI, L., BRUNET, M., PUIG, P.E., DIDELOT, C., KROEMER, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. **Cell Death Differ.** 13: 1423-1433.
- GAY, C.C., LEIVA, L.C., MARUNAK, S., TEIBLER, P., ACOSTA DE PEREZ, O. (2005). Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom **Toxicon** 46: 546-554.
- GEORGATSOS, J.G., LASKOWSKI, M. (1962). Purification of an endonuclease from the venom of *Bothrops atrox*. **Biochemistry** 1: 288-295.
- GORMAN, A.M., ZHIVOTOVSKY, B. (1999). Challenging the dogmas. **Cell Death Differ.** 6: 207-211.
- GOTTLIEB, R.A. (1996). Cell acidification in apoptosis. **Apoptosis** 1: 40-48.
- GOTTLIEB, R.A., GIESING, H.A., ENGLER, R.L., BABIOR, B.M. (1995). The acid deoxyribonuclease of neutrophils: a possible participant in apoptosis-associated genome destruction. **Blood** 86: 2414-2418.
- GREEN, D., KROEMER, G. (1998). The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? **Trends Cell Biol.** 8: 267-271
- GREEN, D., KROEMER, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science** 305: 626-269.
- GREEN, D.R. (2005). Apoptotic pathways: ten minutes to dead. **Cell** 121: 671-674.
- GULLAND, J.M., JACKSON, E.M. (1938). Phosphoesterases of bone and snake venoms. **Biochem. J.** 32: 590-596.
- GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. (1995). Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon** 33: 1405-1424.
- GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. (2003). Efectos locales en el envenenamiento ofídico em América Latina. In: **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., WEN, F.H., MALÁQUE, C.M.S., HADDAD Jr., V. (Ed.). São Paulo, Sarvier/FAPESP, pp. 310-323.

- GUTIÉRREZ, J.M., OWNBY, C.L. (2003). Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon** 42: 915-931.
- GUTIÉRREZ, J.M., RUCAVADO, A. (2000). Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie** 82: 841-850.
- GUTIÉRREZ, J.M., RUCAVADO, A., ESCALANTE, T., DÍAZ, C. (2005). Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon** 45: 997-1011.
- HAESSLER, H.A., CUNNINGHAM, L. (1957). A comparison of several deoxyribonucleases of type II. **Exp. Cell Res.** 13: 304-311.
- HALENBECK, R., MACDONALD, H., ROULSTON, A., CHEN T.T., CONROY, L., WILLIAMS, L.T. (1998). CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45. **Curr. Biol.** 8: 537-540.
- HALLICK, R.B., CHELM, B.K., GRAY, P.W., OROZCO, E.M. Jr. (1977). Use of aurintricarboxylic acid as an inhibitor of nucleases during nucleic acid isolation. **Nucleic Acids Res.** 4: 3055-3064.
- HAROSH, I., BINNINGER, D.M., HARRIS, P.V., MEZZINA, M., BOYD, J.B. (1991). Mechanism of action of deoxyribonuclease II from human lymphoblasts. **Eur. J. Biochem.** 202: 479-484.
- HARRIS, J.B. (2003). Myotoxic phospholipases A₂ and the regeneration of skeletal muscles. **Toxicon** 42: 933-945.
- HAVT, A., FONTELES, M.C., MONTEIRO, H.S.A. (2001). The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA₂ and PAF blockers. **Toxicon** 39: 1841-1846.
- HENGARTNER, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. **Nature** 407: 770-776.
- HEPPEL, L.A., HILMOE, R.J. (1951). Purification and properties of 5'-nucleotidase. **J. Biol. Chem.** 188: 665-676.
- HERKERT, M., SHAKHMAN, O., SCHWEINS, E., BECKER, C.M. (2001). β -Bungarotoxin is a potent inducer of apoptosis in cultured rat neurons by receptor-mediated internalization. **Eur. J. Neurosci.** 14: 821-828.
- HEWISH, D.R., BURGOYNE, L.A. (1973). The calcium-dependent endonuclease activity of isolated nuclear preparations. Relationships between its occurrence and the occurrence of other classes of enzymes found in nuclear preparations. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 52: 475-481.
- HUGHES, F.M., Jr., EVANS-STORMS, R.B., CIDLOWSKI, J.A. (1998). Evidence that non-caspase proteases are required for chromatin degradation during apoptosis. **Cell Death Differ.** 5: 1017-1027.
- HYNES, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell** 69: 11-25.
- HYNES, R.O. (1999). Cell adhesion: old and new questions. **Trends Cell Biol.** 9: M33-M37.
- IKEDA, S., TAKATA, N. (2002). Deoxyribonuclease II purified from *Euglena gracilis* SM-ZK, a chloroplast-lacking mutant: comparison with porcine spleen deoxyribonuclease II. **Comp. Biochem. Physiol. C** 131: 519-525.
- IWANAGA, S., SUZUKI, T. (1979). Enzymes in snake venom. In: LEE, C.Y. (Ed.). **Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin, Springer-Verlag, v. 52, pp. 61-158.
- JORGE, M.T., RIBEIRO, L.A. (1990). Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. **Rev. Ass. Med. Bras.** 36: 66-77.
- KAMIGUTI, A.S., CARDOSO, J.L., THEAKSTON, R.D., SANO-MARTINS, I.S., HUTTON, R.A., RUGMAN, F.P., WARRELL, D.A., HAY, C.R. (1991). Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. **Toxicon** 29: 961-972.

- KAMIGUTI, A.S., ZUZEL, M., THEAKSTON, R.D.G. (1998). Snake venom metalloproteinases and desintegrins: interactions with cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31: 853-862.
- KAUFMANN, S.H. (Ed.). (1997). **Apoptosis. Pharmacological Implications and Therapeutic Opportunities.** London, Academic Press.
- KAUFMANN, S.H., HENGARTNER, M.O. (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millenium. **Trends Cell Biol.** 11: 526-534.
- KAWANE, K., FUKUYAMA, H., KONDOH, G., TAKEDA, J., OHSAWA, Y., UCHIYAMA, Y., NAGATA, S. (2001). Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. **Science** 292: 1546-1547.
- KAWANE, K., FUKUYAMA, H., YOSHIDA, H., NAGASE, H., OHSAWA, Y., UCHIYAMA, Y., OKADA, K., LIDA, T., NAGATA, S. (2003). Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation. **Nat. Immunol.** 4: 138-144.
- KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer** 26: 239-257.
- KRIESER, R.J., EASTMAN, A. (1998). The cloning and expression of human deoxyribonuclease II. A possible role in apoptosis. **J. Biol. Chem.** 273: 30909-30914.
- KRIESER, R.J., EASTMAN, A. (2000). Deoxyribonuclease II: structure and chromosomal localization of the murine gene, and comparison with the genomic structure of the human and three *C. elegans* homologs. **Gene** 252: 155-162.
- KRIESER, R.J., MACLEA, K.S., PARK, J.P., EASTMAN, A. (2001). The cloning, genomic structure, localization and expression of human deoxyribonuclease II β . **Gene** 269: 205-216.
- KRUIDERING, M., EVAN, G.I. (2000). Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"? **IUBMB Life.** 50: 85-90.
- KUMAR, S. (2004). Measurement of caspase activity in cells undergoing apoptosis. In: BRADY, H.J.M. (Ed.). **Apoptosis Methods and Protocols, Meth. Mol. Biol.** Totowa, Humana Press, v. 282, pp. 19-30.
- KUNITZ, M. (1946). A spectrophotometric method for the measurement of ribonuclease activity. **J. Biol. Chem.** 563-568.
- KUNITZ, M. (1948). Isolation of crystalline desoxyribonuclease from beef pancreas. **Science.** 108: 19-20.
- KUNITZ, M. (1950). Crystalline desoxyribonuclease. I. Isolation and general properties. Spectrophotometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity. **J. Gen. Physiol.** 33: 349-362.
- KUO, H.R., LAPIDUS, A., LAMBERT, W.C. (1998). Identification of early apoptosis in Feulgen-stained cultured cells in situ by computerized image analysis. **Cytometry** 33: 420-427.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.
- LASKOWSKI Sr., M. (1980). Purification and properties of venom phosphodiesterase. **Meth. Enzymol.** 65: 276-284.
- LASKOWSKI, Sr., M. (1971). Venom exonuclease. In: BOYER, P.D. (Ed.). **The Enzymes.** New York, Academic Press, v. 4. pp. 313-328.
- LEBEDEVA, L.G., ALEXANDROVA, S.S., VOTRIN, I., BASNAKIAN, A.G. (1995). In vitro proteolysis of endonuclease in rat liver nuclei extracts. **Biochem. Mol. Biol. Int.** 35: 433-440.

- LESCA, P. (1975). Protein inhibitor of acid deoxyribonucleases: improved purification procedure and properties. **J. Biol. Chem.** 254: 116-123.
- LI, Z.Y., YU, T.F., LIAN, E.C. (1994). Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. **Toxicon** 32: 1349-1358.
- LIAO, T.H. (1985). The subunit structure and active site sequence of porcine spleen deoxyribonuclease. **J. Biol. Chem.** 260: 10708-10713.
- LIAO, T.H., LIAO, W.C., CHANG, H.C., LU, K.S. (1989). Deoxyribonuclease II purified from the isolated lysosomes of porcine spleen and from porcine liver homogenates. Comparison with deoxyribonuclease II purified from porcine spleen homogenates. **Biochim. Biophys. Acta** 1007: 15-22.
- LING, Y., ZHONG, Y., PEREZ-SOLER, R. (2001). Disruption of cell adhesion and caspase-mediated proteolysis of beta- and gamma-catenins and APC protein in paclitaxel-induced apoptosis. **Mol. Pharmacol.** 59: 593-603.
- LIU, Q.S., PANDEY, S., SINGH, R.K., LIN, W., RIBECCO, M., BOROWY-BOROWSKI, H., SMITH, B., LEBLANC, J., WALKER, P.R., SIKORSKA, M. (1998). DNase γ : a rat DNase I-like gene coding for a constitutively expressed chromatin-bound endonuclease. **Biochemistry** 37: 10134-10143.
- LO, C.M., KEESE, C.R., GIAEVER, I. (1999). Cell-substrate contact: another factor may influence transepithelial electrical resistance of cell layers cultured on permeable filters. **Exp. Cell Res.** 250: 576-580.
- LOBNER, D. (2000). Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? **J. Neurosci. Meth.** 96: 147-152.
- LOMONTE, B., ÂNGULO, Y., CALDERÓN, L. (2003) An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon** 42: 885-901.
- LOMONTE, B., ÂNGULO, Y., RUFINI, S., CHO, W., GIGLIO, J.R., OHNO, M., DANIELE, J.J., GEOGHEGAN, P., GUTIÉRREZ, J.M. (1999). Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A₂ on Mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. **Toxicon** 37: 145-158.
- LOMONTE, B., TARKOWSKI, A., HANSON, L.A. (1994). Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂ of *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon** 32: 1359-1369.
- MACKESSY, S.P. (1998). Phosphodiesterases, ribonucleases and deoxyribonucleases. In: BAILEY, G.S. (Ed.). **Enzymes from Snake Venom**. Fort Collins, Alaken Press Inc., pp. 361-404.
- MACLEA, K.L., CHENG, H.H. (2006). Cloning and expression of deoxyribonuclease II from chicken. **Gene** 373: 44-51.
- MACLEA, K.S., KRIESER, R.J., EASTMAN, A. (2002). Revised structure of the active form of human deoxyribonuclease II α . **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 292: 415-421.
- MACLEA, K.S., KRIESER, R.J., EASTMAN, A. (2003). A family history of deoxyribonuclease II from *Trichinella spiralis* and *Burkholderia pseudomallei*. **Gene** 305: 1-12.
- MARIANO-OLIVEIRA, A., COELHO, A.L., TERRUGGI, C.H., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S., BARJA-FIDALGO, C., DE FREITAS, M.S. (2003). Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. **Eur. J. Biochem.** 270: 4799-4808.
- MARUNAK, S.L., ACOSTA DE PEREZ, O., RUIZ DE TORRENT, R.M., TEIBLER, G.P., KOSCINCZUK, P., SANCHEZ NEGRETTE, M. (1999). Hemorrhagic, edema-forming, proteolytic and myonecrotic

- activities of viper venoms of *Bothrops alternatus* (Vibora de la Cruz). **Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.** 49: 149-154.
- MARUYAMA, J., HAYASHI, H., MIAO, J., SAWADA, H., ARAKI, S. (2005). Severe cell fragmentation in the endothelial cell apoptosis induced by snake apoptosis toxin VAP1 is an apoptotic characteristic controlled by caspases. **Toxicon** 46: 1-6.
- MASUDA, S., ARAKI, S., YAMAMOTO, T., KAJI, K., HAYASHI, H. (1997). Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 235: 59-63.
- MASUDA, S., HAYASHI, H., ARAKI, S. (1998). Two vascular apoptosis-inducing proteins from snake venom are members of the metalloprotease/desintegrin family. **Eur. J. Biochem.** 253: 36-41.
- MASUDA, S., HAYASHI, H., ATODA, H., MORITA, T., ARAKI, S. (2001a). Purification, cDNA cloning and characterization of the vascular apoptosis-inducing protein, HV1, from *Trimeresurus flavoviridis*. **Eur. J. Biochem.** 268: 3339-3345.
- MASUDA, S., OHTA, T., KAJI, K., FOX, J.W., HAYASHI, H., ARAKI, S. (2000). cDNA cloning and characterization of vascular apoptosis-inducing protein 1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 278: 197-204.
- MASUDA, S., SHIMIZU, A., MORI, T., ISHIWATA, T., KITAMURA, H., OHASHI, R., ISHIZAKI, M., ASANO, G., SUGISAKI, Y., YAMANAKA, N. (2001b). Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. **Am. J. Pathol.** 159: 599-608.
- MATASSOV, D., KAGAN, T., LEBLANC, J., SIKORSKA, M., ZAKERI, Z. (2004). Measurement of apoptosis by DNA fragmentation. In: BRADY, H.J.M. (Ed.). **Apoptosis Methods and Protocols, Meth. Mol. Biol.**, Totowa, Humana Press, v. 282, pp. 1-17.
- MCILROY, D., TANAKA, M., SAKAHIRA, H., FUKUYAMA, H., SUZUKI, M., YAMAMURA, K., OHSAWA, Y., UCHIYAMA, Y., NAGATA, S. (2000). An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. **Genes Dev.** 14: 549-558.
- MEBS, D. (1970). A comparative study of enzyme activities in snake venoms. **Int J Biochem** 1:335-342.
- MEBS, D. (1978). Pharmacology of reptilian venoms. In: Gans C, Gans KA (eds) **Biology of the Reptilia. Physiology.** Vol. 8B. Academic Press, London, pp. 437-560.
- MEISS, G., SCHOLZ, S.T., KORN, C., GIMADUTDINOW, O., PINGOUD, A. (2001). Identification of functionally relevant histidine residues in the apoptotic nuclease CAD. **Nucleic Acids Res.** 29: 3901-3909.
- MELGAREJO, A.R. (2003). Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., WEN, F.H., MALAQUE, C.M.S., HADDAD, Jr V. (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes.** São Paulo, Sarvier/FAPESP, pp. 33-61.
- MELO, P.S., DE MEDEIROS CAVALCANTE, H.M., BARBOSA-FILHO, J.M., DINIZ, M.F.F.M., DE MEDEIROS, I.A., HAUN, M. (2003). Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicol Lett.** 142: 143-151.
- MELO, P.S., MARIA, S.S., VIDAL, B.C., HAUN, M., DURÁN, N. (2000). Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.** 36: 539-543.
- MEREDITH, J., FAZELI, B., SCHWARTZ, M. (1993). The extracellular matrix as a survival factor. **Mol. Biol. Cell** 4: 953-961.

- MIAO, J.Y., ARAKI, S., HAN, Y.R., HAYASHI, H. (1999). Involvement of gene expressions in apoptosis of vascular endothelial cells induced by rattlesnake venom. **Cell. Res.** 9: 237-242.
- MIYABARA, E.H., TOSTES, R.C., SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S., AOKI, M.S., MORISCOT, A.S. (2004). Role of nitric oxide in myotoxic activity induced by crotoxin in vivo. **Toxicon** 43: 425-432.
- MIYAMOTO, M., VIDAL, B.C., MELLO, M.L. (2005). Chromatin supraorganization, DNA fragmentation, and cell death in snake erythrocytes. **Biochem. Cell Biol.** 83: 15-27.
- MORA, R., VALVERDE, B., DIAZ, C., LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J.M. (2005). A Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. **Toxicon** 45: 651-660.
- MORENO, E., GUTIÉRREZ, J.M. (1988). Body distribution of *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom myotoxin and its relationship to pathological changes. **Toxicon** 26: 403-409.
- MOURA-DA-SILVA, A.M., BUTERA, D., TANJONI, I. (2007). Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Curr Pharm Des.** 13: 2893-2905.
- MOURA-DA-SILVA, A.M., CARDOSO, D.F., TANIZAKI, M.M. (1990a). Differences in the distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. **Toxicon** 28: 1293-1301.
- MOURA-DA-SILVA, A.M., D'IMPERIO LIMA M.R., NISHIKAWA, A.K., BRODSKIN, C.I., DOS SANTOS, M.C., FURTADO, M.F., DIAS DA SILVA, W., MOTA, I. (1990b). Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops*. **Toxicon** 28: 181-188.
- MOURA-DA-SILVA, A.M., DESMOND, H., LAING, G., THEAKSTON, R.D. (1991). Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon** 29:713-723.
- MOURA-DA-SILVA, A.M., LAING, G.D., PAINE, M.J.I., DENNISON, J.M.T.J., POLITI, V., CRAMPTON, J.M., THEAKSTON, R.D.G. (1996). Processing of pro-tumor necrosis factor- α by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **Eur. J. Immunol.** 26: 2000-2005.
- NAGAI, N., TAKEUCHI, N., KAMEI, A., ITO, Y. (2006). Involvement of DNase II-like acid DNase in the cataract formation of the UPL rat and the Shumiya cataract rat. **Biol. Pharm. Bull.** 29: 2367-2371.
- NAGATA, S., NAGASE, H., KAWANE, K., MUKAE, N., FUKUYAMA, H. (2003) Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. **Cell Death Differ.** 10: 108-116.
- NAKAHARA, M., NAGASAKA, A., KOIKE, M., UCHIDA, K., KAWANE, K., UCHIYAMA, Y., NAGATA, S. (2007). Degradation of nuclear DNA by DNase II-like acid DNase in cortical fiber cells of mouse eye lens. **FEBS J.** 274: 3055-3064.
- NASCIMENTO, J.M., FRANCHI, G.C., NOWILL, A.E., COLLARES-BUZATO, C.B., HYSLOP, S. (2007). Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by *Bothrops alternatus* snake venom in cultured Madin-Darby canine kidney cells. **Biochem. Cell Biol.** 85: 591-605.
- NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S., VON HEIJNE, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **Protein Eng.** 10: 1-6.
- NISENBOM, H.E., PERAZZO, J.C., MONSERRAT, A.J., VIDAL, J.C. (1986b). Contribution of phospholipase A₂ to the lethal potency of *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. **Toxicon** 24: 807-817.

- NISENBOM, H.E., PERAZZO, J.C., MONSERRAT, A.J., VIDAL, J.C. (1988). Effect of chemical modification with *p*-bromophenacyl bromide on the enzymatic and lethal properties of phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. **Toxicon** 26: 1137-1144.
- NISENBOM, H.E., SEKI, C., VIDAL, J.C. (1986a). Phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. **Toxicon** 24: 259-272.
- OLIVEIRA, J.C.R., MONTES DE OCA, H., DUARTE, M.M., DINIZ, C.R., FORTES-DIAS, C.L. (2002). Toxicity of South American snake venoms measured by an in vitro cell culture assay. **Toxicon** 40: 321-325.
- OSHIMA, R.G., PRICE, P.A. (1973). Alkylation of an essential histidine residue in porcine spleen deoxyribonuclease. **J. Biol. Chem.** 248: 7522-7526.
- OTA, E., NAGASHIMA, Y., SAKURAI, T., KOJIMA, C., WAALKES, M.P., HIMENO, S. (2006). Caspase-independent apoptosis induced in rat liver cells by plancitoxin I, the major lethal factor from the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* venom. **Toxicon** 48: 1022-1010.
- OTANI, H., ERDOS, M., LEONARD, W.J. (1993). Tyrosine kinase(s) regulate apoptosis and bcl-2 expression in a growth factor-dependent cell line. **J. Biol. Chem.** 268: 22733-22736.
- OVERBO, K., MYRNES, B. (2006). Deoxyribonuclease II from the Icelandic scallop (*Chlamys islandica*): isolation and partial characterization. **Comp. Biochem. Physiol. B** 143: 315-318.
- PADRON-BARTHE, L., LEPRÊTRE, C., MARTIN, E., COUNIS, M.F., TORRIGLIA, A. (2007). Conformational modification of serpins transforms leukocyte elastase inhibitor into an endonuclease involved in apoptosis. **Mol. Cell. Biol.** 27: 4028-4036.
- PANDEY, S., WALKER, P.R., SIKORSKA, M. (1997). Identification of a novel 97 kDa endonuclease capable of internucleosomal DNA cleavage. **Biochemistry** 36: 711-720.
- PARDAL, P.P.O., SOUZA, S.M., MONTEIRO, M.R.C.C., FAN, H.W., CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., TOMY, S.C., SANO-MARTINS, I.S., SOUSA-E-SILVA, M.C.C., COLOMBINI, M., KODERA, N.F., MOURA-DA-SILVA, A.M., CARDOSO, D.F., VELARDE, D.T., KAMIGUTI, A.S., THEAKSTON, R.D.G., WARRELL, D.A. (2004). Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north eastern Amazon region of Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 98: 28-42.
- PEITSCH, M.C., POLZAR, B., STEPHAN, H., CROMPTON, T., MACDONALD, H.R., MANNHERZ, H.G., TSCHOPP, J. (1993). Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programed cell death). **EMBO J.** 1: 371-377.
- PERICLE, F., LIU, J.H., DIAZ, J.I., BLANCHARD, D.K., WEI, S., FORNI, G., DJEU, J.Y. (1994). Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. **Eur. J. Immunol.** 24: 440-444.
- PETERSON, M.W., GRUENHAUPT, D. (1990). Protamine increases the permeability of cultured epithelial monolayers. **J. Appl. Physiol.** 38: 220-227.
- PONCE-SOTO, L.A., LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J.M., RODRIGUES-SIMIONI, L., NOVELLO, J.C., MARANGONI, S. (2007). Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. **Biochim. Biophys. Acta.** 1770: 585-93.
- PRITCHARD, A.E., KOWALSKI, D., LASKOWSKI Sr., M. (1977). An endonuclease activity of venom phosphodiesterase specific for single-stranded and superhelical DNA. **J. Biol. Chem.** 252: 8652-8659.
- PRIVAT DE GARILHE, M. LASKOWSKI, Sr. M. (1955). Study of the enzymatic degradation of deoxyribonucleic acid by two different deoxyribonucleodepolymerases. **J. Biol. Chem.** 215: 269-276.

- RAMOS, O.H., KAUSKOT, A., COMINETTI, M.R., BECHYNE, I., SALLA PONTES, C.L., CHAREYRE, F., MANENT, J., VASSY, R., GIOVANNINI, M., LEGRAND, C., SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S., CRÉPIN, M., BONNEFOY, A. (2008). A novel alpha(v)beta (3)-blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. **Clin. Exp. Metastasis**. 25: 53-64.
- REZENDE, N.A., AMARAL, C.F., BAMBIRRA, E.A., LACHATT, J.J., COIMBRA, T.M. (1989). Functional and histopathological renal changes in rats by *Bothrops jararaca* venom. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 22: 407-416.
- RIBEIRO, J.M., CARSON, D.A. (1993). Ca²⁺/Mg²⁺-dependent endonuclease from human spleen: purification, properties, and role in apoptosis. **Biochemistry** 32: 9129-9136.
- RIBEIRO, L.A., ALBUQUERQUE, M.K., PIRES DE CAMPOS, V.A.F., KATZ, G., TAKAOKA, N.Y., LEBRÃO, M.L., JORGE, M.T. (1998). Deaths caused by venomous snakes in the State of São Paulo: evaluation of 43 cases from 1988 to 1993. **Rev. Ass. Méd. Bras.** 44: 311-318.
- RIBEIRO, L.A., JORGE, M.T. (1997). Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3139 casos. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.** 30: 475-480.
- RICH, T., ALLEN, R.L., WYLLIE, A.H. (2000). Defying death after DNA damage. **Nature** 407: 777-783.
- RICHARDS, G.M., du VAIR, G., LASKOWSKI Sr., M. (1965). Comparision of the levels of phosphodiesterase, endonuclease, and monophosphatases in several snake venoms. **Biochemistry** 4: 501-503.
- ROSENFELD, G. (1971). Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: **Venomous animals and their venoms**. BÜCHERL, W., BUCKLEY, E.E. (Ed.). New York, Academic Press, v. 2, pp. 345-384.
- RUSSELL, F.E., WALTER, F.G., BEY, T.A., FERNANDEZ, M.C. (1997). Snakes and snakebite in Central America. **Toxicon** 35:1469-1522.
- SALES, P.B.V., SANTORO, M. (2007). Nucleotidase and DNase activities in Brazilian snake venoms. **Comp. Bioch. Physiol. C** 147: 85-95.
- SALVESEN, G.S., DIXIT, V.M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96: 10964-10967.
- SAMEJIMA, K., EARNSHAW, W.C. (2005). Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis, **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 6: 677-688.
- SARASTE, A., PULKKI, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc. Res.** 45: 528-537.
- SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S., COMINETTI, M.R., TERRUGGI, C.H.B., MARIANO-OLIVEIRA, A., DE FREITAS, M.S., CREPIN, M., FIGUEIREDO, C.C., MORANDI, V. (2005). Alternagin-C, a disintegrin-like protein from the venom of *Bothrops alternatus*, modulates $\alpha_2\beta_1$ integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 38: 1505-1511.
- SEONG, C.S., VARELA-RAMIREZ, A., AGUILERA, R.J. (2006). DNase II deficiency impairs innate immune function in *Drosophila*. **Cell Immunol.** 240: 5-13.
- SERRA, H., MONTEIRO, A., FONTELES, M.C. (1999). The effect of *Bothrops jararaca* venom on rat kidney after short-term exposure: preliminary results. **Pharmacol. Toxicol.** 85: 198-200.
- SHACK, J. (1959) The influence of sodium and magnesium ions on the action of deoxyribonuclease II. **J. Biol. Chem.** 234: 3003-3006.

- SHIOKAWA, D., IWAMATSU, A., TANUMA, S. (1997b). Purification, characterization; and amino acid sequencing of DNase from rat spleen. **Arch. Biochem. Biophys.** 346: 15-20.
- SHIOKAWA, D., OHYAMA, H., YAMADA, T., TAKAHASHI, K., TANUMA, S. (1994). Identification of an endonuclease responsible for apoptosis in rat thymocytes. **Eur. J. Biochem.** 226: 23-30.
- SHIOKAWA, D., OHYAMA, H., YAMADA, T., TANUMA S. (1997a). Purification and properties of DNase from apoptotic rat thymocytes. **Biochem. J.** 326: 675-681.
- SHIOMI, K., MIDORIKAWA, S., ISHIDA, M., NAGASHIMA, Y., NAGAI, H. (2004). Plancitoxins, lethal factors from the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci*, are deoxyribonucleases II. **Toxicon** 44: 499-506.
- SINSHEIMER, L., KOERNER, J.F. (1952). A purification of venom phosphodiesterase. **J. Biol. Chem.** 198: 293-296.
- SITTENFELD, A., RAVENTÓS, H., CRUZ, R., GUTIÉRREZ, J.M. (1991). DNase activity in Costa Rican crotaline snake venoms: quantification of activity and identification of electrophoretic variants. **Toxicon** 29: 1213-1224.
- SMOLKA, M.B., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B., NOVELLO, J.C. (1998). Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon** 36: 1059-1063.
- SOUZA, D.H., EUGENIO, L.M., FLETCHER, J.E., JIANG, M.S., GARRAT, R.C., OLIVA, G., SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. (1999). Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data. **Arch. Biochem. Biophys.** 368: 285-290.
- SOUZA, D.H.F., IEMMA, M.R.C., FERREIRA, L.L., FARIA, J.P., OLIVA, M.L.V., ZINGALI, R.B., NIEWIAROWSKI, S., SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. (2000). The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits $\alpha\beta 1$ integrin-mediated cell adhesion. **Arch. Biochem. Biophys.** 384: 341-350.
- STABELI, R.G., MARCUSSI, S., CARLOS, G.B., PEITRO, R.C., SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S., GIGLIO, J.R., OLIVEIRA, E.B., SOARES, A.M. (2004). Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.** 12: 2881-2886.
- STAIANO, N., GARBI, C., SQUILLACIOTI, C., ESPOSITO, S., DI MARTINO, E., BELISARIO, M.A., NITSCH, L., DI NATALE, P. (1997). Echistatin induces decrease of pp125^{FAK} phosphorylation disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions, and detachment of fibronectin-adherent melanoma cells. **Eur. J. Cell Biol.** 73: 298-305.
- STENNICKE, H.R., JÜRGENSMEIER, J.M., SHIN, H., DEVERAUX, Q., WOLF, B.B, YANG, X., ZHOU, Q., ELLERBY, M., ELERBY, L., BREDESEN, D., GREEN, D.R., REED, J.C., FROELICH, C.J., SALVESEN, G.S. (1999). Pro-caspase 3 is a major physiologic target of caspase-8. **J. Biol. Chem.** 273: 27084-27090.
- STRIZHKOV, B.N., BLISHENKO, E.Y., SATPAEV, D.K., KARELIN, A.A. (1994). Both neurotoxin II from venom of *Naja naja oxiana* and its endogenous analogue induce apoptosis in tumor cells. **FEBS Lett.** 340: 22-24.
- SUHARA, T., FUKUO, K., SUGIMOTO, T., MORIMOTO, S., NAKHASHI, T., HATA, S., SHIMIZU, M., OGIHARA, T. (1998). Hydrogen peroxide induces up-regulation of Fas in human endothelial cells. **J. Immunol.** 160: 4042-4047.

- SUHR, S.M., KIM, D.S. (1996). Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 224: 134-139.
- SULKOWSKI, E., BJÖRK, W., LASKOWSKI Sr., M. (1963). A specific and nonspecific alkaline monophosphatase in the venom of *Bothrops atrox* and their occurrence in the purified venom phosphodiesterase. **J. Biol. Chem.** 238: 2477-2486.
- SUZUKI, K., NAKAMURA, M., HATANAKA, Y., KAYANOKI, Y., TATSUMI, H., TANIGUCHI, N. (1997). Induction of apoptotic cell death in human endothelial cells treated with snake venom: implication of intracellular reactive oxygen species and protective effects of glutathione and superoxide dismutase. **J. Biochem.** 122: 1260-1264.
- SUZUKI, T., IWANAGA, S. (1958a). Studies on snake venoms III. Purification of some enzymes in Japanese mamushi venom (*Agkistrodon halys blomhoffii*, Boie). **J. Pharm. Soc. Jap.** 78: 362-367.
- SUZUKI, T., IWANAGA, S. (1958b). Studies on snake venoms IV. Purification of alkaline phosphatases in snake venoms. **J. Pharm. Soc. Jap.** 78: 368-375.
- TABORDA, A.R., TABORDA, L.C., WILLIAMS Jr., J.N., ELVEHJEM, C.A. (1952). A study of the ribonuclease activity of snake venoms. **J. Biol. Chem.** 194: 227-233.
- TAKESHITA, H., YASUDA, T., IIDA, R., NAKAJIMA, T., HOSOMI, O., NAKASHIMA, Y., MORI, S., NOMOTO, H., KISHI, K. (1998). Identification of the three non-identical subunits constituting human deoxyribonuclease II. **FEBS Lett.** 440: 239-242.
- TAN, N.H., PONNUDURAI, G. (1991). A comparative study of the biological properties of some venoms of snakes of the genus *Bothrops* (American lance-headed vipers). **Comp. Biochem. Physiol. B** 100: 361-365.
- TAN, N.H., PONNUDURAI, G. (1992). A comparative study of the biological properties of venoms of some old world vipers (subfamily viperinae). **Int. J. Biochem.** 24: 331-336.
- TAN, N.H., PONNUDURAI, G. (1994). An investigation on the antigenic cross-reactivity of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom hemorrhagin, thrombin-like enzyme and L-amino acid oxidase using enzyme-linked immunosorbent assay. **Toxicon** 32: 1265-1269.
- TANIGAWA, M., MARUYAMA, M., SUGIKI, M., SHIMAYA, K., ANAI, K., MIHARA, H. (1994). Clearance and distribution of a haemorrhagic factor purified from *Bothrops jararaca* venom in mice. **Toxicon** 32: 583-593.
- TANJONI, I., WEINLICH, R., DELLA-CASA, M.S., CLISSA, P.B., SALDANHA-GAMA, R.F., DE FREITAS, M.S., BARJA-FIDALGO, C., AMARANTE-MENDES, G.P., MOURA-DA-SILVA, A.M. (2005). Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. **Apoptosis** 10: 851-861.
- THEAKSTON, R.D.G., FAN, H.W., WARRELL, D.A., DIAS DA SILVA, W.D., WARD, S.A., HIGASHI, H.G., AND THE BUTANTAN INSTITUTE ANTIVENOM STUDY GROUP (BIASG) (1992). Use of enzyme immunoassays to compare the effect and assess the dosage regimens of three Brazilian *Bothrops* antivenoms. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 47: 593-604.
- TORII, S., NAITO, M., TSURUO, T. (1997). Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from western diamondback rattlesnake venom. **J. Biol. Chem.** 272: 9539-9542.
- TORRIGLIA, A., CHAUDUN, E., CHANYO-FOURNIER, F., JEANNY, J.C., COURTOIS, Y., COUNIS, M.F. (1995) Involvement of DNase II in nuclear degeneration during lens cell differentiation. **J. Biol. Chem.** 270: 28579-28585.

- TORRIGLIA, A., PERANI, P., BROSSAS, J.Y., CHAUDUN, E., TRETON, J., COURTOIS, Y., COUNIS, M.F. (1998). L-DNase, a molecule that links proteases and endonucleases in apoptosis, derives from the ubiquitous serpin leukocyte elastase inhibitor. **Mol. Cell. Biol.** 18: 3612-3619.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76: 4350-4354.
- TSAI, C.H., YANG, S.H., CHIEN, C.M., LU, M.C., LO, C.S., LIN, Y.H., HU, X.W., LIN, S.R. (2006). Mechanisms of cardiotoxin III-induced apoptosis in human colorectal cancer colo205 cells. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 33: 177-82.
- TU, A.T., CHUA, A. (1966). Acid and alkaline phosphomonoesterase activities in snake venoms. **Comp. Biochem. Physiol.** 17: 297-307.
- TU, A.T. (Ed.). (1977). **Venoms: Chemistry and Molecular Biology**. New York, Marcel Dekker.
- UCKER, D.S., OBERMILLER, P.S., ECKHART, W., APGAR, J.R., BERGER, N.A., MEYERS, J. (1992). Genome digestion is a dispensable consequence of physiological cell death mediated cytotoxic T lymphocytes. **Mol. Cell Biol.** 12: 3060-3069.
- URBANO, A., MACCAFFREY, R., FOSS, F. (1998). Isolation and characterization of NUC70, a cytoplasmic hematopoietic apoptotic endonuclease. **J. Biol. Chem.** 273: 34820-34827.
- UZAWA, S. (1932). Über die Phosphomonoesterase und die Phosphodiesterase. **J. Biochem. (Tokyo)** 15: 19-28.
- VALENTICH, J.D. (1981). Morphological similarities between the dog kidney cell line MDCK and the mammalian cortical collecting tubule. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 372: 384-405.
- VALÉRIO, A.A., CORRADINI, A.C., PANUNTO, P.C., MELLO, S.M., HYSLOP, S. (2002). Purification and characterization of a phosphodiesterase from *Bothrops alternatus* snake venom. **J. Prot. Chem.** 21: 495-503.
- VASCONCELOS, C.M.L., VALENÇA, R.C., ARAÚJO, E.A., MODESTO, J.C.A., PONTES, M.M., BRAZIL, T.K., GUARNIERI, M.C. (1998). Distribution of ¹³¹I-labeled *Bothrops erythromelas* venom in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31: 439-443.
- VORONOV, E., APTE, R.N., SOFER, S. (1999). The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. **J. Venom. Anim. Toxins** 5: 5-33.
- WALKER, P.R., SIKORSKA, M. (1997). New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis. **Biochem. Cell Biol.** 75: 287-299.
- WAN, S.G., JIN, Y., LEE, W.H., ZHANG, Y. (2006). A snake venom metalloproteinase that inhibited cell proliferation and induced morphological changes of ECV304 cells. **Toxicon** 47: 480-489.
- WANG, C.C., LU, S.C., CHEN, H.L., LIAO, T.H. (1998). Porcine spleen deoxyribonuclease II. Covalent structure, cDNA sequence, molecular cloning, and gene expression. **J. Biol. Chem.** 273: 17192-17198.
- WANG, W.W., JI, Y.H. (2005). Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vitro and inhibits glioma tumor growth in vivo. **J. Neuro-Oncol.** 73: 1-7.
- WANG, Z.B., LIU, Y.Q., CUI, Y.F. (2005). Pathways to caspase activation. **Cell Biol. Int.** 29: 489-96.
- WATT, G. (1989). Snakebite treatment and first aid. In: CAMPBELL, J.A., LAMAR, W.W. (Ed.). **The Venomous Reptiles of Latin America**. Ithaca, Comstock Publishing Associates/Cornell University Press, pp. 6-13.

- WEBB, S.J., HARRISON, D.J., WYLLIE, A.H. (1997). Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease. In: KAUFMANN, S.H. (Ed.). **Apoptosis. Pharmacological Implications and Therapeutic Opportunities**. London, Academic Press, pp. 1-34.
- WEIR, A.F. (1993). Deoxyribonuclease I (EC 3.1.21.1) and II (EC 3.1.22.1). In: BURRELL, M.M., (Ed.). **Methods in Molecular Biology**. Totowa, Human Press Inc., v. 16, pp. 7-15.
- WILLINGER, C.C., THAMAREE, S., SCHRAMEK, H., GSTRAUNTHALER, G., PFALLER, W. (1995). In vitro nephrotoxicity of Russell's viper venom. **Kidney Int.** 47: 518-528.
- WU, W.B., CHANG, S.C., LIAU, M.Y., HUANG, T.F. (2001) Purification, molecular cloning and mechanism of action of graminelysin I, a snake-venom-derived metalloproteinase that induces apoptosis of human endothelial cells. **Biochem. J.** 357: 719-728.
- WU, W.B., HUANG, T.F. (2003). Activation of MMP-2, cleavage of matrix proteins, and adherens junctions during a snake venom metalloproteinase-induced endothelial cell apoptosis. **Exp. Cell Res.** 288: 143-157.
- WU, W.B., PENG, H.P., HUANG, T.F. (2003). Disintegrin causes proteolysis of β -catenin and apoptosis of endothelial cells. Involvement of cell-cell and cell-ECM interactions in regulating cell viability. **Exp. Cell Res.** 286: 115-127.
- WYLLIE, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature** 284: 555-556.
- YAMANAKA, M., TSUBOTA, Y., ANAI, M., ISHIMATSU, K., OKUMURA, M., KATSUKI, S., TAKAGI, Y. (1974). Purification and properties of acid deoxyribonuclease of human gastric mucosa and cervix uteri. **J. Biol. Chem.** 249: 3884-3889.
- YAN, C.H., LIANG, Z.Q., GU, Z.L., YANG, Y.P., REID, P., WIN, Z.H. (2006). Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX-induced death of K562 cells. **Toxicol** 47: 521-530.
- YANG, S.H., CHIEN, C.M., CHANG, L.S., LIN, S.R. (2007). Involvement of c-jun N-terminal kinase in G2/M arrest and caspase-mediated apoptosis induced by cardiotoxin III (*Naja naja atra*) in K562 leukemia cells. **Toxicol** 49: 966-974.
- YANG, S.H., CHIEN, C.M., LU, M.C., LIN, Y.H., HU, X.W., LIN, S.R. (2006). Up-regulation of Bax and endonuclease G, and down-modulation of Bcl-XL involved in cardiotoxin III-induced apoptosis in K562 cells. **Exp. Mol. Med.** 38: 435-444.
- YANG, S.H., LU, M.C., CHIEN, C.M., TSAI, C.H., LU, Y.J., HOUR, T.C., LIN, S.R. (2005). Induction of apoptosis in human leukemia K562 cells by cardiotoxin III. **Life Sci.** 76: 2513-2522.
- YASUDA, T., NADANO, D., AWAZU, S., KISHI, K. (1992). Human urine deoxyribonuclease II (DNase II) isoenzymes: a novel immunoaffinity purification, biochemical multiplicity, genetic heterogeneity and broad distribution among tissues and body fluids. **Biochem. Biophys. Acta** 1119: 185-193.
- YASUDA, T., SAWAZAKI, K., NADANO, D., TAKESHITA, H., NAKANAGA, M., KISHI, K. (1993). Human seminal deoxyribonuclease I (DNase I) purification, enzymological and immunological characterization and origin. **Clin. Chim. Acta** 218: 5-16.
- YASUDA, T., TAKESHITA, H., IIDA, R., KOGURE, S., KISHI, K. (1999). Structural requirements of a human deoxyribonuclease II for the development of the active enzyme form, revealed by site-directed mutagenesis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 256: 591-594.
- YASUDA, T., TAKESHITA, H., NAKAZATO, E., NAKAJIMA, T., HOSOMI, O., NAKASHIMA, Y., KISHI, K. (1998). Activity measurement for deoxyribonucleases I and II picogram sensitivity based on DNA/SYBR Green I fluorescence. **Anal. Biochem.** 255: 274-276.

- YE, M., HU, Z., FAN, Y., HE, L., XIA, F., ZOU, G. (2004). Purification and characterization of an acid deoxyribonuclease from the cultured mycelia of *Cordiceps sinensis*. **J. Biochem. Mol. Biol.** 37: 466-473.
- YEH, C.H., PENG, H.C., HUANG, T.F. (1998). Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo by acting as integrin $\alpha_3\beta_1$ antagonist and inducing apoptosis. **Blood** 92: 3268-3276.
- ZAMUNER, S.R., GUTIÉRREZ, J.M, MUSCARÁ, M.N., TEIXEIRA, S.A., TEIXEIRA, C.F.P. (2001). *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. **Toxicon** 39: 1505-1513.
- ZHANG, L., CUI, L. (2007). A cytotoxin isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom induces apoptosis via Fas pathway in A549 cells. **Toxicol. In Vitro** 21: 1095-1103.
- ZHANG, L., WEI, L.J. (2007). ACTX-8, a cytotoxic L-amino acid oxidase isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom, induces apoptosis in HeLa cervical cancer cells. **Life Sci.** 80: 1189-1197.
- ZHAO, M., BRUNK, U.T., EATON, J.W. (2001). Delayed oxidant-induced cell death involves activation of phospholipase A₂. **FEBS Lett.** 509: 399-404.
- ZHAO, Q., ARAKI, S., ZHANG, S., MIAO, J. (2004). Rattlesnake venom induces apoptosis by stimulating PC-PLC and upregulating the expression of integrin β_4 , p53 in vascular endothelial cells. **Toxicon** 44: 161-168.
- ZHAO, S., DU, X.Y., CHAI, M.Q., CHEN, J.S., ZHOU Y.C., SONG J.G. (2002a). Secretory phospholipase A₂ induces apoptosis via a mechanism involving ceramide generation. **Biochim. Biophys. Acta** 1581: 75-88.
- ZHAO, S., DU, X.Y., CHEN, J.S., ZHOU, Y.C., SONG, J.G. (2002b). Secretory phospholipase A₂ inhibits epidermal growth factor-induced receptor activation. **Exp. Cell Res.** 279: 354-364.

ANEXOS

Publicações resultantes da tese:

Artigos completos publicados:

NASCIMENTO, J.M., FRANCHI, G.C., NOWILL, A.E., COLLARES-BUZATO, C.B., HYSLOP, S. (2007). Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by *Bothrops alternatus* snake venom in cultured Madin-Darby canine kidney cells. **Biochem Cell Biol.** Oct ;85 (5):591-605.

DAMICO, D.C.S.; **NASCIMENTO J.M.**; PONCE-SOTO, L.; LOMONTE, B.; JOAZEIRO, P.P.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C.; COLLARES-BUZATO, C.B. (2007). Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake venom and its purified basic phospholipase A2 (LMTX-I) in cultured cells. **Toxicon** 49(5): 678-692.

Artigos completos em revisão:

NASCIMENTO, J.M., SOUZA, G.H.M.F., EBERLIN, M.N., COLLARES-BUZATO, C.B., HYSLOP, S. Purification and characterization of a DNase from *Bothrops alternatus* snake venom.

Resumos publicados:

NASCIMENTO, J.M.; COLLARES-BUZATO, C.B.; HYSLOP, S. DNase II from *Bothrops alternatus* snake venom: purification and toxicity in MDCK cells. *In*: 36th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th IUBMB Conference. Salvador, BA, Brasil. Maio 2007. p. 113.

NASCIMENTO, J.M., COLLARES-BUZATO, C.B., HYSLOP, S. A deoxyribonuclease II from *Bothrops alternatus* snake venom. IX Congresso Brasileiro de Toxinologia. Anais The Journal Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. Fortaleza, CE, Brasil. Novembro 2006. v. 13, p. 360.

NASCIMENTO, J.M., COLLARES-BUZATO, C.B., HYSLOP, S. Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by *Bothrops alternatus* snake venom in cultured madin-Darby canine kidney cells. 15th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins. Glasgow, Escócia. Julho 2006. p. 318

NASCIMENTO, J.M., COLLARES-BUZATO, C.B., HYSLOP, S. Purification and partial characterization of a deoxyribonuclease II from *Bothrops alternatus* (urutu) venom. 15th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins. Glasgow, Escócia. Julho 2006. p. 260.

Resumos

DAMICO, D.C.S.; **NASCIMENTO J.M.**; PONCE-SOTO, L.; LOMONTE, B.; JOAZEIRO, P.P.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C.; COLLARES-BUZATO, C.B. Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake venom and its purified basic phospholipase A2 (LMTX-I) in cultured cells. In: XXI Reunião Anual da FeSBE, 2006, Águas de Lindóia, SP, Brasil. Anais da Reunião. p. 43041.

NASCIMENTO, J.M.; HYSLOP, S. Isolation of DNase II from *Bothrops alternatus* snake venom. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. Águas de Lindóia, SP, Brasil. Julho de 2005.

NASCIMENTO, J.M.; HYSLOP, S. Deoxyribonuclease II activity of *Bothrops* snake venoms: partial purification of DNase II from *Bothrops alternatus* snake venom. VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia e VIII Symposium of the Pan American Section of the International Society on Toxinology. Angra dos Reis, RJ, Brasil. Setembro de 2004.

NASCIMENTO, J.M., COLLARES-BUZATO, C.B., HYSLOP, S. Cytotoxic action of *Bothrops alternatus* snake venom in cultured MDCK cells. VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia e VIII Symposium of the Pan American Section of the International Society on Toxinology. Angra dos Reis, RJ, Brasil. Setembro de 2004. p.129.

NASCIMENTO, J.M., COLLARES-BUZATO, C.B., HYSLOP, S. Cytotoxic action of *Bothrops alternatus* snake venom in cultured MDCK cells. XII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular e IX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Biologia Celular. Campinas, SP, Brasil. Julho de 2004. p. I-014.