

AVALIAÇÃO DO PROCESSO APOPTÓTICO INDUZIDO POR VENENO DE SERPENTES EM CÉLULAS CHO-K1

Natália Lima dos Reis¹, Maíra Maftoum-Costa², Cristina Pacheco-Soares³

¹ Universidade do Vale do Paraíba/IPD – Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares; Avenida Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos/SP, CEP 12244-000; nataliareis@bol.com.br

² Universidade do Vale do Paraíba/IPD – Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares; Avenida Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos/SP, CEP 12244-000; maftoum@gmail.com.

³ Universidade do Vale do Paraíba/IPD – Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares; Avenida Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos/SP, CEP 12244-000; cpsoares@univap.br.

Resumo: Serpentes peçonhentas produzem uma variedade de toxinas altamente efetivas e essas desenvolveram numerosos métodos de distribuição desse veneno. Muitos venenos de serpentes têm-se revelado uma mistura complexa de moléculas farmacologicamente importantes, as quais apresentam atividades biológicas como neurotoxicidade, citotoxicidade entre outros. Em nosso estudo avaliamos a ação do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* sobre cultura de células CHO-K1 (ovário de Hamstêr chinês) nos períodos de 1, 6 e 12h após tratamento com concentrações variadas (10, 50 e 100 µg/mL). Observamos que após 6 horas de incubação com o veneno as células iniciam processo de morte celular por apoptose, verificada através da fragmentação de DNA. Com base nestes resultados, pretendemos avaliar os componentes do veneno, em separado, para verificarmos se as frações do veneno apresentam tal efeito.

Palavras-chave: cultura de células, *Crotalus durissus terrificus*, apoptose.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

As serpentes do gênero *Crotalus* estão representadas no Brasil por apenas uma espécie, a *Crotalus durissus*, e distribuídas em cinco subespécies: *C. durissus terrificus*, encontrada nas zonas altas e secas da região sul oriental e meridional; *C. durissus collilineatus*, distribuídas nas regiões secas da região centro-oeste, Minas Gerais e norte de São Paulo; *C. durissus cascavella*, encontrada nas áreas da caatinga do nordeste; *C. durissus ruruima*, observada na região norte do país; *C. durissus marajoensis*, observada na Ilha de Marajó (PINHO *et al.* 2001).

O veneno crotálico quase não produz lesão local, possuindo principalmente três atividades com importância clínica conhecida. Atividade neurotóxica, com ações periféricas, causando paralisia flácida da musculatura esquelética, principalmente ocular, facial e às vezes, da respiração, com conseqüente insuficiência respiratória; atividade coagulante, provocando a ocorrência de sangramento e distúrbios da coagulação por consumo de fibrinogênio; e atividade miotóxica sistêmica, causando rabdomiólise generalizada, podendo evoluir para insuficiência renal aguda (PINHO *et al.*, 2001).

Existem 2 tipos de morte celular: morte celular programada (apoptose) e necrose (WISING *et al.* 2005). As células que morrem por necrose, como

resultado de injúria, geralmente incham e perdem a integridade de membrana, acarretando em influxo de água e íons extracelulares. Entretanto, *in vivo*, morte celular necrótica está freqüentemente associada com o extensivo dano no tecido resultando em uma extensa resposta inflamatória (ALBERTS *et al.*, 1997; APOPTOSIS, 2002). Já no processo de morte apoptótica a célula é uma vítima passiva, sem perder a integridade da membrana, onde tem um papel ativo, com um gasto de energia para levar a sua própria morte. Durante esse processo não ocorre um aumento de tamanho ou inchaço das células. Constatou-se que as células moribundas primeiro encolhem e posteriormente se destacam das células vizinhas. Logo em seguida ocorre a agregação da cromatina, condensação citoplasmática e nuclear, partição da membrana em corpos apoptóticos, o qual contém organelas morfológicamente intactas. *In vivo*, esses corpos apoptóticos são rapidamente reconhecidos e fagocitados por macrófagos ou células vizinhas. Uma vez dentro do macrófago, a célula apoptótica é rapidamente desmontada, e seus blocos de constituintes químicos, reusados sem nenhuma resposta inflamatória (DUKE *et al.*, 1996).

Esse trabalho teve como objetivo observar o processo de fragmentação do DNA após tratamento em células CHO-K1 com veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* em concentrações variadas.

Materiais e Métodos

A linhagem celular utilizada foi a CHO-K1 (célula de ovário de Hamstêr chinês) cultivadas em meio de cultura HAM-F12 (Gibco) incubada em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C (Forma Scientific).

Tratamento com veneno. O veneno bruto utilizado foi o da serpente *Crotalus durissus terrificus*, obtida através do Dr. José Carlos Cogo do laboratório de Fisiologia e Farmacologia do IP&D-UNIVAP. As células CHO-K1 foram incubadas com o veneno bruto nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL por 1 hora. Após os períodos de 1, 6 e 12 horas posterior ao tratamento as células foram lisadas para a análise de fragmentação do DNA.

Ensaio de Fragmentação do DNA: As células submetidas ao tratamento foram lisadas com tampão de lise (10 mM Tris pH7,5; 400mM NaCl; 1mM EDTA; 1% Triton X-100), incubadas no gelo por 15 min e centrifugada por 4°C por 15 min na velocidade de 13600xg. O sobrenadante foi incubado com Rnase (0,2mg/mL) com proteinase K (0,1 mg/mL) por 2h a 37 °C. O DNA foi extraído usando fenol/clorofórmio (1:1, v/v) e precipitado em etanol 96% overnight a -80°C. O DNA precipitado foi centrifugado (13600xg; 4 °C; 15 min) e o pellet seco dissolvido em 20 µL de tampão Tris-EDTA (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM EDTA). O DNA obtido foi analisado em gel de agarose a 1,5% contendo 0,3 µg/mL de brometo de etídio em tampão Tris-borato-EDTA a 75V por 1,5h. As bandas foram visualizadas em transluminador e fotografado usando sistema de imagem Kodak Gel Logic 100.

Resultados

A análise do DNA por eletroforese indicou a presença de fragmentação do mesmo após tratamento com o veneno (Fig1). Após 1 hora de incubação com o veneno, não foi observada a degradação do DNA em nenhuma das concentrações utilizadas (Fig 1 A, B e C). Foi possível observar a fragmentação nas concentrações de 10 µg/mL (Fig 1D), 50 µg/mL (Fig 1E) e 100 µg/mL (Fig 1F) a partir de 6h após o tratamento, porém o padrão observado na maior concentração em 6h (Fig 1F) foi semelhante aos encontrados nas menores concentrações após 12h (Fig 1G e H) demonstrando que a rapidez da degradação do DNA foi dependente da concentração utilizada.

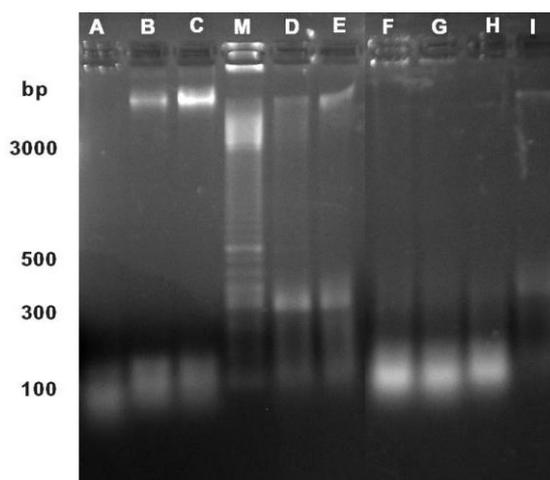


Fig 1. Gel de eletroforese após o tratamento de células CHO-K1 com 3 concentrações do veneno bruto de *C. d. terrificus*. **A** 1h após o tratamento com o veneno na concentração de 10 µg/mL; **B** 1h após o tratamento com o veneno na concentração de 50 µg/mL; **C** 1h após o tratamento com o veneno na concentração de 100 µg/mL; **M** marcador de peso molecular; **D** 6h após o tratamento com o veneno na concentração de 10 µg/mL; **E** 6h após o tratamento com o veneno na concentração de 50 µg/mL; **F** 6h após o tratamento com o veneno na concentração de 100 µg/mL; **G** 12h após o tratamento com o veneno na concentração de 10 µg/mL; **H** 12h após o tratamento com o veneno na concentração de 50 µg/mL; **I** 12h após o tratamento com o veneno na concentração de 100 µg/mL.

Discussão

No presente trabalho foi possível observar dano ao DNA nuclear decorrente da incubação com veneno bruto de *C. d. terrificus*. A presença do padrão de fragmentação do DNA é um indicativo do tipo de morte celular ocorrida.

Kerr em 1972 (*apud* OLEINICK; MORRIS; BELICHENKO, 2002) foi o primeiro a apresentar evidências de que a célula pode desencadear pelo menos dois mecanismos de morte celular. O primeiro é conhecido como necrose, uma violenta e rápida forma de degeneração que afeta extensivamente uma população celular. Este processo é caracterizado pelo inchaço do citoplasma, destruição das organelas e rompimento da membrana plasmática, levando a liberação do conteúdo intracelular e inflamação (CASTANO; DEMINOVA; HAMBLIN, 2005).

Outro processo de morte celular foi nomeado apoptose, esta é referida como uma forma específica de morte celular programada que envolve a ativação de uma família de proteases designada caspases e possuindo papel central no

desenvolvimento e homeostase (REED, 2000; DANIAL; KORSMEYER, 2004). A apoptose é caracterizada por retração celular, protusões protoplasmáticas, permanência da integridade de membrana e posterior fragmentação celular dando origem a vesículas, contendo material citoplasmático e organelas (RELLO *et al.*, 2005), no organismo esses corpos apoptóticos serão fagocitados por macrófagos evitando uma resposta inflamatória (CASTANO; DEMINOVA; HAMBLIN, 2005).

Tamietti *et al.* (2006) utilizaram veneno bruto de *C. d. terrificus* em células CHO-K1 e concluíram que nas concentrações de 10, 50 e 100µg/mL o tratamento causou fragmentação nuclear, fenômeno observado em células apoptóticas. O padrão de degradação do DNA, encontrado no presente trabalho, confirma o tipo de morte celular como sendo apoptótico.

O processo de morte celular apoptótica tem sido descrito por muitos autores após o tratamento com venenos (ALI *et al.*, 2000; FERRI, KROEMER, 2001). O veneno de serpentes é um potente promotor da apoptose em VEC (ZINSZNER *et al.*, 1998), porém os exatos mecanismos moleculares que induzem a morte celular permanecem desconhecidos.

Conclusão

Foi observada a presença de fragmentação do DNA, decorrente de processo apoptótico, em células CHO-K1 tratadas com veneno bruto de *C. d. terrificus* nas concentrações de 10, 50 e 100µg/mL 6 horas após o tratamento.

Referências

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed., 1291p.1997

ALI SA, STOEVA S, ABBASI A, ALAM J.M, KAYED R, FAIGLE M, NEUMEISTER B, VOELTER W. Isolation, structural Biophys, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. **Arch Biochem.**;384:216-226, 2000

APOPTOSIS AND CELL PROLIFERATION. 2ª ed. Mannheim:Boehringer. P.125 Disponível em: (http://biochem.roche.com/prod_inf/manuals/cell_man/cell_toc.html)

CASTANO, A.P.; DEMINOVA, T.N. AND HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death.

Photodiagnosis and Photodynamic therapy. v. 2, p. 1-23, 2005.

DANIAL, N.N; KORSMEYER, S.J. Cell death: critical control point. **Cell**. v. 116, p. 205-219, 2004.

DUKE,R.C.; OJCIUS, D.M.; DING-E YOUNG, J. Cell Suicide in Health and Disease. **Scientific American**.p. 1-8, 1996

FERRI, KF, KROEMER G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. **Nature Cell Biology** ;3:255-262. 2001

OLEINICK, N.L.; MORRIS, R.L.; BELICHENKO. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. **Photochem. Photobiol. Sci.** v.1, p. 1-21, 2002.

PINHO,F.M.O.;PEREIRA,I.D.**Ofidismo**.Rev.As soc.Med. Bras.,ene./mar., v. 47, nº. 1, p 24-29, 2001.

REED, C.J. Apoptosis and cancer: strategies for integrating programmed cell death. **Semin. Hemtol.** v. 37, p. 9-16, 2000.

RELLO, S., STOCKERT, J.C., MORENO, V., GÁMEZ, A., PACHECO, M., JUARRANZ, A., CAÑETE, M. AND VILLANUEVA. Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. **Apoptosis**. v. 10, p. 201-208, 2005.

TAMIETI, B.P.; DAMATTE, R.A.; COGO, J.C.; DA SILVA, N.S.; MITTMAN, J.; PACHECO-SOARES, C. Cytoeskeleton, endoplasmatic reticulum and nuclear alteration in CHO-K1 cell line after *Crotalus Durissus terrificus* (south american rattlesnake) venom treatment. **J. of Venomous Animals and Toxins**. V.12, 2006.

WISING, C.; AZEM, J.; ZETTERBERG, M.; SVENSSON, L.A.; AHLMAN, K.; LAGERGARD, T. **Induction of apoptosis/necrosis in various human cell lineages by Haemophilus ducreyi cytolethal distending toxin**. **Toxicon**. Vol.45: 767-776. 2005

ZINSZNER H., KURODA M., WANG X., BATCHVAROVA N., LIGHTFOOT RT., REMOTTI H., STEVENS JL., RON D. **Chop is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum**. **Genes Dev.**,12(7):982-95, 1998.