

AVALIAÇÃO DO PROCESSO APOPTÓTICO INDUZIDO POR VENENO DE SERPENTES EM CULTURA CELULAR

Natália Lima dos Reis¹, Maíra Maftoum Costa¹, Josane Mittmann², José Carlos Cogo³, Cristina Pacheco-Soares¹

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 Biologia Molecular e Imunobiologia ; Avenida Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos/SP, CEP 12244-000.

³ Universidade do Vale do Paraíba/IPD – Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica ; Avenida Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos/SP, CEP 12244-000.

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 e citotoxicidade entre outros. Em nosso estudo avaliamos a ação do veneno fracionado de *Crotalus durissus terrificus* sobre cultura de células HEP-2 (carcinoma epidermóide da laringe) no período de 24h após tratamento com a concentração de 10µg/mL. Observamos que após 24h de incubação com as frações(F1, F5 e F7), as células iniciaram processo de morte celular por apoptose apenas na fração 5, correspondente a crotoxina, contendo atividade fosfolipásica A2. Com base nesses resultados, pretendemos avaliar a ação do veneno bruto e as frações(F2,F3,F4,F6), avaliando o efeito do veneno no processo de morte por apoptose, tendo a liberação do citocromo C como mediador deste processo.

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 HEP-2 com o veneno fracionado de *Crotalus durissus terrificus* em mesma concentração.

Materiais e Métodos

Cultura Celular. A linhagem celular utilizada foi a HEP-2(carcinoma epidermóide de laringe) cultivadas em meio de cultura MEM (Gibco) incubada em atmosfera de 5% de de CO₂ a 37oC (Forma Scientific).

Tratamento com veneno. O veneno fracionado utilizado foi o da serpente *Crotalus durissus terrificus* , fornecido pelo Dr. José Carlos Cogo do laboratório de Fisiologia e Farmacologia do IP&D-UNIVAP. As células HEP-2 foram incubadas com o veneno fracionado na concetração de 10, µg/mL por 24 hora. Após o período de 24horas 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 20µL de tampão Tris-EDTA (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM EDTA). O DNA obtido foi analisado em gel de agarose a 2% contendo 0,3µg/mL de brometo de etídio em tampão Tris-borato-EDTA a 40V por 2,5h. 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 24h de incubação com o veneno, foi observada a degradação do DNA apenas na fração 5, com a concentração de 10µg/mL (Fig.1. M,C e A). Não foi possível observar fragmentação nas frações 1 e 7, com a concentração de 10µg/mL(Fig.2. M,A,B e C),demonstrando que a degradação do DNA foi dependente da atividade fosfolipásica presente na fração 5 utilizada.

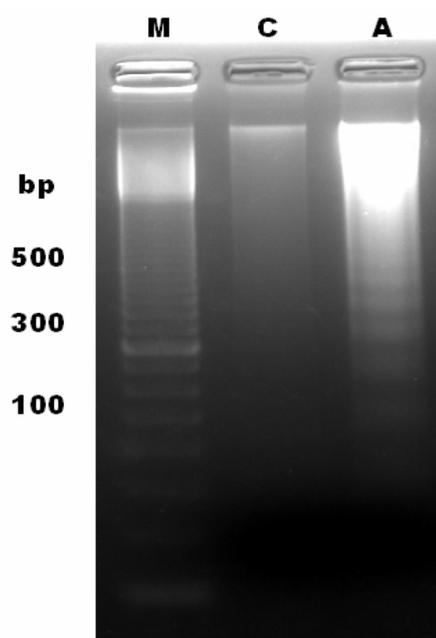


Fig 1. Gel de eletroforese após o tratamento de células HEP-2 com concentração do veneno fracionado de *C. d. terrificus*. **M.** marcador de peso molecular; **C.** grupo controle(sem tratamento); **A.** 24hapós tratamento com a fração 5 na concentração de 10µg/mL.

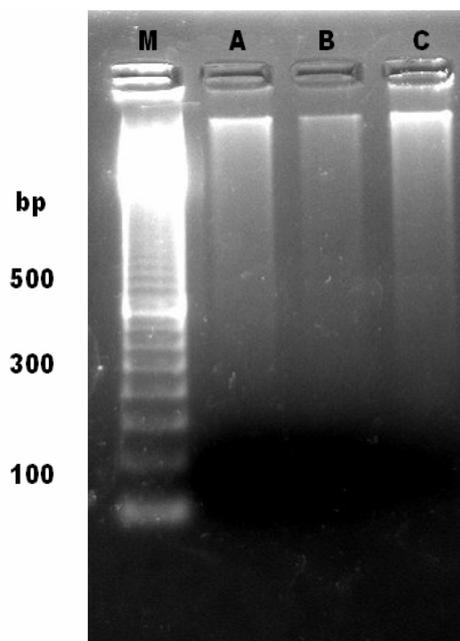


Fig.2. Gel de eletroforese após tratamento de células HEP-2 com concentração do veneno fracionado de *C.d.terrificus* .**M.**marcador de peso molecular;**A.** grupo controle;**B.** 24h após tratamento com a fração 1 na concentração de 10µg/mL;**C.** 24h após tratamento com a fração 7 na concentração de 10µg/mL.

Discussão

No presente trabalho foi possível observar dano ao DNA nuclear decorrente da incubação com veneno fracionado 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).

Novaes, *et al.* (2004) utilizaram veneno fracionado de *C. d. terrificus* em células HEP-2 e concluíram que nas concentrações de 0,5; 1 e 5µg/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.

Em resultados anteriores obtidos em nosso laboratório, verificou-se que o veneno bruto favorece a fragmentação de DNA (Tamietti, *et al.* 2007). Com a separação de frações protéicas presentes no veneno, foram testadas as frações que acarretaram efeito citotóxico as células (Novaes, *et al.* 2004), dentre elas a fração 5, que apresenta características de fosfolipase A2.

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 HEP-2 tratadas com veneno fracionado de *C. d. terrificus* nas concentrações de 10µg/mL, 24 horas após o tratamento somente com a fração 5, que apresenta perfil fosfolipase A2, traçado pelo Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica-IP&D – UNIVAP.

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.

- NOVAES, M.F. SOARES, C.P; COGO, J.C; A ação do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em cultura de células neoplásicas. UNIVAP. 2004.

- 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.

- TAMIETTI, B. F. P. ; DaMatta, R.A; COGO, J. C. ; SILVA, Newton Soares da ; PACHECO-SOARES, C. . **Cytoskeleton, endoplasmic reticulum and nuclear alteration of CHO-K1 cell line after Crotalus durissus terrificus (South American rattlesnake) venom treatment.** *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* -, v.13; p.56-68;2007