




Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE FERNANDA COSTAL OLIVEIRA.**  
 Aos nove dias do mês de fevereiro de 2017 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Caracterização dos mecanismos citotóxicos induzidos pelo veneno bruto de *Bothrops atrox* e de sua toxina purificada L-aminoácido oxidase", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Delfin Chavez Olortegui, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Marcia Helena Borges (Fundação Ezequiel Dias-BH), aprovada; Dra. Mariana Quezado (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Vanessa Pinho da Silva (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Andreimar Martins Soares (FIOCRUZ - Rondônia), aprovada; Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 09 de fevereiro de 2017.

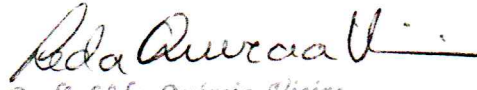
Dra. Marcia Helena Borges (Fundação Ezequiel Dias-BH) 

Dra. Mariana Quezado (UFMG) 

Dra. Vanessa Pinho da Silva (UFMG) 

Dr. Andreimar Martins Soares (FIOCRUZ - Rondônia) 

Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui - Orientador (UFMG) 

  
 Profª Leda Quercia Vieira  
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

---

**Caracterização de mecanismos citotóxicos  
induzidos pelo veneno de *Bothrops atrox* e de  
sua toxina purificada L-aminoácido oxidase**

---

**FERNANDA COSTAL OLIVEIRA**

BELO HORIZONTE

FEVEREIRO DE 2017

FERNANDA COSTAL OLIVEIRA

**Caracterização dos mecanismos citotóxicos  
induzidos pelo veneno de *Bothrops atrox* e de  
sua toxina purificada L-aminoácido oxidase**

Tese de doutorado apresentada  
ao programa de pós-graduação  
em Bioquímica e Imunologia,  
Instituto de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Minas  
Gerais (UFMG)

**ORIENTADOR: DR. CARLOS CHAVEZ OLÓRTEGUI**

**CO-ORIENTADORA: DRA. VÂNIA BRAGA**

BELO HORIZONTE

FEVEREIRO DE 2017

***Este trabalho foi realizado:***

no Laboratório de Imunoquímica de Proteínas, ICB, UFMG;

no Laboratório do Departamento de Medicina Molecular, Imperial College  
London, Reino Unido.

*E contou com o apoio financeiro de:*

Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB – UFMG;

CNPq;

CAPES;

FAPEMIG;

Welcome Trust

## ***DEDICATÓRIA***

Dedico esta tese à minha família, pelo apoio e incentivo que sempre me deram e que possibilitou que eu completasse mais esta etapa. E a minha tia Eleonora, por ter sido exemplo de incansável vontade de aprender e por ter despertado em mim a paixão por outros países e culturas.

## ***AGRADECIMENTOS***

Ao Dr. Carlos Chávez Olórtegui, por ser meu “pai científico”, pela orientação, consideração e por todas as preciosas oportunidades que me proporcionou.

À Dra. Vânia Braga por me acolher em seu laboratório, pelas longas reuniões e por todo aprendizado que obtive durante minha estadia em Londres.

À Dra. Clara Guerra Duarte, pelos 8 anos de amizade, paciência, correções e orientação (científica e espiritual =) ).

À Dra. Stephanie Stransky, pelas longas horas de trabalho, conversas e por encarar a difícil tarefa de morar comigo em Londres.

À Letícia, por toda ajuda com experimentos, soluções preparadas, ideias, ensinamentos e pelo seu constante bom humor.

À Gabi, Daysi e Karen, pelas conversas diárias mesmo estando longe e pela amizade preciosa que construímos e conseguimos manter até hoje.

Ao Dr. Ricardo Andrez, pela paciência, ajuda e ensinamentos.

À Camila, Thais e Déia, pelo carinho, incentivo e pelas conversas.

Aos amigos do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas pela ajuda com experimentos e por tornarem meu ambiente de trabalho tão agradável.

Aos amigos do BragaLab, Jenni, Kyasha, Anna, Krisna, Susann e Mathieu, e à todos que passaram por lá durante minha estadia, pela paciência para me ensinar novas técnicas, pelo agradável ambiente, por todos os conselhos pessoais e profissionais e, principalmente, pela amizade. E à Faizah, pelos diversos e mails trocados e pelos preciosos conselhos para os experimentos de autofagia.

À Mandy e Irina por tornarem meu trabalho mais fácil e pelas horas de conversas e risadas.

Ao Steve e toda à equipe do FILM, pela ajuda com microscopia e análise das imagens.

Ao Dr. Eládio Sanchez por abrir seu laboratório para mim, pela orientação e conselhos sobre purificação.

À Siléia por me ajudar na purificação da LAAO e pelas longas horas de conversas.

Ao Jamil, pela ajuda, bom humor e por sempre disponibilizar reagentes e equipamentos.

Ao Orlando, por toda atenção e ajuda com a parte burocrática do doutorado.

Aos meus amigos de Londres, Luiza, Robson, Paola, Rafael, Jú, Matheus e Lorena, pelas gargalhadas, choros, pints e por serem minha família em Londres. E a todos os outros que tornaram minha vida lá mais alegre.

Às minhas amigas Luiza, Marina, Bárbara, Paulinha, Ana Luiza e Mariana, pela amizade sincera, por estarem sempre ao meu lado e torcendo por mim.

A todos meus amigos de Lagoa Santa, pelos momentos de diversão.

Aos meus amados cães, por encherem minha vida com alegria e carinho e por serem minha válvula de escape.

Ao Luan, pelo amor, por sempre me apoiar, me incentivar a estudar e me dedicar cada vez mais e por ter tido paciência para me esperar e disposição para me visitar nos dois anos de doutorado sanduíche.

À Dum, por toda sua ajuda na minha ida para Londres e pelo carinho e atenção de sempre.

À minha irmã Mariana e ao Felipe, pelo apoio, amor, companheirismo, conselhos e incentivo.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, por sempre acreditarem em mim e por entenderem todos os momentos que estive ausente.

Aos membros da banca, pela atenção e pela correção desta tese.

Às agências financiadoras, que possibilitaram a execução deste trabalho.

E todos que, de alguma maneira, contribuíram para a concretização deste trabalho.



# Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>- 2 -</b>
1.1 ACIDENTES OFÍDICOS .....	- 2 -
1.2 <i>BOTHROPS ATROX</i> E O ENVENENAMENTO BOTRÓPICO .....	- 4 -
1.3 COMPOSIÇÃO DO VENENO BOTRÓPICO .....	- 6 -
1.4 L- AMINOÁCIDO OXIDASES (LAAOs) .....	- 8 -
1.5 SOROTERAPIA.....	- 12 -
1.6 VENENOS E BIOTECNOLOGIA.....	- 13 -
1.7 MORTE CELULAR.....	- 14 -
1.8 EPITÉLIO E JUNÇÕES ADERENTES .....	- 17 -
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>- 20 -</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	- 20 -
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	- 20 -
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>- 22 -</b>
3.1 OBTENÇÃO DO VENENO .....	- 22 -
3.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS .....	- 22 -
3.3 PURIFICAÇÃO DA LAAO DO VENENO DE <i>B. ATROX</i> .....	- 22 -
3.3.1 <i>Cromatografia de gel filtração em Sephacryl S-200</i> .....	- 22 -
3.3.2 <i>Cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose CL 6B</i> .....	- 22 -
3.3.3 <i>Cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Heparin HP</i> .....	- 23 -
3.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO SDS (SDS-PAGE).....	- 23 -
3.5 ATIVAÇÃO DA L- AMINOÁCIDO OXIDASE.....	- 24 -
3.6 ATIVIDADE DE L- AMINOÁCIDO OXIDASE .....	- 24 -
3.7 CULTURA CELULAR .....	- 24 -
3.8 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	- 25 -
3.9 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> NA CITOTOXICIDADE DO VENENO E DA LAAO.....	- 26 -
3.10 DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE CELULAR.....	- 27 -
3.10.1 <i>Apoptose/Necrose</i> .....	- 27 -
3.10.2 <i>Potencial de membrana mitocondrial</i> .....	- 28 -
3.10.3 <i>Necrose</i> .....	- 28 -
3.10.4 <i>Autofagia</i> .....	- 29 -
3.11 AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA CELULAR .....	- 31 -

3.11.1	<i>Avaliação da morfologia celular</i> .....	- 31 -
3.11.2	<i>Alterações celulares em células transfectadas com Life Act-RFP</i> .....	- 31 -
3.11.3	<i>Alterações celulares utilizando marcação por imunofluorescência</i> .....	- 32 -
3.12	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS TOTAIS DE PROTEÍNAS CELULARES.....	- 33 -
3.13	AVALIAÇÃO DE ADESÃO CELULAR .....	- 35 -
3.13.1	<i>Tratamento das células</i> .....	- 35 -
3.13.2	<i>Tratamento das matrizes extracelulares</i> .....	- 36 -
3.14	MEDIDA DE ROS INTRACELULAR .....	- 36 -
3.15	MEDIDA DE OXIDAÇÃO DE PROTEÍNAS CELULARES.....	- 36 -
3.16	MARCAÇÃO DE LAAO .....	- 38 -
3.17	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	- 38 -
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>- 41 -</b>
4.1	VENENO DE <i>BOTHROPS ATROX</i> .....	- 41 -
4.2	PURIFICAÇÃO DA LAAO E ANÁLISE DAS FRAÇÕES DO VENENO .....	- 58 -
4.3	L-AMINOÁCIDO OXIDASE .....	- 66 -
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>- 92 -</b>
<b>6.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>- 105 -</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>- 108 -</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>- 110 -</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>- 125 -</b>

## *Lista de Figuras*

Figura 1: Número global de casos de doenças tropicais negligenciadas por ano. ....	- 2 -
Figura 2: Notificação de acidentes causados por serpentes peçonhentas no Brasil. ....	- 4 -
Figura 3: Serpente <i>B. atrox</i> e sua distribuição. ....	- 5 -
Figura 4: Sintomas de envenenamento botrópico. ....	- 5 -
Figura 5: Composição proteica do veneno de <i>B. atrox</i> . ....	- 7 -
Figura 6: Reação catalisada pela enzima L- aminoácido oxidase. ....	- 8 -
Figura 7: Estrutura cristalográfica do dímero funcional da LAAO de <i>B. atrox</i> . ....	- 9 -
Figura 8: Três vias de morte celular. ....	- 15 -
Figura 9: Estrutura da caderina clássica de vertebrados. ....	- 18 -
Figura 10: Citotoxicidade do veneno de <i>B. atrox</i> em queratinócitos de cultura primária. ....	- 41 -
Figura 11: Morfologia de queratinócitos tratados com veneno de <i>B. atrox</i> . ....	- 42 -
Figura 12: Dinâmica e morfologia de queratinócitos tratados com veneno de <i>B. atrox</i> . .	- 46 -
Figura 13: Estrutura de E-caderina e F-actina em queratinócitos tratados com veneno de <i>B. atrox</i> . ....	- 46 -
Figura 14: Níveis totais de E-caderina, $\alpha$ e $\beta$ -cateninas em queratinócitos tratados com veneno de <i>B. atrox</i> . ....	- 47 -
Figura 15: Efeitos do veneno de <i>B. atrox</i> na adesão de queratinócitos. ....	- 48 -
Figura 16: Análise de eventos apoptóticos e necróticos em queratinócitos tratados com <i>B. atrox</i> . ....	- 52 -
Figura 17: Análise de apoptose e necrose após tratamento com veneno de <i>B. atrox</i> . ....	- 52 -
Figura 18: Análise do potencial de membrana mitocondrial de células tratadas com veneno de <i>B. atrox</i> . ....	- 53 -
Figura 19: Potencial de membrana mitocondrial em células tratadas com o veneno de <i>B. atrox</i> (0,5 DC <sub>50</sub> ). ....	- 54 -

Figura 20: Avaliação da necrose em queratinócitos tratados com o veneno de <i>B. atrox</i> ...	55 -
Figura 21: Análise da autofagia em queratinócitos tratados com veneno de <i>B. atrox</i> . ....	57 -
Figura 22: Cromatograma representativo da purificação em coluna de gel filtração Sephacryl S-200 e perfil proteico das frações.. .....	59 -
Figura 23: Ensaio de citotoxicidade das frações da cromatografia de Sephacryl S-200, destacando em laranja a fração com atividade de LAAO. ....	60 -
Figura 24: Cromatograma representativo da purificação em coluna troca iônica em coluna DEAE Sepharose CL-6B e conteúdo das frações. ....	61 -
Figura 25: Ensaio de citotoxicidade das frações provenientes da cromatografia de troca iônica, destacando em laranja a fração com atividade de LAAO. ....	62 -
Figura 26: Cromatograma representativo da purificação em coluna de afinidade por heparina. ....	62 -
Figura 27: Ensaio de citotoxicidade das frações da cromatografia de afinidade, destacando em laranja a atividade a fração com atividade de LAAO. ....	63 -
Figura 28: Verificação da pureza de LAAO. ....	64 -
Figura 29: Determinação da massa molecular de LAAO. ....	64 -
Figura 30: Esquema das etapas de purificação do veneno. ....	65 -
Figura 31: Atividade de LAAO do veneno total e frações utilizadas na purificação de LAAO. ....	65 -
Figura 32: Efeito da temperatura e ativação de LAAO na atividade enzimática. ....	67 -
Figura 33: Citotoxicidade de LAAO em queratinócitos de cultura primária. ....	68 -
Figura 34: Influência do peróxido de hidrogênio na citotoxicidade de LAAO e do veneno de <i>B. atrox</i> . ....	69 -
Figura 35: Aspectos morfológicos de queratinócitos tratados com LAAO. ....	70 -
Figura 36: Dinâmica e morfologia de células tratadas com LAAO. ....	73 -
Figura 37: Estrutura de E-caderina e F-actina em células tratadas com LAAO. ....	74 -

Figura 38: Papel do peróxido de hidrogênio nas alterações de E-caderina e F-actina causadas por LAAO. ....	- 75 -
Figura 39: Níveis totais de proteínas em queratinócitos incubados com a LAAO. ....	- 76 -
Figura 40: Efeitos da LAAO na adesão celular. ....	- 77 -
Figura 41: Espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular em queratinócitos tratados..	- 78 -
Figura 42: Oxidação de proteínas de queratinócitos por LAAO. ....	- 79 -
Figura 43: Análise de apoptose e necrose em células tratadas com LAAO. ....	- 82 -
Figura 44: Análise de eventos apoptóticos e necróticos após tratamento com a LAAO. ...	- 83 -
Figura 45: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de células tratadas com a LAAO. ....	- 85 -
Figura 46: Potencial de membrana mitocondrial após tratamento com a LAAO. ....	- 86 -
Figura 47: Avaliação da necrose em células tratadas com a LAAO. ....	- 87 -
Figura 48: Autofagia em células tratadas com a LAAO. ....	- 88 -
Figura 49: Internalização de LAAO por queratinócitos. ....	- 90 -
Figura 50: Resumo das alterações causadas pelo tratamento de queratinócitos com veneno de <i>B. atrox</i> . ....	- 105 -
Figura 51: Resumo das alterações causadas pelo tratamento de queratinócitos com LAAO de <i>B. atrox</i> . ....	- 106 -

## *Lista de Tabelas*

Tabela 1: Acidentes ofídicos registrados no Brasil no ano de 2013 .....	- 3 -
Tabela 2: Anticorpos primários usados nos ensaios de imunofluorescência. ....	- 33 -
Tabela 3: Anticorpos secundários usados nos ensaios de imunofluorescência .....	- 33 -
Tabela 4: Anticorpos primários usados para <i>Western Blots</i> .....	- 34 -
Tabela 5: Anticorpos secundários usados para <i>Western Blots</i> .....	- 34 -
Tabela 6: Etapas da purificação de LAAO. ....	- 66 -

## ***Lista de Siglas e Abreviaturas***

<b>BSA</b>	Albumina Bovina
<b>COL I</b>	Colágeno I
<b>COL IV</b>	Colágeno IV
<b>CRISP</b>	Proteína Secretora Rica em Citeína
<b>CTL</b>	Lectina do Tipo C
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DC<sub>50</sub></b>	Dose citotóxica que diminui em 50% a viabilidade celular
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EBSS</b>	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
<b>FAD</b>	Flavina adenine dinucleotídeo
<b>FBD</b>	Domínio de ligação ao FAD
<b>FCCP</b>	Fluorocarbonil-cianeto fenilhidrazona
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FMN</b>	Flavina Mononucleotídeo
<b>FN</b>	Fibronectina
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
<b>HD</b>	Domínio helicoidal
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>IP</b>	Iodeto de Propídeo
<b>JC-1</b>	Iodeto de 5,5',6,6'-Tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilimidacarbocianina
<b>LAAO</b>	L-aminoácido oxidase

<b>LC3</b>	Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos
<b>LPP</b>	Leupeptin, Pepstatin e Pefabloc
<b>NCCD</b>	Nomenclature Committee on Cell Death
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OPD</b>	Ortofenilenodiamina
<b>OV</b>	Ortovanadato de sódio
<b>PBS</b>	Tampão Salino Fosfato
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>PMSF</b>	Fluoreto de Fenil Sulfonil
<b>PVDF</b>	Fluoreto de polivinilideno
<b>RFP</b>	<i>Red Fluorescet Protein</i>
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>SBD</b>	Domínio de ligação ao substrato
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SINAN</b>	Sistema de Informação dos Agravos de Notificação
<b>SVMP</b>	Metaloprotease
<b>SVSP</b>	Serino protease
<b>TBS</b>	Tampão Tris Salino
<b>TFA</b>	Ácido Trifluoracético
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral



## ***Resumo***

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 90% dos casos de envenenamento no Brasil. O veneno botrópico é uma mistura de moléculas rica em peptídeos e proteínas. Um importante componente desse veneno são as L- aminoácido oxidases (LAAOs), enzimas que exibem múltiplas atividades farmacológicas como hemorragia, edema e citotoxicidade e, conseqüentemente, contribuem para o desenvolvimento do quadro clínico do envenenamento. A caracterização de venenos animais e de seus componentes isolados, auxiliam a elucidar o mecanismo de ação envolvido e abre possibilidades para avanços no tratamento utilizado. Além disso, venenos de serpentes constituem uma rica fonte de moléculas com potencial biotecnológico que precisam ser explorados. Neste trabalho foram avaliadas as alterações causadas pelo veneno de *B. atrox* e pela LAAO purificada em queratinócitos. A purificação da LAAO foi realizada por meio de três passos cromatográficos: gel filtração, troca iônica e afinidade por heparina. A LAAO obtida apresentou 62,5kDa e se mostrou mais estável quando mantida a -80 °C. O veneno e a LAAO foram capazes de diminuir a viabilidade celular de forma concentração dependente. A dose citotóxica foi definida como 5,5 µg/mL para o veneno e 5,1 µg/mL para LAAO. Os queratinócitos tratados com LAAO sofreram autofagia (após 1,5 hora) seguida por apoptose e necrose (após 12 e 24 horas). Em relação a morfologia, o veneno de *B. atrox* induziu retração das células e das extremidades das colônias, formação de aglomerados celulares, alongamento celular e desorganização da caderina e actina. As células tratadas com LAAO apresentaram diminuição da adesão ao substrato, prolongamentos anormais da actina e desorganização da caderina e dos feixes de actina. A citotoxicidade e alterações no citoesqueleto causadas por LAAO foram mediadas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, já que a adição de catalase diminuiu os efeitos tóxicos observados. O aumento de ROS detectado após a adição de LAAO nas células corrobora com o possível envolvimento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nessas atividades. Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para o melhor entendimento da toxicidade do veneno de *B. atrox* e da LAAO, auxiliando a elucidar o mecanismo de ação durante o envenenamento.

**Palavras-chave:** L-aminoácido oxidase, veneno de serpente, *Bothrops atrox*, queratinócitos, citotoxicidade.

## ***Abstract***

*Bothrops spp.* are responsible for 90% of snakebites in Brazil. Bothropic venom is a complex mixture of molecules enriched with peptides and proteins. An important component of this venom are L-amino acid oxidases (LAAOs), enzymes that exhibit multiple pharmacological activities such as hemorrhage, edema and cytotoxicity and consequently, contribute to the development of clinical envenomation symptoms. Animal venoms and isolated components characterization contributes for elucidation of the mechanism of action and opens possibilities for treatment improvement. In addition, snake venoms are a rich source of molecules with biotechnological potential which needs to be explored. The aim of this study was to evaluate changes caused by *B. atrox* venom and LAAO in keratinocytes. LAAO purification was performed through three chromatographic steps: molecular exclusion, ion exchange and heparin affinity. Purified LAAO presented 62.5kDa and was more stable when kept at -80 °C. *B. atrox* venom and LAAO were able to decrease cell viability in a concentration-dependent manner. Cytotoxic dose was defined as 5.5 µg/mL for the venom and 5.1 µg/mL for LAAO. LAAO-treated keratinocytes underwent autophagy (after 1.5 hours) followed by apoptosis and necrosis (after 12 and 24 hours). Regarding morphology, *B. atrox* venom induced cell and colony retraction, cell clusters formation, cell elongation, cadherin and actin disruption. Cells treated with LAAO showed decreased substrate adhesion, abnormal actin extensions and disruption of cadherin and actin bundles. Cytotoxicity and cytoskeleton alterations caused by LAAO were mediated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, since the addition of catalase decreased the toxic effects observed. It was detected an increase in intracellular ROS after addition of LAAO which corroborates with the possible involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in these activities. Results obtained in this work contributes to a better understanding of *B. atrox* venom and LAAO toxicity, helping to elucidate their mechanism of action during envenoming.

**Key-words:** L-amino Acid Oxidase, snake venom, *Bothrops atrox*, keratinocytes, cytotoxicity.

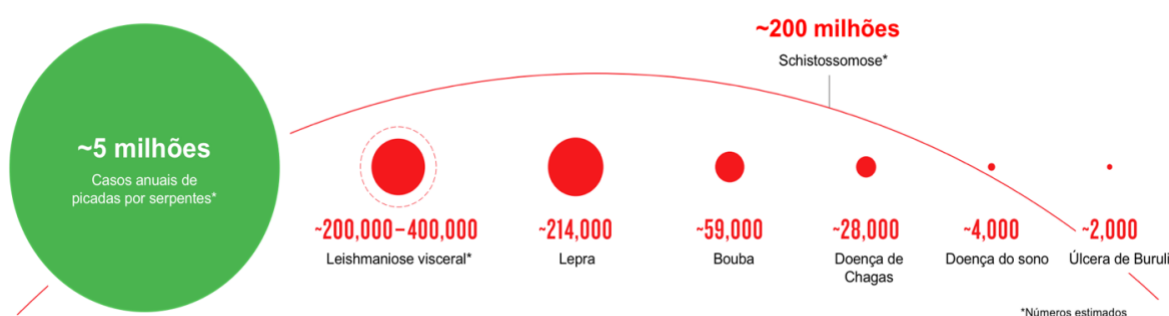
# ***INTRODUÇÃO***

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ACIDENTES OFÍDICOS

Os acidentes ofídicos apresentam alta taxa de morbidade e mortalidade, representando um grave problema de saúde pública, principalmente em países tropicais e subtropicais (Gutiérrez, Theakston e Warrell, 2006). As populações rurais são as mais afetadas, sendo o ofidismo considerado um risco ocupacional diário para essas comunidades (Harrison *et al.*, 2009). Além disso, envenenamentos causados por serpentes têm grande impacto econômico e social, uma vez que frequentemente deixam sequelas graves devido à necrose local, que pode levar à amputação de membros. Os dados de incidência precisos são raros nessas regiões, o que resulta em um número subestimado de vítimas (Espino-Solis *et al.*, 2009).

De acordo com a OMS, aproximadamente 5 milhões de pessoas são picadas por serpentes por ano em todo mundo. Sendo assim, os acidentes ofídicos afetam mais pessoas do que muitas outras doenças tropicais negligenciadas, como leishmaniose visceral, lepra, boubá, doença de Chagas, doença do sono e úlcera de Buruli (Figura 1) (Arnold, 2016). Dos 2,5 milhões de casos de envenenamento ofídico, aproximadamente 400.000 resultam em amputações e mais de 100.000 em mortes (Arnold, 2016; Brooks *et al.*, 2006; Espino-Solis *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2010).



**Figura 1: Número global de casos de doenças tropicais negligenciadas por ano.** Acidente ofídico afeta mais pessoas no mundo do que muitas outras doenças tropicais negligenciadas. Adaptado de Arnold 2016.

No Brasil, apenas no ano de 2013, 28.392 casos de envenenamentos por serpentes foram registrados pelo Ministério da Saúde, sendo que a região Norte apresentou o maior número de casos (Tabela 1).

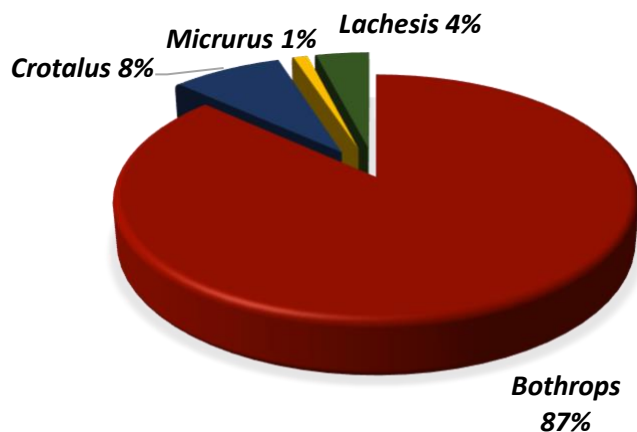
Tabela 1: Acidentes ofídicos registrados no Brasil no ano de 2013

Região	Nº casos	Óbitos	Mortalidade (%)
Norte	9703	49	0,50
Nordeste	6400	37	0,58
Centro-Oeste	2834	15	0,53
Sudeste	7122	12	0,17
Sul	2333	7	0,30
<b>Total</b>	<b>28392</b>	<b>120</b>	<b>0,42</b>

Fonte: Adaptado de SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) - atualizado em 22/06/2015.

Os casos de ofidismo com importância médica reportados no Brasil se devem, principalmente, a acidentes com serpentes do gênero *Bothrops* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis), *Lachesis* (surucucus) e *Micrurus* (corais) (Pinho e Pereira, 2001). De acordo com os dados registrados pelo Ministério da Saúde em 2013, as serpentes do gênero *Bothrops* são as principais responsáveis pelos acidentes ofídicos no Brasil, representando 87% dos casos. Os acidentes crotálicos (causados por espécies do gênero *Crotalus*), laquéuticos (causados por espécies do gênero *Lachesis*) e elapídicos (causados por espécies do gênero *Micrurus*) são menos frequentes, representando, respectivamente, 8%, 4% e, 1% dos casos (Figura 2).

Em relação as serpentes do gênero *Bothrops*, as espécies mais relevantes são *B. asper* na América Central e norte da América do Sul e *B. atrox* na região Amazônica da América do Sul (Sant Ana Malaque e Gutierrez, 2017).

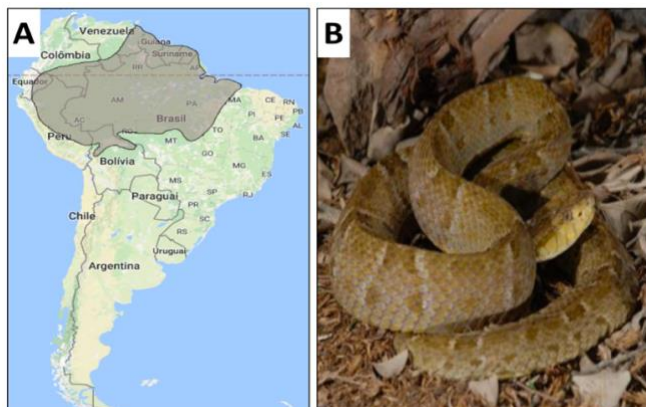


**Figura 2: Notificação de acidentes causados por serpentes peçonhentas no Brasil.** Porcentagem de acordo com casos reportados no ano de 2013. Fonte: Adaptado de SINAN – atualizado em 22/06/2015.

## 1.2 *BOTHROPS ATROX* E O ENVENENAMENTO BOTRÓPICO

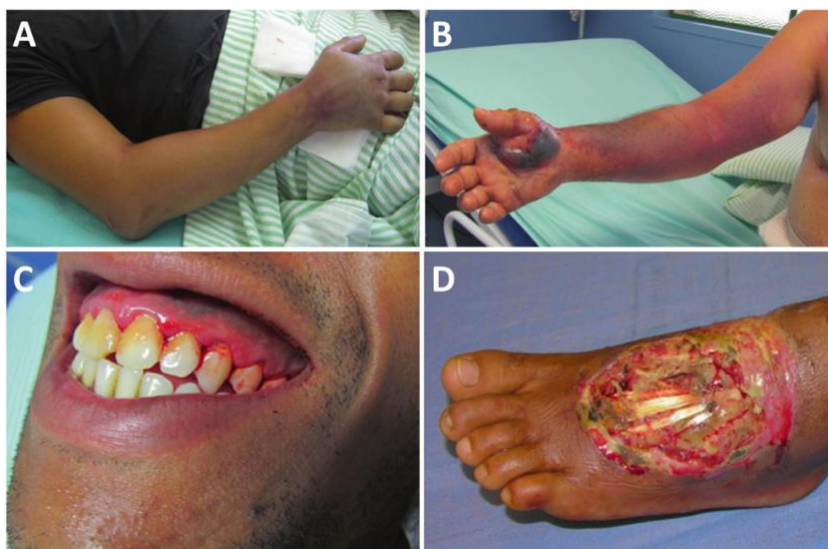
De acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde, a região Norte, onde se encontra a Amazônia brasileira, apresenta a maior incidência de ofidismo do Brasil. Nesta região, a *Bothrops atrox* é a principal espécie responsável pelos casos de envenenamento (Borges, Sadahiro e Santos, 1999; Calvete *et al.*, 2011).

A espécie *B. atrox* pertence à família Viperidae e subfamília Crotalinae. Essas serpentes apresentam hábitos terrestres e geralmente noturnos (Figura 3A). A *B. atrox* é altamente adaptável e habita florestas equatoriais de terras baixas da região Norte da América do Sul, podendo ser encontrada no leste da Venezuela, sudeste da Colômbia, leste do Equador, leste do Peru, norte da Bolívia, norte do Brasil e ao longo da Guiana, Suriname e Guiana Francesa (Calvete *et al.*, 2011; Campbell e Lamar, 2005) (Figura 3B). Apresentam cauda lisa e na fase adulta possuem de 75-125 cm de comprimento. Suas cores podem variar de acordo com a região em que vivem, mas nenhuma subespécie foi descrita (Calvete *et al.*, 2011; Pinho e Pereira, 2001).



**Figura 3: Serpente *B. atrox* e sua distribuição.** (A) Distribuição de *B. atrox* na América do Sul. Fonte: Adaptado de <http://www.toxinology.com/fusebox.cfm?fuseaction=main.snakes.display&id=SN0389> e Melgarejo 2009. (B) Foto de um espécimen de *B. atrox*. Fonte: (Kohlhoff *et al.*, 2012).

Os acidentes botrópicos são caracterizados por graves efeitos locais e sistêmicos (Figura 4). Localmente, observa-se sangramento, dor, edema, vermelhidão, contusão, bolhas hemorrágicas e, menos frequentemente, hemorragia. A necrose e a infecção bacteriana no local da picada podem levar à sequelas funcionais, que ocasionalmente resultam na amputação do membro afetado (Pardal *et al.*, 2004; Sant Ana Malaque e Gutierrez, 2017). Os efeitos sistêmicos incluem coagulopatias, falência renal aguda, cardiotoxicidade, sangramento espontâneo e equimose (Calvete *et al.*, 2011; Cintra *et al.*, 2012; Higuchi *et al.*, 2007; Pardal *et al.*, 2004; Sant Ana Malaque e Gutierrez, 2017; Williams *et al.*, 2010).



**Figura 4: Sintomas de envenenamento botrópico.** (A) Inchaço e contusão no braço direito 3 horas após a picada. (B) Bolha hemorrágica 1 dia após a picada. (C) Sangramento gengival 5 horas após a picada. (D) Necrose no pé esquerdo 15 dias após picada. Fonte: Sant Ana Malaque & Gutierrez 2016.

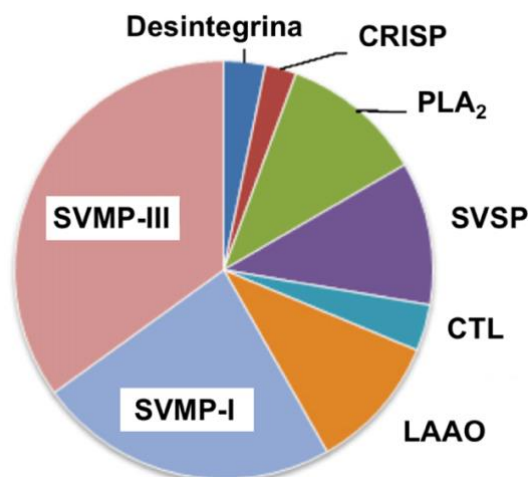
### 1.3 COMPOSIÇÃO DO VENENO BOTRÓPICO

Os venenos botrópicos consistem em uma mistura complexa de moléculas, rica em peptídeos e proteínas com diversas atividades bioquímicas e farmacológicas (Ayres *et al.*, 2015). Aproximadamente 90% do peso seco do veneno consiste em proteínas, incluindo enzimas, toxinas não enzimáticas e proteínas não tóxicas. A porção não proteica é constituída por carboidratos, lipídios, metais, amins biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres (França e Málaque, 2009; Warrell, 1989).

A composição deste veneno pode variar de forma significativa, no entanto, geralmente observa-se a presença das mesmas famílias de toxinas, variando somente nos níveis de expressão de cada grupo (Sousa *et al.*, 2013). Sabe-se que podem ocorrer variações relacionadas a filogenia (Queiroz *et al.*, 2008), idade (Guércio *et al.*, 2006; Saldarriaga *et al.*, 2003), sexo (Menezes *et al.*, 2006), alimentação (Barlow *et al.*, 2009) e distribuição geográfica (Calvete *et al.*, 2011; Núñez *et al.*, 2009; Zamunér *et al.*, 2004).

Foram descritas várias famílias de proteínas com atividades tóxicas que compõem os venenos botrópicos, como metaloproteases (*Snake Venom Metalloproteinases* - SVMPS), serinoproteases (*Snake Venom Serine Proteases* - SVSP), fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2s</sub>), hialuronidasas, L-aminoácido oxidases (LAAOs), entre diversas outras (Higuchi *et al.*, 2007; Menaldo *et al.*, 2013; Moura-da-Silva, Butera e Tanjoni, 2007; Naumann *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2013). A Figura 5 representa a composição proteica do veneno de *B. atrox* analisada por proteômica. (Kohlhoff *et al.*, 2012).





**Figura 5: Composição proteica do veneno de *B. atrox*.** Proteínas secretoras ricas em cisteínas (CRISP) representam 2,4% do veneno, Fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) representam 11%, Serino Proteases (SVSP) representam 11,1%, Metaloprotease de classe P-I (SVMP-I) representam 23,2%, Metaloprotease de classe P-III (SVMP-III) representam 35%, L- aminoácido oxidase (LAAO) representam 10,5% e Lectinas do tipo C (CTL) 3,6% do veneno. Traduzido de Kohlhoff et al. 2012.

As SVMP dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* contribuem para sua toxicidade, sendo responsáveis pela atividade hemorrágica desencadeada. Essas proteínas apresentam de 20 a 100 kDa, são dependentes de Zn<sup>2+</sup> para serem enzimaticamente ativas e podem ser divididas, de acordo com sua estrutura, em P-I, P-II e P-III (Bjarnason e Fox, 1994; Markland e Swenson, 2013). As SVMP são capazes de hidrolisar componentes da matriz extracelular (como por exemplo colágeno tipo IV, laminina e fibronectina), causando ruptura da parede capilar e conseqüente extravasamento de fluidos e componentes celulares do sangue (Baldo *et al.*, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2016).

As SVSP são proteínas extensivamente estudadas que afetam o sistema hemostático. Estas enzimas são geralmente glicoproteínas que apresentam uma tríade catalítica bem conservada formada pelos aminoácidos Histidina, Aspartato e Serina. As SVSP afetam vias da cascata de coagulação pela ativação específica de componentes envolvidos na coagulação, fibrinólise e agregação plaquetária, ou por degradação proteolítica (Braud, 2000; Serrano, 2013; Serrano e Maroun, 2005).

As fosfolipases A<sub>2</sub> constituem uma extensa família de proteínas conservadas estruturalmente, que apresentam massa molecular entre 14 e 19 kDa (Casas-Godoy, Duquesne e Bordes, 2012). Estas enzimas, na presença de cálcio, catalisam a hidrólise de fosfolipídios de membrana, especificamente na ligação 2-acil éster de fosfolipídios, levando à

formação de lisofosfolipídios e ácidos graxos livres (Chang, Musser e McGregor, 1987; Six e Dennis, 2000). As fosfolipases estão presentes no veneno de muitos animais, como abelhas, escorpiões e serpentes, sendo que a maioria delas tem ação tóxica, podendo agir de forma neurotóxica, miotóxica, cardiotoxica, anticoagulante e inflamatória (Costa *et al.*, 2008; Huang, Wang e Liu, 1993; Nicolas *et al.*, 1997; Prijatelj *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2013)

As hialuronidases formam um grupo de enzimas que catalisam a degradação do ácido hialurônico, um polissacarídeo de alta massa molecular presente na matriz extracelular e em tecidos conjuntivos. Quando presente em venenos, as hialuronidases atuam como fatores de espalhamento, facilitando a difusão dos componentes tóxicos, contribuindo não só para degradação do tecido local, como também para o envenenamento sistêmico (Fox, 2013; Pessini *et al.*, 2001).

As L- aminoácido oxidases foram o foco deste trabalho e serão descritas a seguir.

#### 1.4 L- AMINOÁCIDO OXIDASES (LAAOS)

As L- aminoácido oxidases são flavoenzimas que catalisam a deaminação oxidativa estereoespecífica de um substrato L-aminoácido levando à produção do  $\alpha$ -cetoácido correspondente, com concomitante liberação de amônia e peróxido de hidrogênio (Figura 6) (Du e Clemetson, 2002). Essas enzimas normalmente apresentam maior afinidade por aminoácidos aromáticos (como fenilalanina, triptofano e tirosina) ou alifáticos de cadeia longa, (como a leucina) (Izidoro *et al.*, 2014). As LAAOs podem ser encontradas em diversos organismos, vertebrados e invertebrados, como bactérias, peixes, fungos e venenos de serpentes (Geueke e Hummel, 2002; Li e Li, 2014; Naumann *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011).

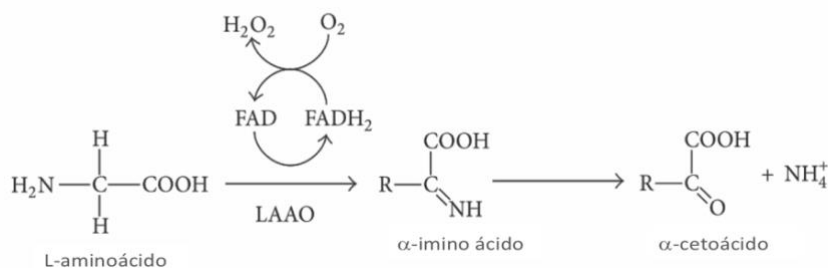
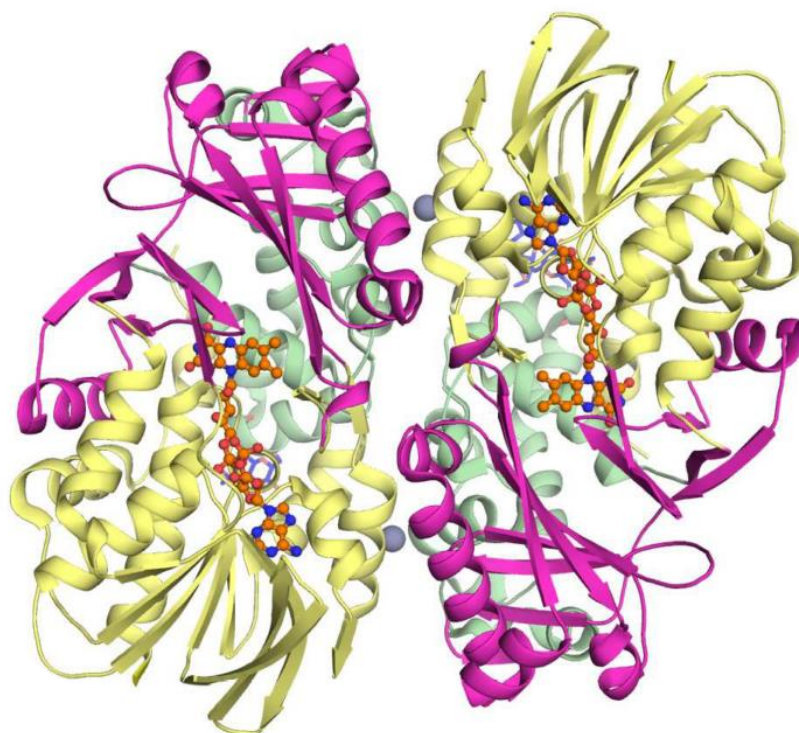


Figura 6: Reação catalisada pela enzima L- aminoácido oxidase. Fonte: Izidoro et al. 2014.

As LAAOs são glicoproteínas, geralmente homodiméricas, com subunidades de 50-70 kDa. As subunidades da enzima interagem de maneira não covalente. Dessa forma, quando analisada em condição natural, não redutora, a LAAO apresenta massa molecular de aproximadamente 110-150 kDa (Du e Clemetson, 2002; Izidoro *et al.*, 2014). No entanto, alguns trabalhos descrevem formas monoméricas da proteína (Naumann *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2009). Os venenos ofídicos podem apresentar diferentes isoformas da enzima, como no caso de *B. alternatus* (Stábeli *et al.*, 2004) e *B. jararaca* (Ciscotto *et al.*, 2009). Este fato pode ser resultado de glicosilações diferenciadas ou da síntese da proteína a partir de genes distintos, dando origem a isoformas (Guo *et al.*, 2012).

Essas enzimas apresentam FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo) ou FMN (Flavina Mononucleotídeo) como cofatores, os quais são responsáveis pela coloração amarelada observada em venenos ricos em LAAO (Guo *et al.*, 2012; Izidoro *et al.*, 2014). A estrutura da LAAO é dividida em três domínios distintos: um domínio de ligação ao FAD, um domínio de ligação ao substrato e um domínio helicoidal (Figura 7)(Feliciano *et al.*, 2017).



**Figura 7: Estrutura cristalográfica do dímero funcional da LAAO de *B. atrox*.** Estrutura apresenta 3 domínios: um domínio de ligação ao FAD (amarelo), um domínio de ligação ao substrato (magenta) e um domínio helicoidal (verde). O cofator FAD está representado em laranja e o íon de zinco em cinza. Fonte: Feliciano, 2017.

A quantidade de LAAO encontrada em venenos ofídicos pode variar significativamente, tanto de maneira interespecífica quanto intraespecífica, sendo que foram relatados valores extremos como 0,15% no veneno de *Naja naja oxiana* e 25% no veneno de *Bungarus caeruleus* (Izidoro *et al.*, 2014; More *et al.*, 2010; Samel *et al.*, 2008). As LAAOs de venenos são termo-lábeis e sua estabilidade é variável. No entanto, geralmente a atividade pode ser recuperada com incubação à 37 °C em pH próximo de 5,0 (Guo *et al.*, 2012).

As LAAOs de venenos de serpentes podem apresentar atividade inflamatória, hemolítica, hemorrágica, miotóxica, antiviral, anti parasitária e outras que serão discutidas a seguir (Ciscotto *et al.*, 2009; Stábeli *et al.*, 2004, 2007, Wei *et al.*, 2009, 2007).

A amônia e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, principais subprodutos da catálise realizada pelas LAAOs, são moléculas que possuem grande relevância em processos fisiológicos. O peróxido de hidrogênio é considerado espécie reativa de oxigênio (ROS), juntamente com ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e radical hidroxila (OH<sup>·</sup>) (Reczek e Chandel, 2015). Acredita-se que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seja a principal ROS envolvida na sinalização intracelular, podendo agir como segundo mensageiro. O fato do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentar meia vida longa e se difundir facilmente através de membranas facilita sua atuação como molécula sinalizadora e representa uma vantagem em relação às outras ROS (Bigarella, Liang e Ghaffari, 2014; Holmström e Finkel, 2014).

As LAAOs de venenos ofídicos apresentam efeitos relevantes, porém controversos, na agregação plaquetária (Guo *et al.*, 2012). Essas enzimas podem levar a indução da agregação plaquetária, como é o caso da LAAO de *B. atrox* (Alves *et al.*, 2008), *B. moojeni* (Stábeli *et al.*, 2007), *B. pauloensis* (Rodrigues *et al.*, 2009) e *Crotalus durissus cascavella* (Toyama *et al.*, 2006). Entretanto, foi observado que LAAO de serpentes como *Naja oxiana* (Samel *et al.*, 2008), *Vipera berus berus* (Samel *et al.*, 2006) e *Vipera lebetina* (Tõnismägi *et al.*, 2006) são capazes de inibir a agregação plaquetária. De maneira geral, essas atividades podem ser reduzidas ou até mesmo completamente inibidas por catalase, enzima capaz de decompor o peróxido de hidrogênio. Dessa forma, infere-se que o peróxido de hidrogênio desempenha um importante papel na função de LAAOs na agregação plaquetária (Du e Clemetson, 2002).

A ação anti-microbiana foi observada em LAAOs de serpentes, como *B. pirajai* (Izidoro *et al.*, 2006), *B. alternatus* (Stábeli *et al.*, 2004), *B. jararaca* (Ciscotto *et al.*, 2009) e diversas outras. O envolvimento do peróxido de hidrogênio nessa atividade é evidenciado pela abolição da atividade anti-microbiana em presença de catalase. A atividade descrita acima

parece não causar resistência microbiana, o que faz dessa enzima um agente com potencial para ser explorado pela indústria farmacêutica. Acredita-se que LAAO seja importante na prevenção da decomposição bacteriana da presa durante sua digestão pela serpente (Guo *et al.*, 2012).

A citotoxicidade de LAAOs de diferentes serpentes foi descrita para uma variedade de linhagens celulares. Entre as LAAOs citotóxicas estão as de *Vipera berus berus* para células HeLa (câncer cervical) (Samel *et al.*, 2006); de *B. pirajai* para células S180 (sarcoma) e Jurkat (leucemia aguda de célula T) (Izidoro *et al.*, 2006); de *B. atrox* para células HL-60 (leucemia promielocítica), Jurkat, B16F10 (melanoma) e PC12 (feocromocitoma) (Alves *et al.*, 2008) e de *B. leucurus* para células MKN-45 (câncer estomacal), HUTU (adenocarcinoma), RKO (colorectal) e LL24 (fibroblastos) (Naumann *et al.*, 2011).

O peróxido de hidrogênio desempenha um papel importante na morte celular desencadeada pela LAAO, uma vez que é altamente tóxico para células e pode atuar em ácidos nucleicos, proteínas e membrana plasmática. Além disso, foi observado que a atividade citotóxica pode ser inibida em presença de catalase, o que mais uma vez sugere o envolvimento do  $H_2O_2$  nesta atividade (Nascimento *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2016; Tavares *et al.*, 2016). Acredita-se que a LAAO seja capaz de se ligar diretamente à membrana celular, possibilitando o acúmulo e concentração de  $H_2O_2$  no local o que leva ao stress oxidativo da membrana e apoptose (Ande *et al.*, 2006). Entretanto, alguns trabalhos relatam diferenças entre as alterações induzidas por LAAO das desencadeadas por  $H_2O_2$  exógeno, sugerindo que outro fator, além do  $H_2O_2$  produzido na reação de oxidação por LAAO, deve estar envolvido na apoptose causada por LAAO (Guo *et al.*, 2015; Kanzawa *et al.*, 2004).

Pouco se sabe sobre o efeito de LAAOs na estrutura de células normais. A fim de entender como o veneno e a LAAO purificada agem quando em contato com as células epiteliais humanas, resolveu-se a avaliar os efeitos dessas amostras na viabilidade e estrutura celular de queratinócitos de cultura primária. Este conhecimento pode ajudar a elucidar os mecanismos de ação do veneno e dessa forma possibilitar progressos no combate dos efeitos locais causados pela peçonha.

## 1.5 SOROTERAPIA

A administração intravenosa de antivenenos é o tratamento específico para combater envenenamentos ofídicos, sendo o único método validado cientificamente até o momento. Os antivenenos são produzidos através da hiperimunização de animais de grande porte, geralmente cavalos, com venenos de uma só espécie (monoespecífico) ou de várias espécies (poliespecífico) de animais peçonhentos (Gutiérrez *et al.*, 2014). A segurança da utilização de antivenenos é uma constante preocupação, uma vez que sua administração pode ocasionar efeitos adversos (Gutiérrez, Theakston e Warrell, 2006).

No caso dos antivenenos poliespecíficos, a seleção dos venenos que irão compor o *pool* antigênico utilizado na imunização é um ponto chave para sua eficácia, tendo em vista a variação na composição dos venenos ofídicos (Gutiérrez, Theakston e Warrell, 2006; Núñez *et al.*, 2009). No Brasil, a mistura de venenos utilizada para a produção do soro antibotrópico é composta por 50% de veneno de *B. jararaca*, 12,5% de *B. neuwiedi*, 12,5% de *B. alternatus*, 12,5% de *B. moojeni* e 12,5% de *B. jararacussu* (Sousa *et al.*, 2013). Apesar da elevada importância médica de *B. atrox* na região amazônica, nota-se que este veneno não está incluído no *pool* antigênico. Este fato se deve, principalmente, à ampla distribuição geográfica da espécie, a qual aumenta a variação da composição do veneno, dificultando a obtenção de uma mistura padrão (Calvete *et al.*, 2011).

Sabe-se que os antivenenos têm grande eficácia para combater a mortalidade das vítimas, pois são capazes de neutralizar as toxinas responsáveis pelos efeitos sistêmicos. No entanto, devido a evolução rápida da patologia, a soroterapia não é capaz de reverter o dano tecidual e outros efeitos locais ocasionados pelo envenenamento (Gutiérrez *et al.*, 1998; Gutiérrez, Theakston e Warrell, 2006; Zamunér *et al.*, 2004). Além disso, o antiveneno pode não conter anticorpos específicos para toxinas relevantes do veneno, o que também interfere na eficácia do antídoto (Espino-Solis *et al.*, 2009).

A produção de antivenenos enfrenta uma questão ética, uma vez que os animais sofrem durante o processo de imunização com os venenos e com os testes para determinar a eficácia dos antivenenos. Além disso, existem problemas econômicos, devido ao alto custo de manutenção dos animais envolvidos, como as serpentes das quais o veneno é retirado, os animais de grande porte que recebem as doses do imunógeno e os animais nos quais a eficiência dos antivenenos é testada. O alto custo de produção reflete no elevado preço das

ampolas de antiveneno, que muitas vezes são escassas, gerando uma crise na saúde pública. Este cenário ficou ainda mais agravado com o recente anúncio da suspensão da produção e distribuição do antiveneno FAV-Afrique, usado no tratamento de picadas de serpentes na África. Estima-se que a falta do antiveneno possa causar 10.000 mortes a mais na África por ano (HAMZA et al.; ARNOLD, 2016).

Neste sentido, existe uma necessidade clínica de tratamentos alternativos capazes de conter as lesões causadas pelo envenenamento. O estudo e entendimento dos mecanismos de ação do veneno e de suas toxinas, foco deste trabalho, é fundamental para identificação de moléculas que possam ser utilizadas para amenizar e neutralizar os efeitos locais do envenenamento.

## 1.6 VENENOS E BIOTECNOLOGIA

Os animais venenosos sempre foram conhecidos pela letalidade e problemas clínicos causados pela inoculação de seus venenos. Entretanto, sabe-se que muitas das toxinas produzidas por estes organismos podem ser utilizadas tanto como ferramentas para investigar mecanismos fisiológicos quanto como objeto de estudo para o desenvolvimento de fármacos (Rates *et al.*, 2011).

Os venenos de serpentes apresentam um enorme número de moléculas que possuem afinidade específica para células e componentes celulares. Além disso, essas moléculas podem apresentar diversas ações terapêuticas. Os componentes isolados de venenos ofídicos podem ser utilizados em tratamento de câncer, trombose, dor, doenças cardiovasculares, entre outras (Harvey, 2014; Koh e Kini, 2012; Lewis e Garcia, 2003; Shanbhag, 2015).

Um dos maiores sucessos do uso de componentes de veneno para desenvolvimento de fármacos foi o Captopril. Este medicamento foi baseado em peptídeos potenciadores de bradicinina do veneno de *B. jararaca* que são capazes de inibir a enzima conversora de angiotensina. A inibição dessa enzima ocasiona diminuição da pressão sanguínea o que possibilita o uso do medicamento para tratamento de hipertensão (Ferreira e Rocha e Silva, 1965; Harvey, 2014).

O Ancrod, do veneno de *Agkistrodon rhodostoma* e batroxobin, do veneno de *Bothrops atrox* são capazes de clivar o fibrinogênio sanguíneo reduzindo a concentração de

fibrinogênio no plasma e a viscosidade e coaguabilidade sanguínea. A Batroxobin é usada clinicamente em desordens isquêmicas e, quando administrada nos estágios iniciais, pode reduzir déficit neurológico causado por acidente vascular cerebral (Lewis e Garcia, 2003; Serrano, 2013).

Os venenos de serpentes e seus componentes apresentam alta citotoxicidade, sendo que muitas vezes essa toxicidade é maior para células tumorais do que para células normais. Tal característica torna interessante o estudo dessas moléculas para o desenvolvimento de drogas anti-tumorais. Foi identificado potencial antitumoral em diversas proteínas de venenos, como metaloproteases, desintegrinas, L-aminoácido oxidases, lecitinas do tipo C e fosfolipases A<sub>2</sub> (Calderon *et al.*, 2014; Shanbhag, 2015).

Além disso, componentes de venenos também são utilizados na indústria cosmética. Um exemplo é o creme Syn-Ake. O desenvolvimento desse cosmético foi baseado em peptídeos presentes no veneno de serpentes do gênero *Tropidolaemus* e é capaz de bloquear a transmissão de sinais e relaxar a área em que é aplicado, reduzindo assim o aparecimento de rugas de expressão (Debono *et al.*, 2017).

O avanço da tecnologia tem possibilitado um estudo detalhado de venenos e de suas atividades. Diante da existência de tantas moléculas com propriedades que podem ser aplicadas no desenvolvimento de fármacos fica evidente a importância de se estudar e caracterizar os diversos venenos existentes, assim como seus componentes purificados.

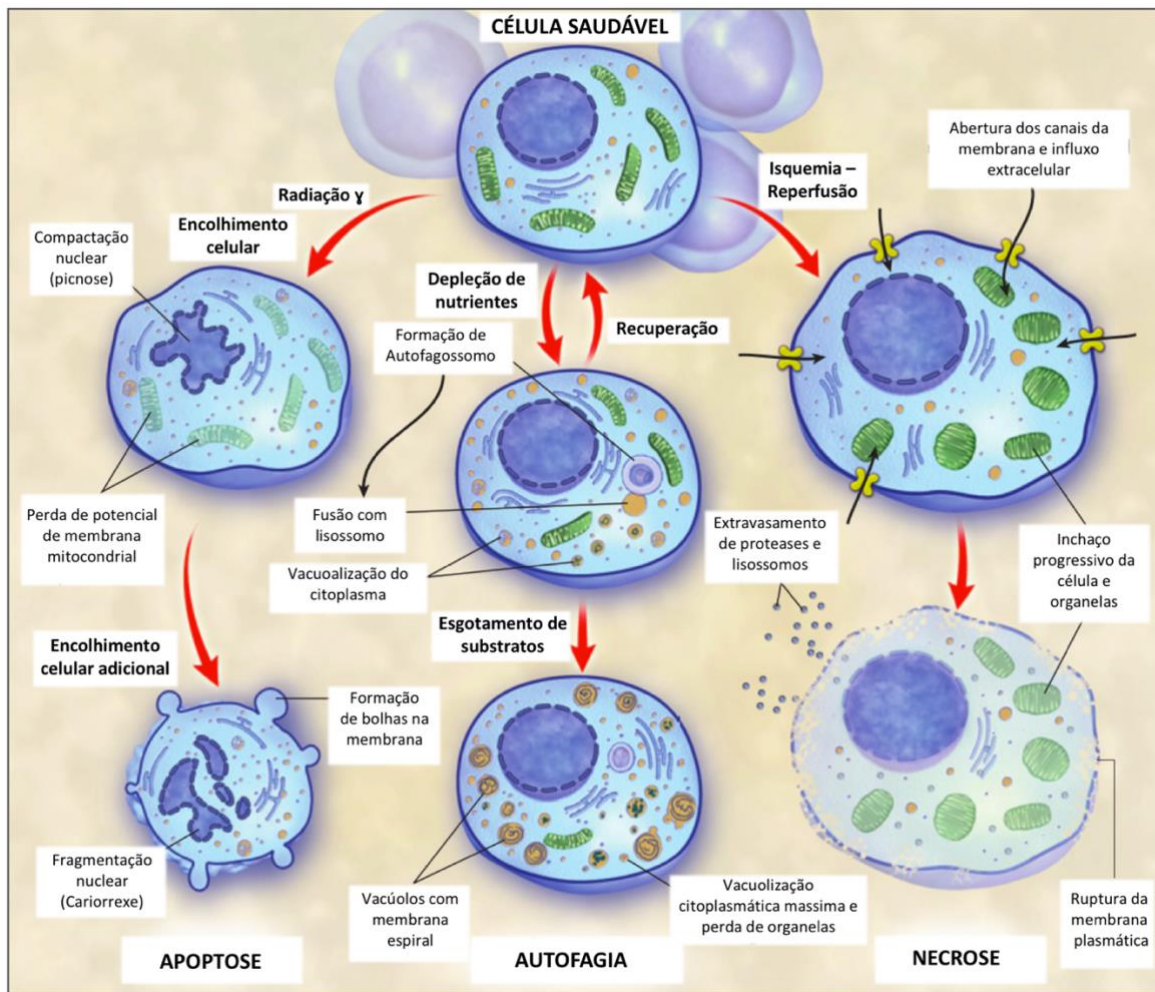
## 1.7 MORTE CELULAR

De acordo com Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (*Nomenclature Committee on Cell Death - NCCD*), uma célula deve ser considerada morta se apresentar qualquer das seguintes características: (1) perda da integridade da membrana plasmática, (2) fragmentação celular e nuclear completa, (3) englobamento do “corpo” ou fragmentos por outra célula *in vivo* (Kroemer *et al.*, 2009).

A morte celular pode ser classificada considerando diferentes características como aparência morfológica, critérios enzimológicos, aspectos funcionais ou características imunológicas, entretanto, é importante ressaltar que existe intercomunicação entre as vias



de morte celular (Kroemer *et al.*, 2009). Neste trabalho serão avaliadas três vias de morte celular: apoptose, necrose e autofagia (Figura 8).



**Figura 8: Três vias de morte celular.** Características das principais vias de morte celular: apoptose, autofagia e necrose. Fonte: Traduzido de Hotchkiss *et al.* (2009).

A apoptose é caracterizada por alterações morfológicas como: condensação da cromatina, encolhimento e fragmentação nuclear e formação de “bolhas” na membrana plasmática. Na apoptose, a integridade da membrana plasmática persiste até tardiamente no processo (Hotchkiss *et al.*, 2009).

Existem duas vias apoptóticas principais: (1) via extrínseca ou de receptor de morte e (2) via intrínseca ou mitocondrial, sendo que todas as vias convergem em uma via de execução.

A ativação da via extrínseca ocorre quando membros da superfamília de Fatores de Necrose Tumoral (TNF) se ligam aos “receptores de morte”, iniciando a formação de um

complexo de sinalização indutora de morte, que culmina na atividade catalítica de caspase-8, mediador de apoptose (Elmore, 2007; Hotchkiss *et al.*, 2009).

A via intrínseca é desencadeada por estímulos não mediados por receptores, como aumento de espécies reativas de oxigênio, dano no DNA, privação de fatores de crescimento, entre outros. Esses estímulos iniciadores acarretam aumento da permeabilidade mitocondrial, perda do potencial de membrana mitocondrial e liberação de proteínas pro-apoptóticas, como citocromo-C, para o citosol, causando ativação de caspase-9 (Elmore, 2007; Hotchkiss *et al.*, 2009).

As vias extrínseca e intrínseca desencadeiam a fase de execução, fase final da apoptose. A caspase-8 ativada pela via extrínseca e caspase-9 ativada pela via intrínseca induzem destruição celular por causarem mobilização de caspase 3, 6 e 7, consideradas caspases efetoras. As caspases 3, 6 e 7, por sua vez, ativam endonucleases responsáveis por degradar proteínas nucleares e do citoesqueleto levando à destruição celular (Elmore, 2007; Hotchkiss *et al.*, 2009).

A morte celular por necrose é caracterizada pelo aumento no volume celular e pelo inchaço das organelas que resultam na ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo interno (Galluzzi, Blomgren e Kroemer, 2009; Kroemer *et al.*, 2009). O comprometimento de membranas de organelas ocasiona liberação de enzimas proteolíticas, antes aprisionadas nos lisossomos, para o citosol, com consequente destruição celular (Hotchkiss *et al.*, 2009). Nesta via de morte, o conteúdo da célula morta é liberado, causando reações imunes no organismo (Sun e Wang, 2014).

A autofagia controla a degradação e reciclagem de proteínas e organelas, sendo uma via importante para sobrevivência celular, desenvolvimento e homeostase. A via autofágica também desempenha papel essencial na resposta adaptativa para fornecer nutrientes e energia, de forma a auxiliar na sobrevivência celular na presença de *stress*, como ausência de nutrientes (Zhifen *et al.*, 2013). Durante o processo de autofagia, ocorre sequestro de constituintes citoplasmáticos, incluindo organelas, dentro de vesículas de membrana dupla (autofagossomos), que posteriormente se fundem com lisossomos para formar autolisossomos, dentro dos quais ocorre a degradação dos componentes alvo (Mariño *et al.*, 2014).

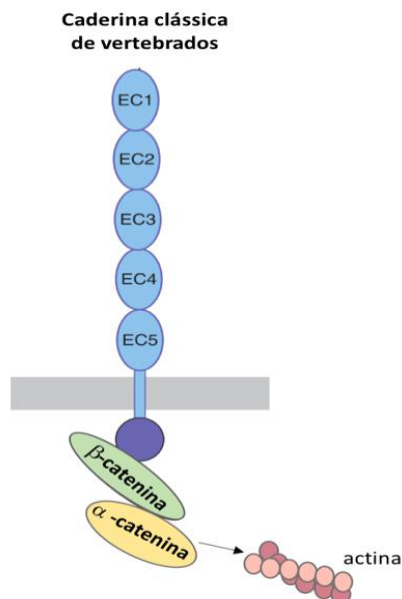
Apesar das vias de morte celular apresentarem características distintas, observa-se a existência de diferentes graus de interação entre elas. Uma prova disso é o fato de que o bloqueio de determinada via pode acarretar ativação de outra, ao invés de prevenir a morte celular. Por exemplo, a inibição de apoptose pode desencadear morte por necrose e a autofagia pode auxiliar na sobrevivência celular em casos de superexpressão de proteínas anti-apoptóticas (Hotchkiss *et al.*, 2009).

## 1.8 EPITÉLIO E JUNÇÕES ADERENTES

O epitélio forma a epiderme e é um dos tecidos afetados pela necrose extensa desencadeada pelo envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*.

A epiderme é constituída por epitélio escamoso estratificado formado, principalmente, por queratinócitos (células epiteliais) (Morasso e Tomic-Canic, 2005). O epitélio, tecido que separa o interior do exterior, desempenha importante papel na absorção e secreção e além disso, forma barreira mecânica de proteção contra perda de água, danos por patógenos e stress físico e químico (Powell, 1981). A organização epitelial depende de algumas características fundamentais, como a adesão intercelular para formação de estrutura super-celular e polaridade apical-basal para possibilitar distinção entre superfície interna e externa (McCaffrey e Macara, 2011).

A adesão intercelular de queratinócitos é mediada pelas junções aderentes e moléculas de adesão. A junção aderente é formada pela interação homofílica entre domínios extracelulares de caderinas clássicas (no caso do tecido epitelial, a E-caderina) de células vizinhas (Papusheva e Heisenberg, 2010). A E-caderina é uma glicoproteína transmembrana (~120 kDa) com três domínios: domínio intracelular, domínio transmembrana e domínio extracelular (Figura 9). A porção extracelular apresenta cinco repetições de aproximadamente 110 aminoácidos e está envolvida na interação homofílica com E-caderina de células adjacentes. O domínio intracelular se associa à proteínas citoplasmáticas como  $\alpha$  e  $\beta$ -cateninas, que por sua vez mediam a interação de E-caderina com o citoesqueleto de actina e miosina (Coopman e Djiane, 2016; Gooding, Yap e Ikura, 2004).



**Figura 9: Estrutura da caderina clássica de vertebrados.** Caderina clássica apresenta domínio extracelular com cinco repetições em tandem do domínio extracelular de caderina (EC), uma região transmembrana e um domínio citoplasmático se associa à com  $\alpha$  e  $\beta$ -cateninas. As cateninas, por sua vez, são responsáveis pela interação com actina. Fonte: Adaptado de Shapiro & Weis 2009.

A manutenção da estrutura e coesão do tecido epitelial é de extrema importância para desempenho de suas funções. Este tecido sofre necrose extensiva no local da picada botrópica resultando em feridas crônicas. Neste trabalho estudamos os efeitos citotóxicos do veneno e da LAAO de *B. atrox* em queratinócitos de cultura primária, a fim de melhor entender os mecanismos responsáveis pela lesão local causada pelo envenenamento.

# ***OBJETIVOS***

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do veneno de *B. atrox* e da toxina purificada L-aminoácido oxidase em queratinócitos humanos *in vitro*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar a LAAO do veneno de *B. atrox*;
- Caracterizar a LAAO quanto sua pureza, massa molecular e estabilidade;
- Verificar a citotoxicidade do veneno de *B. atrox* e da LAAO purificada e determinar a DC<sub>50</sub>;
- Avaliar alterações no citoesqueleto de células tratadas com veneno ou LAAO;
- Verificar a influência de espécies reativas de oxigênio na citotoxicidade de LAAO e do veneno e nas alterações do citoesqueleto causadas por LAAO;
- Avaliar os níveis de espécies reativas de oxigênio e de oxidação de proteínas em células tratadas com LAAO;
- Avaliar os níveis de E-caderina, F-actina  $\alpha$  e  $\beta$ -cateninas em queratinócitos tratados com veneno ou LAAO;
- Verificar alterações na adesão célula-substrato (fibronectina, colágeno I e colágeno IV) em queratinócitos tratados com veneno ou LAAO;
- Verificar indução de morte celular por apoptose, necrose e autofagia após tratamento com veneno ou LAAO;
- Verificar a internalização de LAAO pelos queratinócitos após marcação da proteína com fluoróforo

# ***MATERIAL E MÉTODOS***

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 OBTENÇÃO DO VENENO**

O veneno de *Bothrops atrox* foi gentilmente cedido pelo *Instituto Nacional de Salud* (INS) de Lima, Peru e estocado à temperatura de -80°C até o uso.

#### **3.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS**

A concentração de proteínas das amostras foi estimada pelo método de Lowry (1951) (DC™ *Protein Assay* – Bio-Rad) ou por *BCA Protein Assay Kit* (Pierce 23227) usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

#### **3.3 PURIFICAÇÃO DA LAAO DO VENENO DE *B. ATROX***

A L-aminoácido oxidase foi escolhida como alvo da purificação, devido à sua descrição citotóxica para diversas linhagens celulares.

##### **3.3.1 CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO EM SEPHACRYL S-200**

O veneno da serpente *B. atrox* foi inicialmente fracionado por cromatografia de gel filtração. O veneno liofilizado ( $\cong$  2 g) foi dissolvido em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 7,5) contendo 0,3 M de NaCl e 0,02% de azida sódica e centrifugado a 300 rpm por 15 min a 4 °C para remover material insolúvel. A solução foi então aplicada em duas colunas em série (2,5 x 100 cm) Sephacryl S-200. As colunas foram equilibradas e eluídas com o mesmo tampão descrito acima. O fluxo foi de 7mL/hora e frações de 4,5mL foram coletadas a 4 °C e monitoradas por espectrofotometria a 280nm. O conteúdo das frações foi avaliado por SDS-PAGE. A cromatografia foi repetida até fracionar um total de 8,15 g de veneno.

##### **3.3.2 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM DEAE SEPHAROSE CL 6B**

Após a primeira separação cromatográfica, a fração que apresentou a atividade de L-aminoácido oxidase foi concentrada em tubo Vivaspin de 10 kDa (Sartorius) e submetida a



purificações subsequentes. O material ( $\cong 150\text{mg}$ ) foi aplicado em coluna de troca iônica em DEAE Sepharose CL 6B (1,5 x 20 cm) equilibrada com Tampão Tris 50mM pH 8,5. As proteínas foram eluídas com gradiente linear de 0-0,3 M de NaCl, no mesmo tampão, a um fluxo de 12 mL/hora. Frações de 4 mL foram coletas e monitoradas por espectrofotometria a 280 nm e SDS-PAGE foi realizado para avaliar o perfil proteico. O processo foi repetido até fracionar um total de 0,98 g da fração de interesse.

### **3.3.3 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM COLUNA HiTRAP HEPARIN HP**

A fração proveniente da cromatografia de troca iônica com atividade LAAO foi selecionada e concentrada em tubo Vivaspín de 10 kDa (Sartorius). A fim de separar LAAO de demais contaminantes, a fração ( $\cong 8,5\text{ mg}$ ) foi aplicada em coluna de afinidade HiTrap Heparin Hp (1,6 x 2,5 cm) (GE Healthcare Life Sciences). A coluna foi previamente equilibrada em Tampão Tris 1mM pH 6,0 contendo benzamidina 1 mM e as proteínas foram eluídas por meio de gradiente linear de 0-1M de NaCl. Foram coletadas frações de 1 mL a um fluxo de 1 mL/minuto. A cromatografia foi realizada em HPLC Shimadzu e as frações foram monitoradas por espectrometria a 280 nm. O processo foi repetido até fracionar um total de 0,73 g. A pureza da LAAO foi verificada por SDS-PAGE.

## **3.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO SDS (SDS-PAGE)**

A eletroforese do veneno, frações purificadas, LAAO e lisados celulares foi realizada em gel de poliacrilamida, 12%, em presença de dodecilsulfato de sódio (SDS). Tampão de amostra 2X (5x concentrado: 0,2mM Tris-HCl pH 6,8, 50% glicerol, 5% SDS, 0,25M dithiothreitol (DTT), 250 mg azul de bromofenol) foi adicionado às amostras que, em seguida, foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos. A eletroforese foi realizada segundo o método de Laemmli (Laemmli, 1970).

Para eletroforese bidimensional, uma IPG strip de 7 cm com pH de 4-7 (GE Healthcare) foi reidratada com 30  $\mu\text{g}$  de LAAO diluída em 125  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 0,5% de tampão IPG pH 4-7, 50 mM DTT, 1% de inibidor de protease e solução de reidratação (7 M uréia, 2M thiouréia, 2% CHAPS, 0,5% IPG Buffer, 0,002% azul de bromofenol). A focalização isoeletrica

(primeira dimensão) foi realizada em Ettan TM IPGphor TM 3 (GE Healthcare) como descrito pelo produtor. A strip foi isofocalizada utilizando um programa de 5 passos: 100V por 1h, 300V até atingir 200V/h, 1000V até atingir 300V/h, 5000V até atingir 4000V/h, 5000V até atingir 1250V/h. Antes da segunda dimensão a proteína foi reduzida e alquilada utilizando uma solução de equilíbrio (0,04M Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS; 30% glicerol) contendo 4mg/mL de DTT e em seguida 40mg/mL de iodoacetamida. A segunda dimensão foi então realizada em SDS-PAGE (12%). Para visualização das bandas ou spots, os géis foram corados com Coomassie Blue.

### **3.5 ATIVAÇÃO DA L- AMINOÁCIDO OXIDASE**

Sabe-se que as LAAOs são enzimas termo lábeis e que sua atividade catalítica pode ser recuperada após tratamento com tampão pH 5,0 a 37 °C (Guo *et al.*, 2012). Para garantir que a enzima estivesse sempre na sua forma mais ativa, LAAO foi incubada com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 a 37 °C por 30 minutos antes de seu uso.

### **3.6 ATIVIDADE DE L- AMINOÁCIDO OXIDASE**

O ensaio para determinar a atividade de LAAO das amostras foi realizado em microplacas de 96 poços (Corning), conforme descrito por Bregge-Silva (2012), com algumas modificações. Dois microgramas de amostra foram incubados com 100 µL de uma solução Tris-HCl 100mM pH 8,5 contendo 5mM de L-leucina (como substrato), peroxidase 5 IU/mL, 2 mM de ortofenilenodiamina (OPD) (substrato para peroxidase). A placa foi incubada por 1 hora a 37 °C e então a reação foi parada pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. A absorbância foi determinada a 490nm por leitor de microplacas Bio-Rad modelo 680. A atividade específica foi expressa como  $\Delta A_{492nm}/min$  relativa a concentração de proteínas (mg).

### **3.7 CULTURA CELULAR**

Os fibroblastos (J2 3T3) provenientes de camundongos foram mantidos em placas de 100x20 mm (Corning), em meio Dulbecco (DMEM – Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro de bezerro doador (*Donor calf serum* - Sera Laboratories International Ltd, West

Sussex, Reino Unido) e 5 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich). Quando confluentes, os fibroblastos foram tratados com 4 µg/mL de mitomicina-C (Sigma-Aldrich) por duas horas e, em seguida, foram tripsinizados e plaqueados juntamente com queratinócitos, servindo como camada alimentadora.

Os queratinócitos derivados de prepúcio neonatal (passagens 3-6) foram cultivados em placas de 60 x 15 mm (Nunc) e mantidos em meio FAD (DMEM:F12, BioWittaker, Lonza, Alemanha), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sera Laboratories International Ltd, West Sussex, Reino Unido), 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM de glutamina, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de espectromicina, 5 µg/mL de insulina, 10 ng/mL de fator de crescimento epidermal, 0,5 µg/mL de hidrocortisona (todos adquiridos de Sigma-Aldrich) e 0,1 nM de toxina de cólera (Quadrantech Diagnostics Ltd, Surrey, Reino Unido) a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> (Rheinwald and Green, 1975).

### **3.8 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR**

O ensaio de viabilidade celular foi desenvolvido utilizando Alamar Blue (um indicador de oxidação/redução). Este reagente é permeável a membrana celular, não-tóxico e pode ser reduzido por NADPH, FMNH, NADH e citocromos. Quando Alamar Blue recebe elétrons, ele passa de um estado oxidado, azul e não fluorescente, para um estado reduzido, rosa e fluorescente (Rampersad, 2012). Sendo assim, a citotoxicidade das amostras em queratinócitos de cultura primária foi avaliada utilizando o reagente Alamar Blue (Invitrogen), segundo a metodologia descrita por Damico e colaboradores (Damico *et al.*, 2007), com modificações.

Os queratinócitos foram plaqueados em microplaca de 96 poços (Corning) (2,2-3,2x10<sup>3</sup>/poço) em meio FAD completo (como descrito no item 3.8). Assim que as células atingiram 60-80% de confluência foram lavadas com Versene (0,53mM EDTA em PBS) e foi adicionado meio FAD contendo 1% de SFB. As células foram incubadas por 6 horas na estufa e em seguida as amostras foram adicionadas em meio FAD contendo 1% de SFB. Após 24 horas de incubação, foi adicionado Alamar Blue (10%, diluído em DMEM sem vermelho de fenol e contendo 1% de SFB) e a placa foi incubada por 3 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> no escuro. Foram coletados 100 µL de cada poço, transferidos para microplaca de 96 poços (Sterilin) e a leitura

dos valores de fluorescência foi realizada a 560 nm (excitação) e 590 nm (emissão) em fluorímetro POLARstar Galaxy utilizando o software FLUOstar Galaxy.

A porcentagem da viabilidade celular foi calculada considerando o controle não tratado como 100% viável. Foi feito também um controle negativo (sem células) e o valor de sua absorbância foi subtraído do valor da absorbância de todas as amostras e do controle não tratado. O cálculo foi feito de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{\text{FI590 Amostra}}{\text{FI590 Controle não tratado}} \times 100$$

A dose citotóxica (DC<sub>50</sub>), concentração efetiva capaz de reduzir a viabilidade celular em 50%, foi determinada a partir de curva de concentração-resposta, utilizando o *software* GraphPad Prism 5. Para o cálculo da DC<sub>50</sub> foram feitas diluições em série do veneno de *B. atrox* e da LAAO purificada (40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25 e 0,625 µg/mL).

### 3.9 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> NA CITOTOXICIDADE DO VENENO E DA LAAO

Para verificar a influência do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na ação citotóxica, foi utilizada a enzima catalase (Sigma - C1345) diluída em tampão fosfato de potássio 50mM pH 7. Para determinação da concentração de catalase a ser usada, LAAO (20 µg/mL) foi adicionada juntamente a diferentes concentrações de catalase (0, 50, 100 e 200 µg/mL) e incubadas com as células por 24 horas. Após definir a melhor concentração de catalase (100 µg/mL), diferentes concentrações de veneno de *B. atrox* e de LAAO foram incubadas com as células na presença de 100 µg/mL de catalase. Quando necessário, foi utilizado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno 5 mM como controle positivo. O ensaio de viabilidade celular foi realizado como descrito anteriormente.

### 3.10 DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE CELULAR

A fim de determinar o mecanismo de morte celular desencadeado após incubação das células com veneno de *B. atrox* e LAAO foram avaliadas três vias de morte celular: apoptose, necrose e autofagia.

#### 3.10.1 APOPTOSE/NECROSE

A via de morte (Apoptose ou Necrose) desencadeada em células tratadas com as amostras foi, primeiramente, avaliada por citometria de fluxo. Anexina V- isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Chemometec) e Iodeto de Propídeo (Chemometec) foram utilizados para marcar células em apoptose e necrose, respectivamente. A anexina-V se liga à fosfatidilserina que é externalizada durante apoptose. Dessa forma, a Anexina V-FITC pode ser utilizada como marcador de células apoptóticas. O iodeto de Propídeo é capaz de entrar em células necróticas, as quais apresentam membranas permeáveis, e se ligar ao DNA. A integridade da membrana de células viáveis e apoptóticas excluem a marcação por Iodeto de propídeo (Crowley *et al.*, 2016).

Os queratinócitos foram plaquados em placas de 60x15 mm (Corning) na densidade de 10 ou 20x10<sup>4</sup> por placa e quando atingiram 60-80% de confluência foram lavados com Versene e tratados com 0,5 DC<sub>50</sub> de veneno ou 2 DC<sub>50</sub> de LAAO, em meio FAD contendo 1% de SFB. Como controle positivo de apoptose e necrose foram utilizados Estaurosporina 1 µM e Triton X-100 0,1%, respectivamente. Como controle negativo, as células foram incubadas apenas o veículo de diluição. Após 6, 12 e 24 h de tratamento as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos e ressuspendidas em PBS (aproximadamente x10<sup>5</sup> células). As células foram centrifugadas a 2000 rpm por 2 minutos e o pellet ressuspendido em tampão de ligação de Anexina (Hepes 0,1 M pH 7,4 contendo 1,4 mM NaCl e 25 mM CaCl<sub>2</sub>). Anexina V-FITC foi adicionada na concentração final de 1:500, juntamente com Hoechst 3334 10 µg/mL e as células foram incubadas por 15 min a 37 °C no escuro. Os queratinócitos foram novamente centrifugados a 2000 rpm por 2 min, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 300 µL de tampão de ligação de Anexina V. Após centrifugação o pellet foi ressuspendido em tampão de ligação de Anexina V contendo 5 µg/mL de Iodeto de propídeo e as células foram analisadas imediatamente por citometria de fluxo. A fluorescência foi determinada a 525/30 nm para Anexina V-FITC e a 583/26 nm para o Iodeto de propídeo.

### **3.10.2 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL**

Sabe-se que a perda de potencial de membrana mitocondrial pode preceder apoptose (Elmore, 2007). A alteração do potencial de membrana mitocondrial foi avaliada utilizando o reagente JC-1 (Chemometec). JC-1 é uma carbocianina sensível às alterações no potencial de membrana mitocondrial. Em mitocôndrias com baixo potencial de membrana, JC-1 se encontra na forma monomérica, que quando excitada a 490 nm exibe emissão máxima de ~527 nm (verde). O potencial de membrana mitocondrial fisiológico (polarizada) promove absorção de JC-1 pela matriz, formando J-agregados, que quando excitados a 490 nm apresentam emissão de 590 nm (vermelha) (Reers, Smith e Chen, 1991).

Os queratinócitos foram plaqueados na densidade de 10 ou 20x10<sup>4</sup>, em placas de 60x15 mm (Corning), em meio FAD completo. Após atingirem 60-80% de confluência, as células foram lavadas com Versene e tratados com 0,5 DC<sub>50</sub> de veneno ou 2 DC<sub>50</sub> de LAAO em FAD contendo 1% de SFB por 12 ou 24 horas. Células incubadas apenas com veículo de diluição foram utilizadas como controle negativo e como controle positivo utilizou-se FCCP (50 µM – 15 minutos de incubação). Depois de tratadas, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos. O *pellet* foi ressuspensionado em PBS e foram utilizadas aproximadamente x10<sup>6</sup> células para análise.

A marcação das células foi feita pela incubação com JC-1 (2,5 µg/mL) à 37 °C por 15 minutos. Em seguida as células foram centrifugadas, 2000 rpm por 2 min e o *pellet* ressuspensionado em PBS. Após centrifugação as células foram ressuspensionadas em PBS contendo DAPI (1 µg/mL) e as analisadas em citômetro de fluxo (NucleoCounter NC-3000 – ChemoMetec). A fluorescência do JC-1 foi determinada a 529 e 590 nm.

### **3.10.3 NECROSE**

A necrose foi também avaliada por microscopia de fluorescência, utilizando o reagente Sytox Green (Thermo Fisher Scientific). Sytox Green penetra membranas celulares comprometidas e se liga ao DNA, mas não é capaz de penetrar células com membranas intactas (células viáveis e apoptóticas).

Para realização do experimento queratinócitos foram plaqueados em placas de 4 ou 24 poços (Nunc), em lamínula de 13 mm de diâmetro (VWR) (2-3x10<sup>4</sup> células por poço) e

mantidos até que atingissem 60-80% de confluência. As células foram então tratadas com o veneno total ou toxina purificada em meio FAD contendo SFB 1%. Como controle negativo foram utilizadas células incubadas apenas com veículo de diluição e no controle positivo foi adicionado 0,1% de Triton x-100. Após lavados com Tampão Tris Salino (TBS) pH 7,4 e fixados com 3% de Paraformaldeído (PFA) por 10 minutos à temperatura ambiente, os queratinócitos foram incubados com Sytox Green (167 nM) diluído em TBS contendo 10% de SFB por 30 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz. Em seguida, as células foram coradas com DAPI (marcação nuclear) por 15 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após lavagens em TBS e água as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro (Fisher Scientific UK Ltd) utilizando Mowiol (Calbiochem).

Para a aquisição das imagens, Sytox Green foi excitado a 488 nm e foi utilizado microscópio Olympus Provis BX51 acoplado a câmera monocromática SPOT RT usando software SimplePCI 6 (Hamamatsu). Foram obtidas 5 imagens, escolhidas aleatoriamente, utilizando objetiva de 10X.

O *software* FIJI foi utilizado para quantificar o número de células marcadas com DAPI e Sytox Green. Os canais (Sytox Green, verde e DAPI, azul) foram primeiramente separados e a identificação de todos os núcleos corados por cada um dos marcadores foi feita utilizando as funções: *Threshold > Fill holes > Watershed*. Em seguida foi utilizada a função *Analyze particles* e o tamanho das partículas foi ajustado para 15-1000 pixels<sup>2</sup>, a fim de quantificar o número absoluto de núcleos marcados por DAPI e/ou Sytox Green. O número de células marcadas com Sytox Green foi dividido pelo número de células marcadas com DAPI para cálculo da porcentagem de células necróticas.

### **3.10.4 AUTOFAGIA**

Autofagia possui como principal característica a formação de autofagossomos. Sabe-se que LC3 (*microtubule associated protein 1 light chain 3*) se associa a autofagossomos durante o processo de autofagia. Dessa forma, utilizando LC3 fusionada a GFP (*Green Fluorescent Protein*) é possível determinar a associação de LC3 a autofagossomos como um aumento na LC3 puncta visualizada por microscopia de fluorescência (Esteban-Martínez e Boya, 2015).

Para avaliação da autofagia, queratinócitos foram transfectados com a proteína LC3 fusionada ao GFP. As células foram plaqueadas em placas de 4 ou 24 poços (Nunc), em lamínulas de 13 mm de diâmetro (VWR), na densidade de  $2-3 \times 10^4$  células por poço e foram cultivadas até atingirem o tamanho de 20 a 30 células por colônia. Os queratinócitos foram transfectados com plasmídeo contendo a sequência da proteína LC3 fusionada a sequência da proteína GFP. Para transfecção, o DNA (0,5  $\mu\text{g}$ /lamínula) foi adicionado ao meio Opti-MEM (50 $\mu\text{L}$ /lamínula) (Thermo Fisher Scientific) em tubo eppendorf. Em seguida, foi adicionado o reagente de transfecção Fugene (Promega) (2  $\mu\text{L}$ /lamínula - proporção de 1:4 DNA:Fugene) e o tubo contendo a mistura foi centrifugado por 5 segundos e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. O meio de cultura das células a serem transfectadas foi trocado por meio fresco (FAD contendo 10% SFB) e a solução contendo o DNA e reagente de transfecção foi adicionada.

Após 24 h de transfecção, as células foram tratadas com 0,5  $\text{DC}_{50}$  veneno ou 2  $\text{DC}_{50}$  de LAAO por 1,5, 3 e 6 horas. Como controle negativo foram utilizadas células incubadas apenas com veículo de diluição das amostras. Para controle positivo, as células sofreram depleção de nutrientes através da incubação com EBSS (Earle's Balanced Salt Solution - Sigma) por 30 minutos.

Após tratamento as células foram fixadas com 3% de paraformaldeído (PFA) em PBS por 10 min à temperatura ambiente. Para marcação nuclear as células foram incubadas com DAPI por 10 minutos. Após lavagens em PBS e água as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro (Thermo Fisher Scientific) utilizando Mowiol (Calbiochem). As imagens foram adquiridas em microscópio Olympus Provis BX51 acoplado a câmera monocromática SPOT RT usando software SimplePCI 6 (Hamamatsu).

A quantificação de LC3 puncta, em células que expressaram GFP-LC3, foi realizada através do software FIJI. Para quantificação, o canal contendo o LC3 puncta (verde) foi submetido à função *Find edges*, seguida pela função *Thresholding* para identificação todos os LC3 puncta da imagem, excluindo dessa forma outras estruturas celulares. Em seguida foi utilizada a função *Analyze particles* e o tamanho das partículas foi ajustado para 0,8-2 pixels<sup>2</sup>. O número de LC3 puncta foi calculado por imagem e depois dividido pelo número de células transfectadas, contadas manualmente, para obtenção do número médio de puncta por célula.



### 3.11 AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA CELULAR

#### 3.11.1 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR

Os queratinócitos foram plaqueados em placas de 24 poços ( $\mu$ -Plate 24 well –Ibdi) em meio FAD completo (como descrito anteriormente) na densidade de  $2-3 \times 10^4$  células por poço. Assim que as células atingiram 60-80% de confluência foram lavadas com Versene e foi adicionado meio FAD contendo 1% de SFB e as células foram incubadas por 6 h na estufa. O veneno de *B. atrox* ou LAAO foram adicionados às células nas diluições de 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25 e 0,625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (diluídos em meio FAD contendo 1% de SFB) e incubados por 24 horas a 37 °C, 5% de  $\text{CO}_2$  no escuro. Após incubação as células foram fixadas com 3% de paraformaldeído (PFA), foi adicionado Mowiol (Calbiochem, California, USA) e as imagens foram obtidas em microscópio *Widefield* Zeiss Axio Observer utilizando objetiva de 20X e *Zen acquisition software*. As imagens foram obtidas utilizando microscopia de campo claro.

#### 3.11.2 ALTERAÇÕES CELULARES EM CÉLULAS TRANSFECTADAS COM LIFE ACT-RFP

A morfologia dos queratinócitos e a estrutura da F-actina foram analisadas por meio de um ensaio celular em tempo real. Os queratinócitos foram plaqueados em placas de 24 poços ( $\mu$ -Plate 24 well –Ibdi) na densidade de  $2-3 \times 10^4$  células por poço. Após atingirem o tamanho de 20 a 30 células por colônia, as células foram transfectadas com plasmídeo contendo a sequência da proteína RFP (*Red Fluorescent Protein*) fusionada a um domínio de ligação à actina. Para tanto, o DNA (0,5  $\mu\text{g}/\text{poço}$ ) contendo a sequência foi adicionado ao meio Opti-MEM (50  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ) (Thermo Fisher Scientific) em tubo *ependorf*. Em seguida, foi adicionado o reagente de transfecção Fugene (Promega) (2  $\mu\text{L}/\text{poço}$  - proporção de 1:4 DNA:Fugene) e o tubo contendo a mistura foi centrifugado por 5 seg e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. Após incubação, o meio de cultura das células a serem transfectadas foi trocado por meio fresco e 50  $\mu\text{L}$  e a solução contendo DNA e reagente de transfecção foi adicionada às células.

Após 24 horas de transfecção as células foram tratadas com 0,5  $\text{DC}_{50}$  de veneno ou 2  $\text{DC}_{50}$  de LAAO, diluídos em meio DMEM/F12 sem fenol (Life Technologies) com cálcio reduzido. Este meio apresenta composição similar ao FAD descrito anteriormente, porém

contém apenas 0,1 mM de CaCl<sub>2</sub> e 2% de SFB depletado de íons divalentes por tratamento com resina Chelex-100 (BioRad, Hertforshire, UK). As células controles foram transfectadas e receberam apenas o meio de diluição ao invés de tratamento com as amostras. Imediatamente após receberem tratamento, os queratinócitos foram analisados em microscópio *Widefield* Zeiss Axio Observer utilizando objetiva de 20X e Zen acquisition software. As imagens foram obtidas utilizando microscopia de campo claro e laser de 568nm. Foi obtida uma imagem a cada 5 min por 6 horas, sendo que durante todo processo as células foram mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.11.3 ALTERAÇÕES CELULARES UTILIZANDO MARCAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA**

Para os ensaios de imunofluorescência os queratinócitos foram plaqueados em placas de 4 ou 24 poços (Nunc) (2-3x10<sup>4</sup> células por poço) em lamínulas de 13 mm de diâmetro (VWR). Após atingirem o tamanho de 20-30 células por colônia, as células receberam o devido tratamento (veneno ou LAAO) por 1,5, 3 e 6 horas e foram fixadas com 3% de paraformaldeído (PFA) em Tampão Fosfato Salino (PBS) por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram bloqueadas e permeabilizadas em SFB 10% com Triton X-100 0,1% por 10 min a temperatura ambiente. Após bloqueio, os queratinócitos foram incubados com o anticorpo primário (Tabela 2) diluído em SFB 10% *overnight* a 4 °C. Após lavagens com PBS, o anticorpo secundário apropriado (Tabela 3) foi adicionado e incubado por mais 30 minutos. Quando necessária marcação dupla ou tripla, estes passos foram repetidos para cada anticorpo. As lamínulas passaram por lavagens em PBS e, em seguida, em água, sendo então montadas em lâminas de vidro (Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, Reino Unido) com Mowiol (Calbiochem, California, USA). As imagens foram adquiridas em microscópio Olympus Provis BX51 acoplado câmera monocromática SPOT RT usando software SimplePCI 6 (Hamamatsu, Japão) ou com microscópio confocal invertido Zeiss LSM-510 utilizando software Zeiss ZEN 2012 (Blue Edition) (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha). As imagens foram então processadas com software FIJI.

Tabela 2: Anticorpos primários usados nos ensaios de imunofluorescência.

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Origem</b>	<b>Diluição</b>
E-caderina	HECD1	Cedido por M. Takeichi, Keio University, Japão	Camundongo	1:1000

Tabela 3: Anticorpos secundários usados nos ensaios de imunofluorescência

<b>Conjugado</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Origem</b>	<b>Diluição</b>
Alexa Fluor 488 -conjugado anti- IgG de camundongo	Jackson Immuno Research Laboratories	Cabra	1:1000
Phalloidin-ATTO-568	Sigma	---	1:3000
DAPI	Sigma-Aldrich	---	1:3000

### **3.12 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS TOTAIS DE PROTEÍNAS CELULARES**

Os queratinócitos foram plaqueados em placas de 3 cm (Nunc) ( $8 \times 10^4$  células/placa) e após atingirem 60-80% de confluência e foram incubados com veneno (0,5  $DC_{50}$ ) ou LAAO (2  $DC_{50}$ ) por diferentes intervalos de tempo (0; 1,5; 3 e 6 h).

Os queratinócitos foram então lisados em Tampão de lise contendo 50 mM Tris-HCl pH7,5, 0,1% SDS, 1% Triton X-100 e 150 mM NaCl (inibidores foram adicionados antes do uso: 500 mM fluoreto de sódio (NaF), 5 mg/mL LPP (5 mg/mL Leupeptin, 5 mg/mL Pepstatin, 5 mg/mL Pefabloc em DMSO), 100 mM DTT, 100 mM fenilmetilsulfonilflúor (PMSF), 100 mM ortovanadato de sódio (OV)), centrifugados por 5 min a 14.000 rpm, em seguida o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20 °C até o uso. A eletroforese foi realizada como descrito anteriormente.

As proteínas foram transferidas do gel para membrana de difloreto de polivinideno (PVDF – Millipore) por transferência úmida (Tampão de transferência: 50 mM Tris-HCl, 380 mM glicina e 20% metanol pH 8,3) por 1 h a 100 V. As proteínas transferidas para a membrana foram visualizadas por coloração com amido black (Sigma-Aldrich). Em seguida, as

membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado em (TBS-T) por 1 h. O anticorpo primário (Tabela 4) foi diluído em leite em pó em TBS-T e incubado com a membrana por 1 hora a temperatura ambiente ou *overnight* a 4 °C. Os controles de aplicação (actina e  $\beta$ -tubulina), quando necessários, foram escolhidos de acordo com a massa molecular da proteína de interesse. Em seguida as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em TBS-T e foi adicionado o devido anticorpo secundário (Tabela 5) diluído em uma solução contendo leite em pó/TBS-T por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram então novamente lavadas 3 vezes em TBS-T e reveladas com ECL (GE Healthcare) expostas a Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences). Os filmes foram desenvolvidos com Compact X4 Automatic Processor (Xograph Healthcare, Gloucestershire, Reino Unido).

Tabela 4: Anticorpos primários usados para *Western Blots*.

Anticorpo	Clone	Fornecedor	Origem	Diluição
$\alpha$ -catenina	VB1	Braga et al, 1995	Coelho	1:1000
$\beta$ -catenina	VB2	Braga et al, 1995	Coelho	1:1000
$\beta$ -tubulina	Tub2.1	Sigma-Aldrich	Camundongo	1:1000
E-caderina	HECD1	Cedido por M. Takeichi, Keio University, Japão	Camundongo	1:1000

Tabela 5: Anticorpos secundários usados para *Western Blots*.

Conjugado	Fornecedor	Origem	Diluição
Anti-IgG de camundongo conjugada com HRP	Pierce	Cabra	1:5.000
Anti-IgG de coelho conjugada com HRP	Pierce	Cabra	1:5.000

### 3.13 AVALIAÇÃO DE ADESÃO CELULAR

Para a avaliação o efeito do veneno de *B. atrox* e da LAAO purificada na adesão célula-substrato foi utilizado o marcador de viabilidade celular calceína (Life Technologies). Como substrato foram testados colágeno I, IV e fibronectina (todos adquiridos de Sigma Aldrich). Os poços tratados com BSA foram utilizados como controle negativo do experimento.

O experimento foi realizado de duas maneiras diferentes:

1. As células receberam tratamento com veneno e proteína purificada e foram plaqueadas em placas contendo diferentes substratos.
2. As matrizes, adicionadas em placas de 24 poços, foram tratadas com as amostras e em seguida as células foram adicionadas.

Em ambos os casos, os queratinócitos foram plaqueados na densidade de 10 ou  $20 \times 10^4$ , em placas de 60x15 mm (Nunc), e mantidos em meio FAD completo até que atingissem 80% de confluência. As matrizes extracelulares (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram incubadas em placas de 24 poços, *overnight* à 4 °C.

Os tratamentos serão descritos detalhadamente a seguir.

#### 3.13.1 TRATAMENTO DAS CÉLULAS

Para realização deste experimento os queratinócitos foram lavados com Versene e tratados, por 1 hora, com o veneno ou com a proteína purificada diluídos em meio FAD contendo 1% de SFB. Como controle foram usadas células não tratadas. A placa de 24 poços contendo os substratos foi lavada com PBS e bloqueada com 1% de leite em pó por 1 hora à 37°C e em seguida passou por mais 2 lavagens com PBS. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos. Em seguida as células foram ressuspendidas em meio FAD (SFB 1%), contadas e semeadas ( $6 \times 10^4$  células por poço) na placa de 24 poços tratada com as matrizes extracelulares. A placa foi novamente incubada por 1 hora a 37°C e, após incubação, o meio foi retirado e uma solução contendo 1 M de calceína em meio FAD (SFB 1%) foi adicionada. Após 15 min de incubação a 37 °C, a placa foi lavada em PBS contendo 1 mM de  $\text{MgCl}_2$  e 1 mM  $\text{CaCl}_2$  e foi adicionado a cada poço 500  $\mu\text{L}$  desta mesma solução. A fluorescência foi medida a 485/535 nm em fluorímetro POLARstar Galaxy utilizando o software FLUOstar Galaxy.

### **3.13.2 TRATAMENTO DAS MATRIZES EXTRACELULARES**

Antes do tratamento, a placa de 24 poços contendo as matrizes extracelulares foi lavada com PBS e bloqueada com 1% de leite em pó por 1 h à 37 °C e, em seguida, passou por mais 2 lavagens de PBS. As matrizes extracelulares foram então tratadas com o veneno ou com a proteína purificada diluída em PBS por 1 h. Poços controles de cada matriz não receberam tratamento. As células que haviam sido plaqueadas em placas de 60x15 mm foram tripsinizadas e centrifugadas a 800rpm por 5 min. O *pellet* foi ressuspensionado em FAD contendo 1% de SFB, as células foram contadas e semeadas ( $6 \times 10^4$  células por poço) na placa de 24 poços, sendo esta novamente incubada por 1 hora a 37 °C. Em seguida, o meio foi retirado, foi adicionada uma solução contendo 1 M de calceína em meio FAD (SFB 1%) e a placa foi incubada por 15 minutos a 37 °C. Após incubação os poços foram lavados com PBS contendo 1 mM de  $MgCl_2$  e 1 mM  $CaCl_2$ . Foram adicionados 500  $\mu L$ /poço da mesma solução e a fluorescência foi medida a 485/535 nm em fluorímetro POLARstar Galaxy utilizando o software FLUOstar Galaxy.

### **3.14 MEDIDA DE ROS INTRACELULAR**

Os níveis de espécies reativas de oxigênio foram avaliados utilizando a sonda fluorescente Diclorofluoresceína Diacetato (DCFDA). Queratinócitos foram plaqueados em placas de 96 poços (Corning) na densidade de  $2,2-3,2 \times 10^3$  por poço. Quando as células atingiram 80% de confluência foram lavadas com PBS e incubadas com DCFDA 1  $\mu M$  em meio FAD sem SFB e sem vermelho de fenol por 30 minutos a 37 °C, 5% de  $CO_2$ . Em seguida as células foram lavadas com PBS e tratadas com LAAO em FAD sem SFB e sem vermelho de fenol com adição de HEPES (25 mM). Os níveis de ROS foram monitorados por meio de cinética de 3 horas em fluorímetro (Excitação 485 nm, Emissão: 528 nm). As células marcadas com DCFDA e não tratadas com as amostras foram utilizadas como controle negativo.

### **3.15 MEDIDA DE OXIDAÇÃO DE PROTEÍNAS CELULARES**

Os grupos tióis de cisteínas presentes em proteínas específicas podem ser oxidados a ácidos sulfênico estáveis. Dimedona (5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona) é um reagente permeável às células capaz de marcar proteínas oxidadas por meio de uma reação irreversível

com ácido sulfênico (Alisson, 1976; Cameron, 2015). Para avaliar a oxidação de proteínas celulares de queratinócitos tratados com LAAO foi realizado Western Blot com lisado celular e anticorpo anti-dimedona (Maller, Schröder e Eaton, 2011). Para este experimento seguiu-se a metodologia descrita por Cameron (2015), com modificações.

As células foram plaqueadas em placas de 4 ou 24 poços (Nunc) ( $2-3 \times 10^4$  células por poço). Quando atingiram 20-30 células por colônias os queratinócitos foram tratados com 2  $DC_{50}$  de LAAO por 1,5, 3 e 6 horas. As células foram então lavadas 2 vezes com meio FAD sem adição de soro fetal bovino. Em seguida, os queratinócitos foram incubados com 5 mM de Dimedona (Sigma - D153303) por 1 hora.

As células foram lisadas em Tampão RIPA (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 40 mM pirofosfato de sódio, 50 mM fluoreto de sódio (NaF), 1% NP40, 0,5% deoxicolato de sódio, 0,025% SDS, 1mM fenilmetilsufonilflúor (PMSF), 1 mM ortovanadato de sódio (OV), centrifugados por 5 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o uso.

As amostras foram aplicadas em gel de gradiente de poliacrilamida (SDS-PAGE) 4-15% (Bio-Rad) em condições não redutoras. As proteínas foram então transferidas do gel para membrana de difloreto de polivinideno (PVDF – Millipore) por transferência úmida (Tampão de transferência: 50 mM Tris-HCl, 380 mM glicina e 20% metanol, pH 8,3). Proteínas foram visualizadas na membrana por coloração com amido black (Sigma-Aldrich). Em seguida as membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado (Marvel) em Tampão Tris Salino (TBS) pH 7,5, contendo 0,1% de Tween-20 (Sigma-Aldrich) (TBS-T) por 1 hora (100V). Anticorpo anti-dimedona-ácido sulfênico (1:5000) (Merck - 7-2139) diluído em leite em pó em TBS-T foi incubado com a membrana por 1 hora a temperatura ambiente ou *overnight* a  $4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 min em TBS-T e foi adicionado anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugada com HRP) (1:5000) diluído em uma solução contendo leite em pó/TBS-T por 1 h a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas 3 vezes em TBS-T e reveladas com ECL (GE Healthcare) expostas a Hyperfilm ECL. Os filmes foram desenvolvidos com Compact X4 Automatic Processor (Xograph Healthcare, Gloucestershire, Reino Unido).

### 3.16 MARCAÇÃO DE LAAO

A fim de identificar se a LAAO seria capaz de ser internalizada por queratinócitos foi realizada marcação da proteína purificada com fluoróforo utilizando o Kit Alexa Fluor® 555 para marcação de proteínas em microescala (Thermo Fisher Scientific).

A marcação de 50 µg de LAAO foi realizada conforme descrito no protocolo fornecido pelo fabricante. Em resumo, a proteína foi diluída para que atingisse 1 mg/mL, a concentração proteica foi mensurada por *BCA Protein Assay Kit*. Foram transferidos 50 µL da proteína para o tubo de reação (fornecido no kit) e 5 µL de bicarbonato de sódio (1 M) foram adicionados. A solução foi homogeneizada e foi adicionado 1,64 µL de Alexa Fluor 555 succinimidil-éster (8,11 nmol/µL). Após 15 min de incubação o conjugado LAAO-Alexa 555 foi purificado em resina Bio-Gel P-6 fine em PBS fornecida no Kit. A concentração do conjugado foi estimada espectrometricamente. Como controle negativo foi realizada a mesma marcação de 50 µg de albumina do soro bovino (BSA), que esta proteína possui massa molecular similar à de LAAO. A LAAO marcada e BSA marcada serão referidas como LAAO-555 e BSA-555, respectivamente.

Para os ensaios com as proteínas marcadas os queratinócitos foram plaqueados em placas de 4 ou 24 poços (Nunc) ( $2-3 \times 10^4$  células por poço) em lamínulas de 13 mm de diâmetro (VWR) e foram mantidos até que atingissem 20-30 células por colônia. Em seguida as células foram tratadas com LAAO-Alexa 555 ou com BSA-Alexa 555, diluídos em FAD 1%, por 1,5 hora. Células incubadas apenas com FAD 1% foram utilizadas como controle adicional. Após tratamento, as células foram fixadas com 3% de paraformaldeído (PFA) em Tampão Fosfato Salino (PBS) por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, os núcleos foram marcados com DAPI por 10 minutos. Após lavagens com PBS e água as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro (Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, Reino Unido) com Mowiol (Calbiochem, California, USA). Para aquisição das imagens foi utilizado microscópio *Widefield Zeiss Axio Observer* utilizando objetiva de 60X. As imagens passaram por deconvolução (algoritmo *Nearest Neighbor*) para remoção de *background*.

### 3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados mostrados neste trabalho representam valores de três experimentos independentes e são expressos utilizando a média ± erro padrão da média (SEM). Análises



estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prisma. Experimentos contendo mais de dois grupos foram comparados utilizando o teste one-way ANOVA e o pós-teste de Bonferroni.

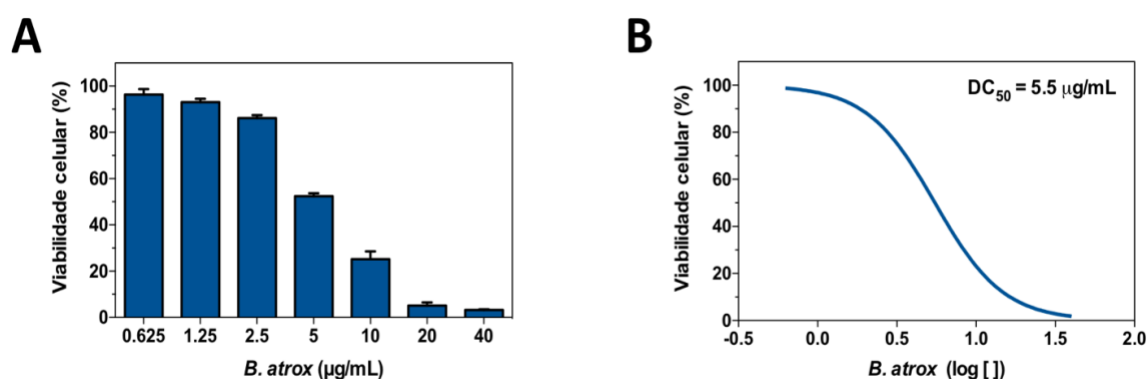
# ***RESULTADOS***

## 4. RESULTADOS

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi necessário estabelecer um modelo celular pertencente a tecidos que fossem diretamente afetados pela ação do veneno em pacientes e que, além disso, fossem capazes de responder à presença das toxinas em estudos de morte celular e de destruição da arquitetura tecidual. Sendo assim, queratinócitos de cultura primária foram escolhidos como modelo.

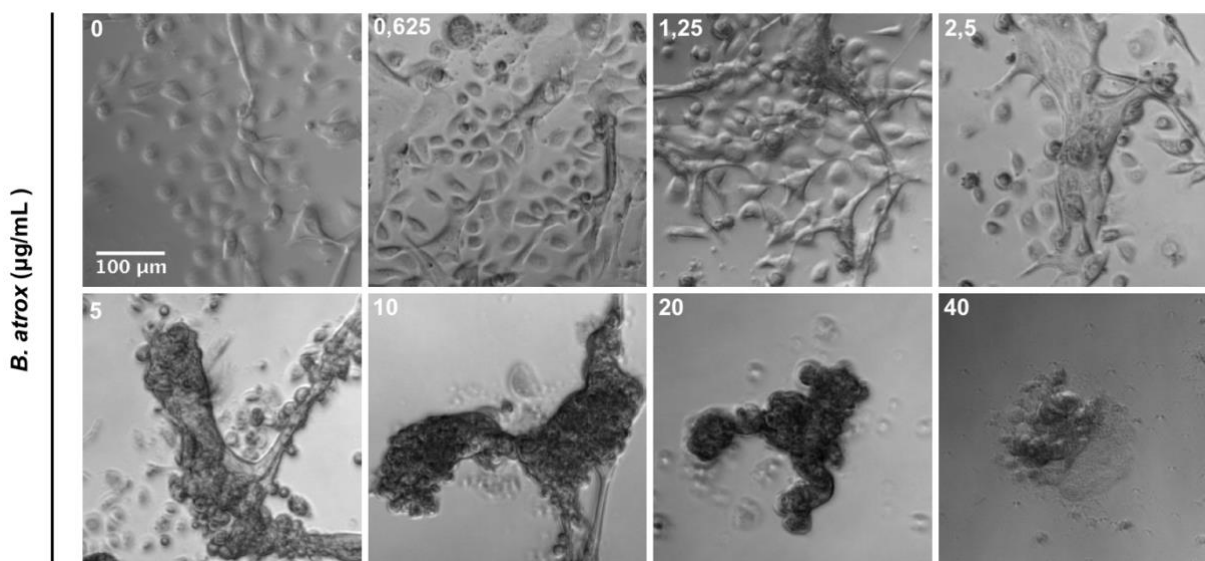
### 4.1 VENENO DE *BOTHROPS ATROX*

Primeiramente, foi verificada a ação citotóxica do veneno de *B. atrox* em queratinócitos por meio do ensaio de viabilidade celular utilizando o reagente Alamar Blue. As células foram incubadas por 24 h com diferentes concentrações de veneno (0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e 40  $\mu\text{g/mL}$ ) diluído em FAD contendo 1% de SFB. Após o tratamento foi observada redução da viabilidade celular, que se deu de forma concentração dependente (Figure 10A). Houve uma diminuição de células viáveis após tratamento com 2,5  $\mu\text{g/mL}$ , porém esse fenômeno foi mais acentuado quando utilizadas concentrações maiores (a partir de 5  $\mu\text{g/mL}$ ). A concentração efetiva capaz de reduzir em 50% ( $DC_{50}$ ) a viabilidade celular foi determinada utilizando uma curva concentração-resposta e foi definida como 5,5  $\mu\text{g/mL}$  (Figure 10B).



**Figura 10: Citotoxicidade do veneno de *B. atrox* em queratinócitos de cultura primária. (A)** concentração-resposta da citotoxicidade do veneno. Células foram incubadas com diferentes concentrações do veneno e após 24 horas de tratamento a viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de Alamar Blue. Os valores representam médias de três ensaios independentes e a barra de erros indica o erro padrão da média. **(B)** Curva para cálculo da dose citotóxica do veneno capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% ( $DC_{50}$ ).

A ação do veneno (mesmas concentrações descritas para o ensaio de viabilidade celular) nas células foi também verificada pela observação direta em microscópio. As imagens mostram que após 24 horas de tratamento com veneno as células têm sua morfologia alterada (Figura 11). Observa-se que em concentrações acima de 1,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  as colônias apresentam extremidades contraídas e em concentrações maiores que 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  observa-se aglomerados celulares, sugerindo possível diminuição da adesão célula-substrato.



**Figura 11: Morfologia de queratinócitos tratados com veneno de *B. atrox*.** Células foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de veneno de *B. atrox*. Células não tratadas (concentração 0) foram consideradas como controle negativo.

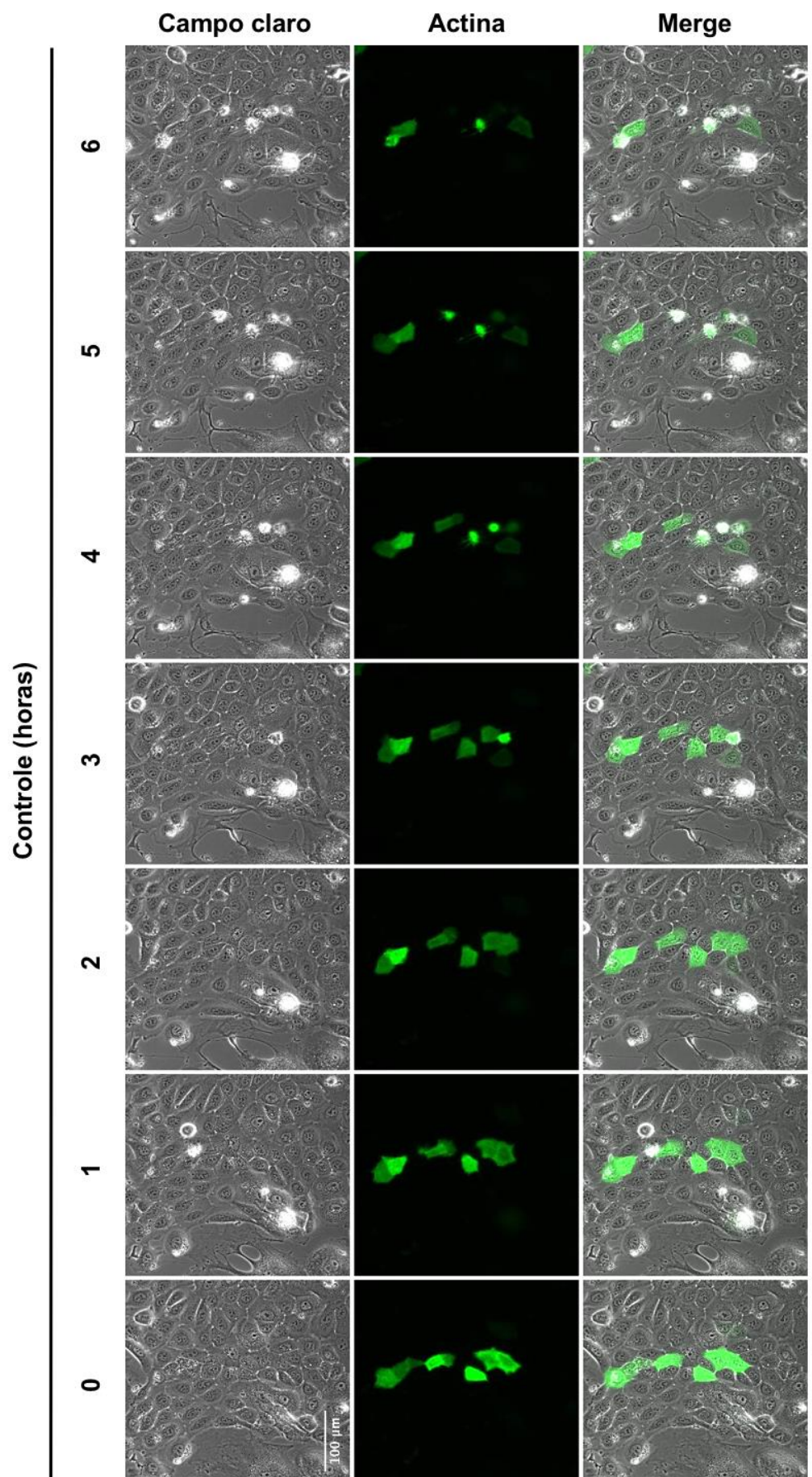
Após a observação das alterações morfológicas em células tratadas com o veneno de *B. atrox*, decidiu-se avaliar quais seriam as modificações causadas no citoesqueleto dos queratinócitos tratados. É importante salientar que foram feitos experimentos pilotos para decidir a dose e o tempo de tratamento utilizados nos experimentos realizados nesse trabalho. Usou-se como base a  $DC_{50}$  calculada pelo ensaio de viabilidade celular e foram testadas as concentrações de 0,25; 0,5; 1 e 2  $DC_{50}$  de veneno total e os tempos de 1,5; 3; 6 e 24 horas para tratamento. Decidiu-se utilizar a concentração de 0,5  $DC_{50}$  para tratamentos por 1,5; 3 e 6 horas, uma vez que em concentrações maiores que 0,5  $DC_{50}$  e tratamentos mais longos que 6 h as células morriam e/ou formavam aglomerados celulares, o que impossibilita a análise da estrutura celular.

A fim de avaliar a dinâmica das células tratadas, assim como a estrutura das colônias e do citoesqueleto, queratinócitos foram transfectados por 24 horas com o plasmídeo contendo um domínio de ligação à actina (*Lifect*) acoplado a RFP. Após tratamento com 0,5 DC<sub>50</sub> do veneno de *B. atrox* as células foram observadas durante 6 horas (foi obtida uma imagem a cada 5 minutos).

Como diferenças observadas entre as células controle (Figura 12A) e as células tratadas com veneno de *B. atrox* (Figura 12B), podemos ressaltar: alongamento celular a partir de 2 horas de tratamento (setas brancas), células em divisão a partir de 2 horas de tratamento (setas amarelas), retração celular, com consequente formação de espaços vazios dentro da colônia, após 3 horas de incubação com veneno (setas vermelhas), retração periférica da colônia a partir de 5 horas de tratamento (setas pretas).

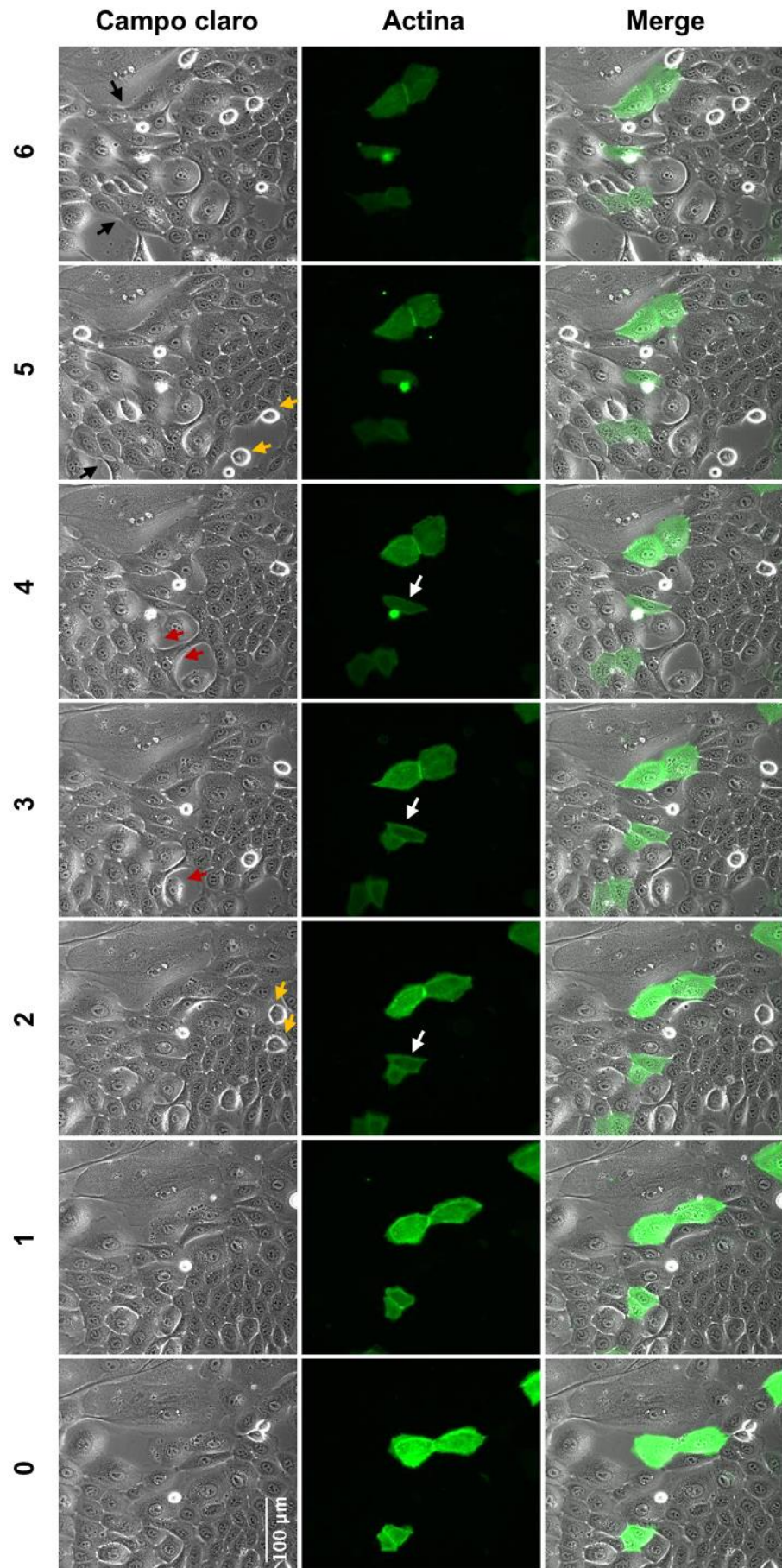
A retração de células e de colônias como um todo, observada nos experimentos anteriores (Figura 11), sugeriu alteração na morfologia celular assim como na coesão tecidual. Com objetivo de analisar a arquitetura celular com mais detalhes, foi realizada a marcação para E-caderina, F-actina através de imunofluorescência de células tratadas com veneno de *B. atrox*.

**A**



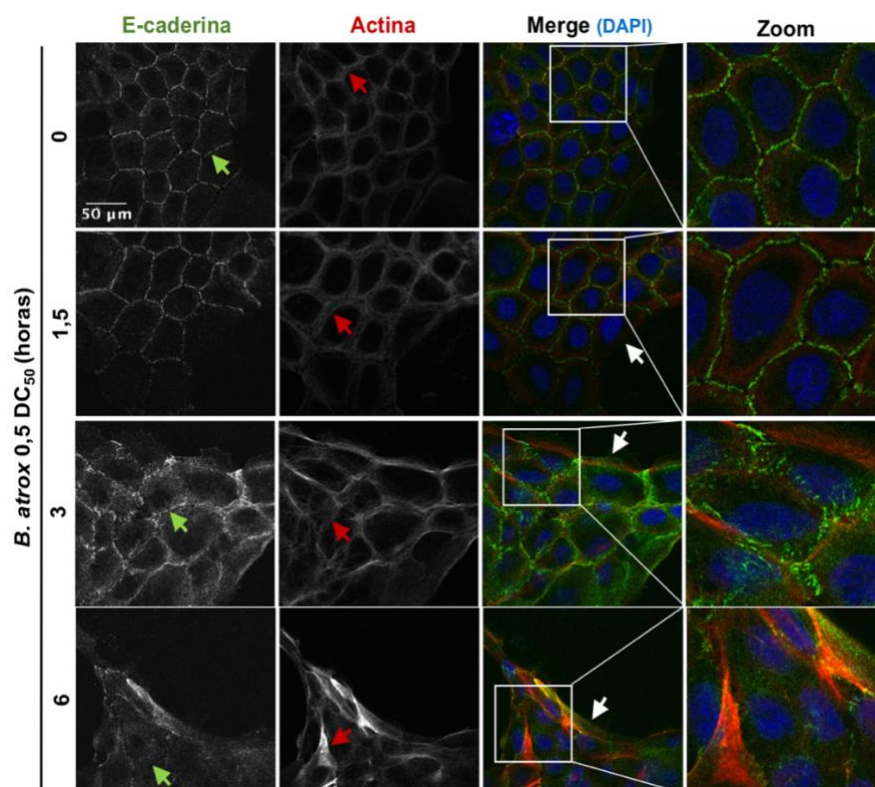
**B**

*B. atrox* 0,5 DC<sub>50</sub> (horas)



**Figura 12: Dinâmica e morfologia de queratinócitos tratados com veneno de *B. atrox*.** Células foram transfectadas com Actina-RFP por 24 horas e, após o devido tratamento, foram observadas por 6 horas. **(A)** Células não tratadas com a amostra foram utilizadas como controle. **(B)** Queratinócitos do grupo tratado receberam 0,5D C50 de veneno. Setas brancas: Alongamento celular; Setas amarelas: células em divisão; Setas vermelhas: Formação de espaços vazios; Setas pretas: retração periférica da colônia. As células foram mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> e analisadas em microscópio widefield com objetiva de 20x. (n=3, experimentos realizados de forma independente).

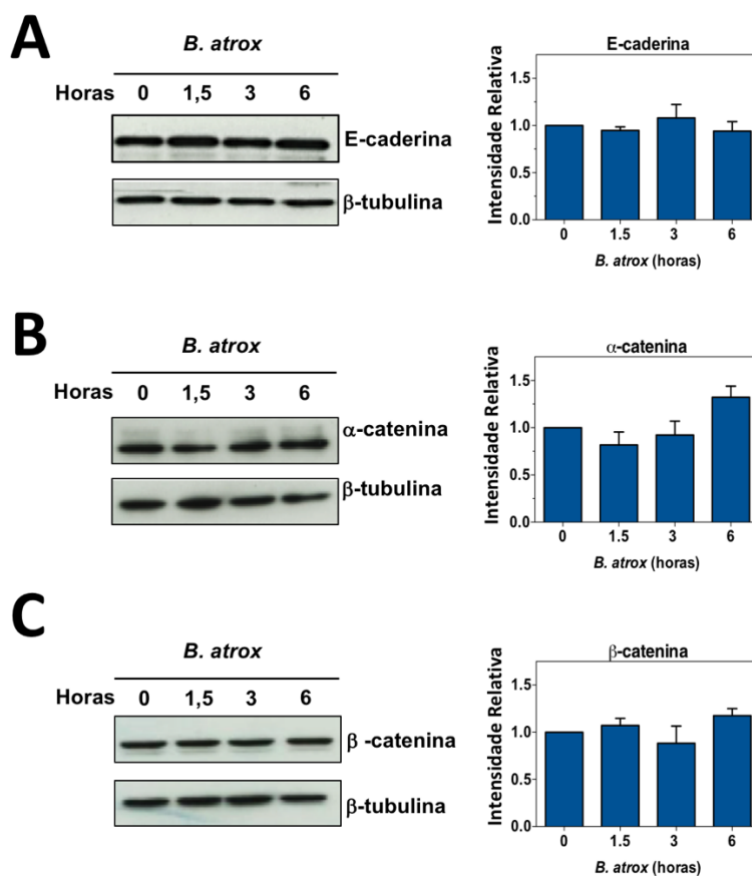
Como previsto, após tratamento com veneno (0,5 DC<sub>50</sub>), as células apresentaram morfologia alterada quando comparadas ao controle (tempo 0). Na Figura 13, pode-se observar que, de maneira geral, as células apresentaram alongamento celular e retração da colônia (setas brancas). No controle (tempo 0), é possível observar E-caderina com aspecto normal (concentrada nas junções celulares), entretanto, a partir de 3 horas de tratamento houve diminuição de E-caderina nas junções celulares (setas verdes). Em relação a F-actina (setas vermelhas), nota-se a presença de feixes de actina bem organizados nas extremidades das células controles (tempo 0). Após 1,5 hora de tratamento a actina se assemelha à das células controle, apresentando alterações após 3 e 6 horas de tratamento (setas vermelhas).



**Figura 13: Estrutura de E-caderina e F-actina em queratinócitos tratados com veneno de *B. atrox*.** Células foram incubadas com 0,5DC<sub>50</sub> de veneno por 1,5; 3 e 6 horas. Tempo 0 horas não recebeu tratamento e foi considerado como controle negativo. Queratinócitos foram então fixados e marcados para E-caderina e F-actina. Zoom é mostrado no painel da direita e representa aumento da área marcada. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal com objetiva de 60x. (n=3).



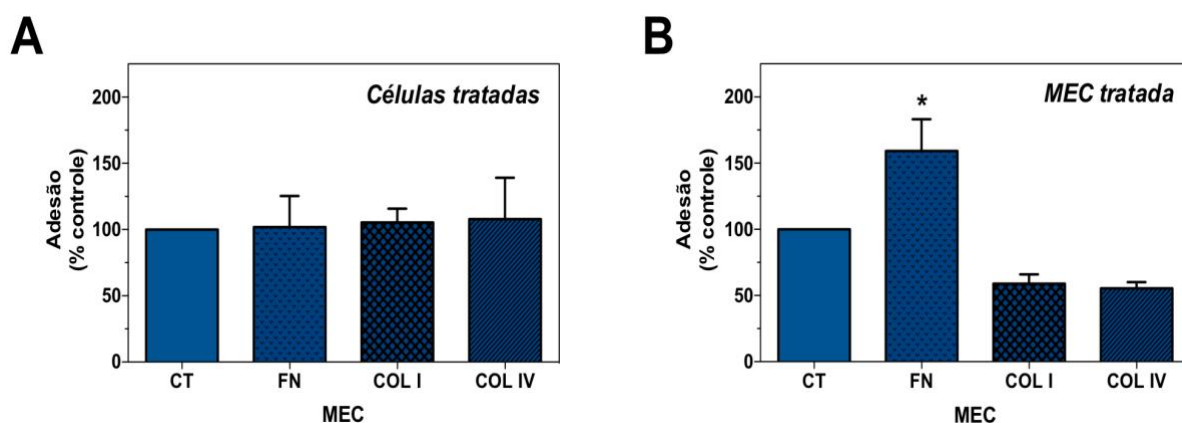
Visto que ensaios de imunofluorescência mostraram uma possível redução na E-caderina, resolveu-se avaliar se os níveis totais dessa proteína teriam sido alterados em queratinócitos tratados com veneno de *B. atrox* (0,5 DC<sub>50</sub>). Como  $\alpha$  e  $\beta$ -cateninas se associam à caderina, os níveis dessas proteínas também foram mensurados. Como controle de aplicação foi utilizada  $\beta$ -tubulina. A quantificação das bandas foi feita por *software* FIJI. Não mostrou nenhuma alteração significativa nos níveis totais de caderina,  $\alpha$  e  $\beta$ -cateninas (Figura 14 A-C).



**Figura 14: Níveis totais de E-caderina,  $\alpha$  e  $\beta$ -cateninas em queratinócitos tratados com veneno de *B. atrox*.** Células tratadas com 0,5 DC<sub>50</sub> de veneno por 0; 1,5; 3 e 6 horas foram lisadas e submetidas a Western Blot. Membranas foram incubadas com os devidos anticorpos e a banda foi revelada pela adição do anticorpo secundário específico conjugado a HRP. (n=3, experimentos realizados de forma independente).

A fim de analisar a ação do veneno na adesão célula-substrato utilizou-se o método da calceína. Foram testadas três matrizes extracelulares (MEC) diferentes: fibronectina (FN), colágeno I (COL I) e colágeno IV (COL IV).

Primeiramente foi testado se células tratadas com veneno de *B. atrox* (0,5 DC<sub>50</sub>) sofreriam alguma alteração na adesão. Para isso, as células foram tratadas por 1 hora e, em seguida, foram repicadas, contadas e adicionadas em poços contendo as diferentes MEC. Nestas condições não foi possível observar diferenças de adesão das células a nenhum dos substratos testados (Figura 15A). As células não tratadas foram adicionadas aos poços com as matrizes e foram consideradas como controle negativo. Para a representação em gráfico, o controle de cada matriz foi considerado como 100% de adesão e para o grupo tratado foi calculado a porcentagem de adesão em relação ao controle da respectiva matriz. Em um segundo momento, foi testado se o veneno seria capaz de modificar a matriz extracelular e, conseqüentemente, alterar a adesão celular ao respectivo substrato (Figura 15B). Com este fim, as MEC foram tratadas por 1 hora (0,5 DC<sub>50</sub> de veneno de *B. atrox*) e, após tratamento, as células foram adicionadas aos poços contendo as MEC. Neste caso, foi possível observar um aumento significativo de adesão à fibronectina, e, apesar de existir uma aparente diminuição da adesão para Colágeno I e IV tratados com veneno, essa diferença não foi considerada estatisticamente significativa. As matrizes não tratadas com veneno foram consideradas controles e o cálculo da adesão foi feito da mesma forma que descrito anteriormente.



**Figura 15: Efeitos do veneno de *B. atrox* na adesão de queratinócitos. (A)** Queratinócitos foram pré-incubados com 0,5 DC<sub>50</sub> do veneno por 1 hora a 37 °C. Células tratadas foram então adicionadas a poços (placa de 24 poços) sensibilizados com 1 µg/mL de diferentes matrizes extracelulares (MEC) e foram incubadas por mais 1 hora a 37 °C. **(B)** MEC foram pré incubadas com 0,5 DC<sub>50</sub> de veneno de *B. atrox* por 1 hora a 37 °C. Em seguida, queratinócitos foram adicionados a poços contendo as MEC e foram incubados por 1 hora a 37 °C. A adesão celular foi mensurada pelo método de calceína. Os valores representam médias de quatro ensaios independentes e a barra de erros indica o erro padrão da média (\*  $p < 0,05$ ). Todos os grupos foram comparados com o grupo controle para sua respectiva matriz. Controle - CT, Fibronectina - FN, Colágeno I – COL I, Colágeno IV – COL IV.

O ensaio utilizando o reagente Alamar Blue, mostrado anteriormente, sugeriu redução da viabilidade celular. Além disso, foram observadas alterações de morfologia, mesmo utilizando doses pequenas de veneno como 0,5 DC<sub>50</sub>. Decidiu-se então verificar a viabilidade celular e o mecanismo de morte induzido após o tratamento de queratinócitos com 0,5 DC<sub>50</sub> de veneno (dose otimizada nos ensaios anteriores) por diferentes intervalos de tempo. Para isto, foram avaliados mecanismos de morte celular como apoptose, necrose e autofagia, que serão descritos a seguir.

A apoptose foi avaliada utilizando Anexina-V juntamente com Iodeto de Propídeo para detectar a presença de necrose. As células foram incubadas com 0,5 DC<sub>50</sub> de veneno de *B. atrox* diluído em FAD contendo 1% de SFB, por 6, 12 e 24 horas. Células do grupo controle negativo foram mantidas somente em meio FAD contendo 1% de SFB pelos mesmos intervalos de tempo. Como controle positivo para calibração da análise usou-se estaurosporina 1μM (apoptose) e Triton X-100 0,1% (necrose).

Os *dot plots* e histogramas representativos para cada dose e tempo são mostrados na Figura 16A e B. Os eventos celulares foram quantificados e a média de todos os experimentos realizados é mostrada na Figura 17.

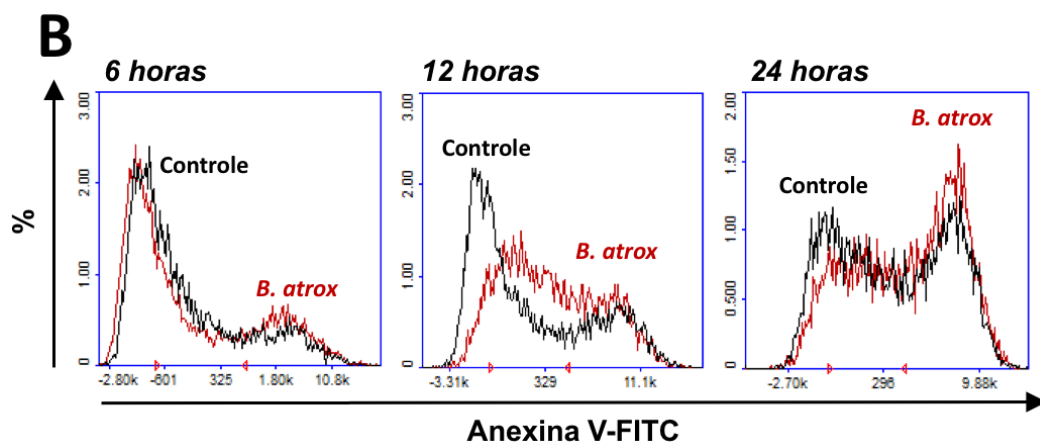
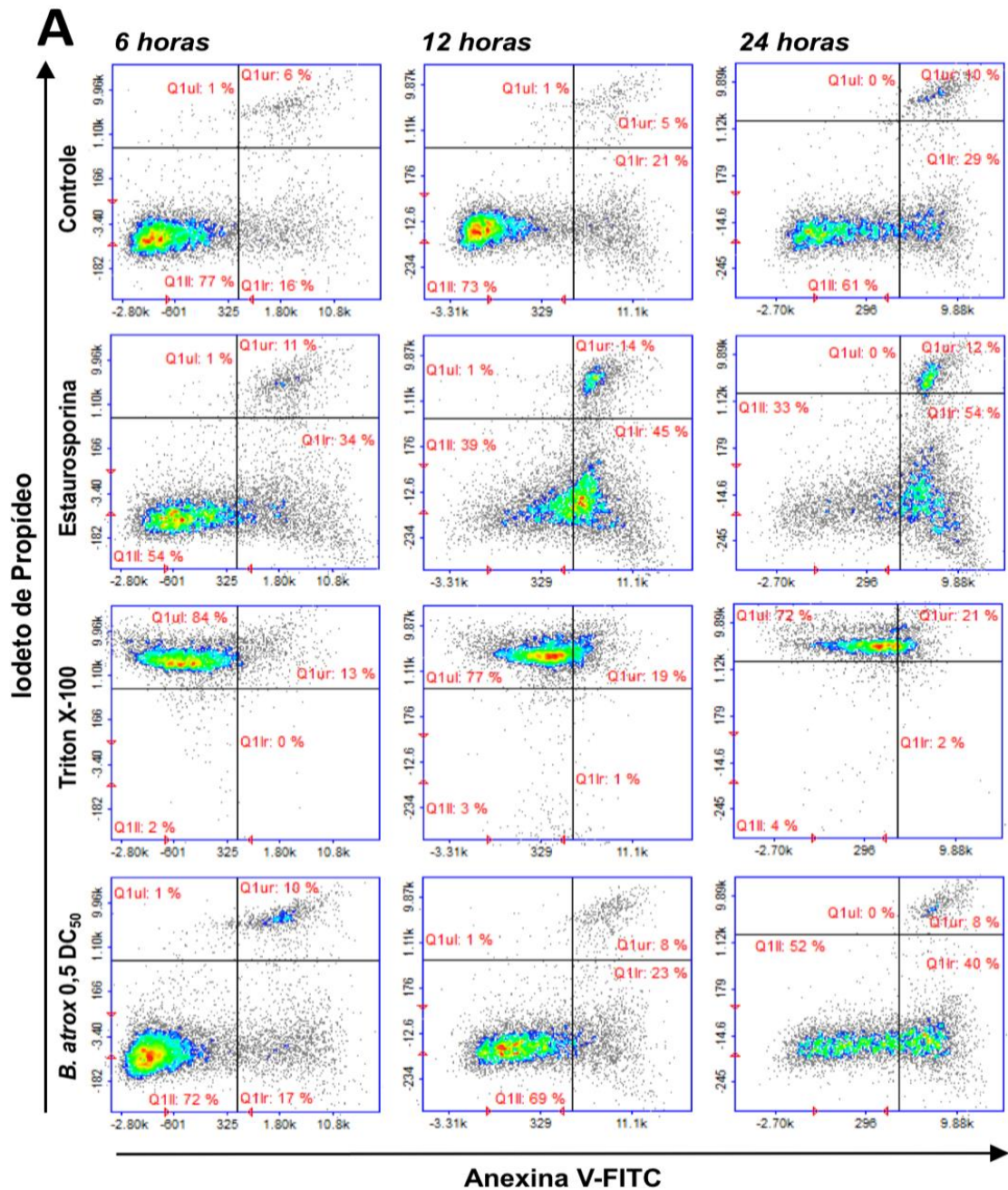
A viabilidade celular diminuiu de forma tempo dependente, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado. As células controle apresentaram a mesma viabilidade celular que células tratadas por 6 horas (80%). Após 12 h, o grupo controle apresentou aproximadamente 70% de células viáveis, enquanto esse número foi de aproximadamente 65% para o grupo tratado. O tratamento de 24 h levou a redução estatisticamente significativa da viabilidade do grupo tratado com veneno (54%) quando comparado com grupo controle (67%) (Figura 17A). Os queratinócitos utilizados neste trabalho são células primárias e, portanto, muito sensíveis. A incubação das células com meio FAD contendo apenas 1% de SFB (ao invés de 10%), por longos períodos de tempo, pode justificar a redução da viabilidade celular observada no controle negativo.

As células em apoptose podem ser identificadas pela ligação de Anexina-V à fosfatidilserina que é externalizada durante o processo. O tratamento das células com veneno de *B. atrox* induziu um pequeno aumento de células apoptóticas (tempo dependente), quando comparadas às células controle (Figura 17B). No tempo de 6 h o grupo controle e o grupo tratado apresentaram o mesmo número de células apoptóticas (14%), além de ser observado

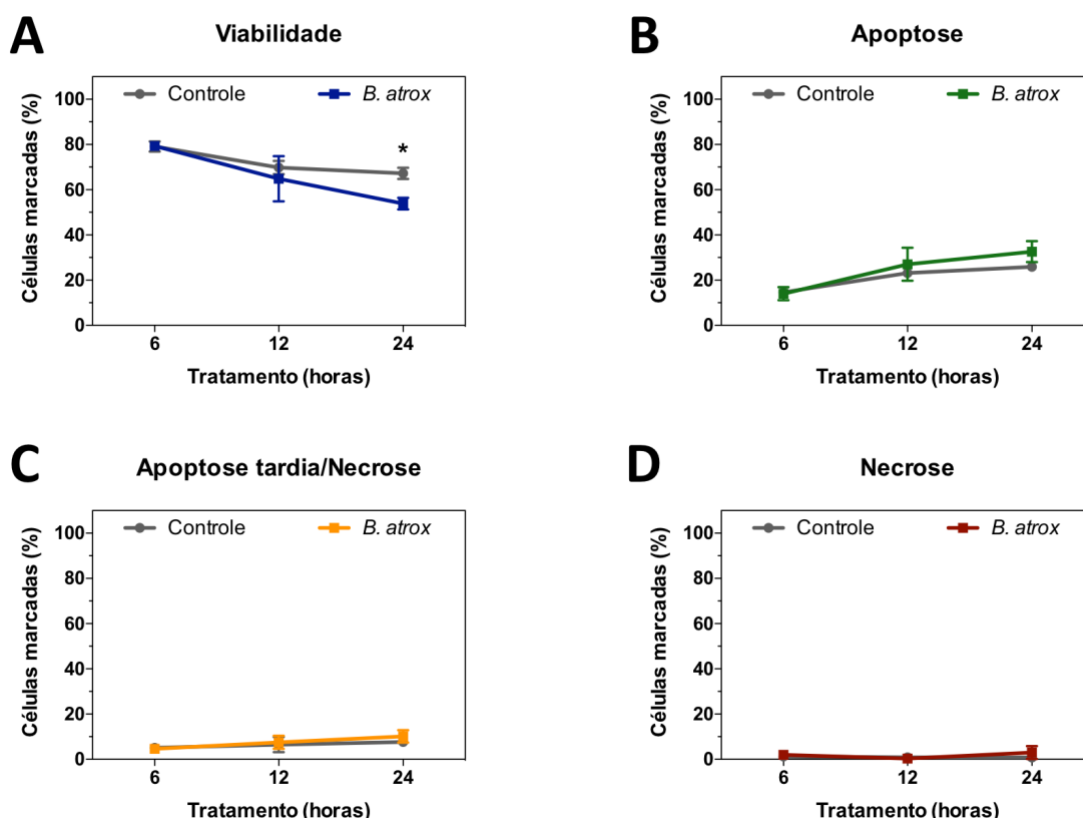
também um perfil similar de eventos apoptóticos, tanto nos *dot plots* (Figura 16A) quanto nos histogramas (Figura 16B). Após 12 h de tratamento o grupo controle apresentou 23% de células apoptóticas, sendo que no grupo tratado esse número foi de 27%. Nota-se uma pequena mudança na distribuição dos eventos apoptóticos tanto quando se compara grupo controle com grupo veneno, quanto quando se compara células tratadas com veneno por 6 e 12 horas (Figura 16A e B). No tempo de 24 horas, o número de células em apoptose foi de 26% para células controle e de 32% para células tratadas (Figura 17B). As células controles e células tratadas apresentaram um perfil similar nos *dot plots* e histogramas (Figura 16A e B). Em nenhum dos tempos analisados a diferença entre grupos tratado e controle foi estaticamente significativa, sugerindo que o veneno, na concentração utilizada, não induz apoptose.

O iodeto de propídeo foi utilizado para marcar células necróticas, uma vez que este reagente só é capaz de penetrar e se ligar a ácidos nucleicos de células com membrana comprometida. Não foi detectado número significativo de células com dupla marcação (Anexina-V e Iodeto de propídeo), que são consideradas células em apoptose tardia ou necróticas, em nenhum dos tempos testados para nenhum dos grupos (Figura 17C).

Não houve aumento significativo de células necróticas (marcadas somente com Iodeto de propídeo) após tratamento com veneno, para nenhum dos tempos testados (Figura 17D). Seis horas após incubação com veneno foram detectadas poucas células marcadas com Iodeto de propídeo tanto no controle quanto no grupo tratado (médias de aproximadamente 5%). Após 12 h de tratamento o grupo controle apresentou 6,5% de células necróticas, enquanto no grupo tratado a média foi de 7,5%. Houve um aumento após 24 h de incubação (controle =7,6%; veneno= 10%), porém não significativo.



**Figura 16: Análise de eventos apoptóticos e necróticos em queratinócitos tratados com *B. atrox*.** (A) *Dot plots* de células marcadas com Anexina-V e/ou Iodeto de propídeo. Queratinócitos foram tratados com 0,5 DC<sub>50</sub> de veneno por 6, 12 e 24 horas e células não tratadas foram usadas como controle negativo. Estaurosporina 1μM e Triton X-100 0,1% foram utilizados para induzir apoptose e necrose, respectivamente. (B) Histogramas representativos da distribuição de marcação por Anexina-V FITC de células controles e tratadas. As células foram marcadas com Anexina V-FITC (1:500), Iodeto de propídeo (PI-5μg/mL) e Hoechst (1:3000). Gráficos representativos de um experimento. Análise feita utilizando o software NucleoView NC-3000.



**Figura 17: Análise de apoptose e necrose após tratamento com veneno de *B. atrox*.** As células foram tratadas com 0,5 DC<sub>50</sub> de veneno por 6, 12 e 24 horas e apoptose foi avaliada por citometria de fluxo. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. (A) Células viáveis (não marcadas). (B) Células em apoptose (marcadas com Anexina V-FITC). (C) Células em apoptose/necrose (duplamente marcadas com Anexina-V e Iodeto de propídeo). (D) Células necróticas (marcadas com Iodeto de propídeo). Os valores representam médias de três ensaios independentes e a barra de erros indica o erro padrão da média. (\* $p < 0,05$ ).

O potencial de membrana mitocondrial foi verificado em células tratadas com veneno de *B. atrox* (0,5 DC<sub>50</sub>) por 12 e 24 horas. Como controle negativo, foram utilizadas células incubadas apenas com meio FAD suplementado com 1% de SFB e como controle positivo foi usado FCCP (50 μM). Para mensurar a despolarização da membrana mitocondrial, foi utilizado

o reagente JC-1. A Figura 18 mostra os gráficos contendo *dot plots* representativos do ensaio de alteração do potencial mitocondrial.

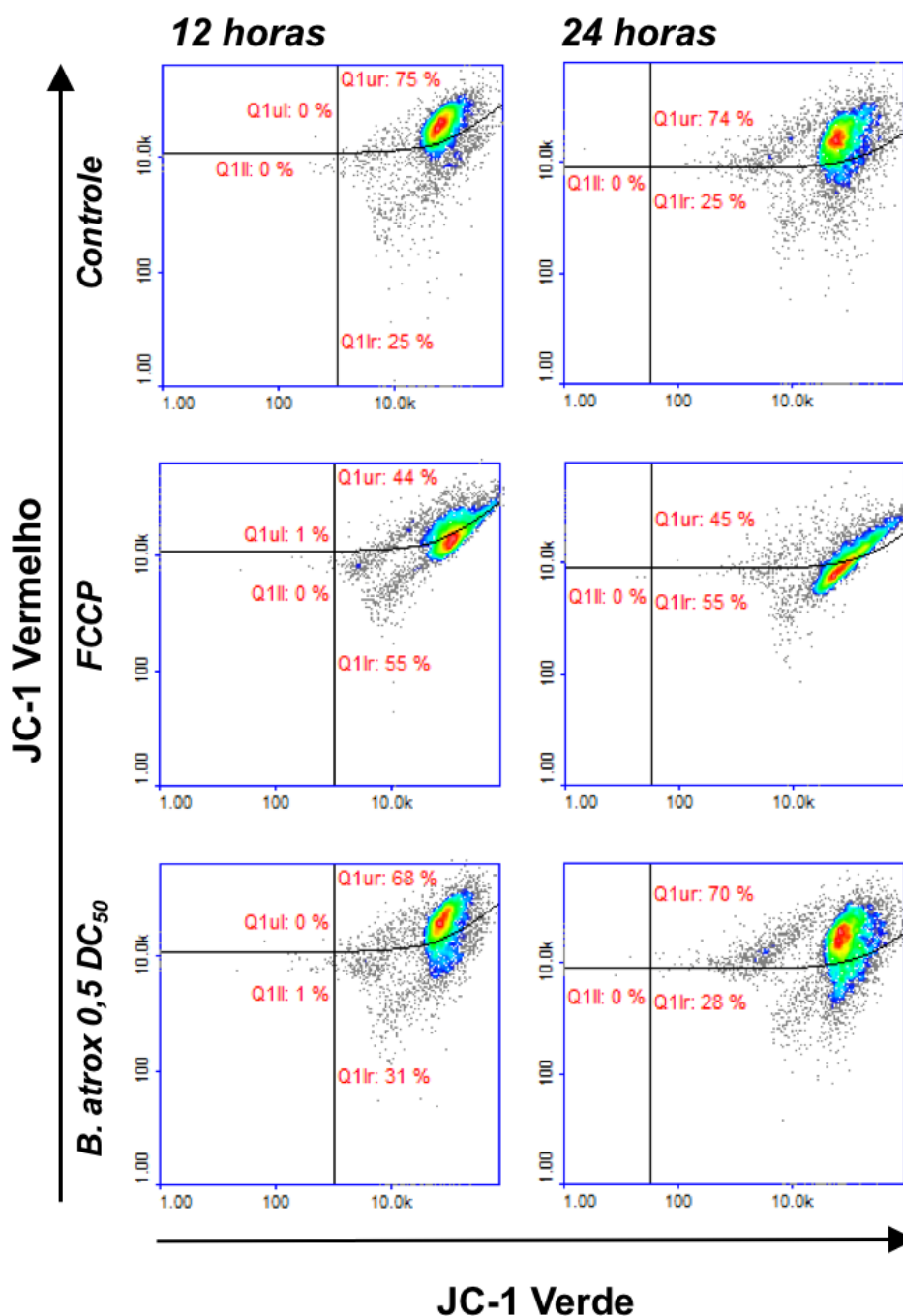
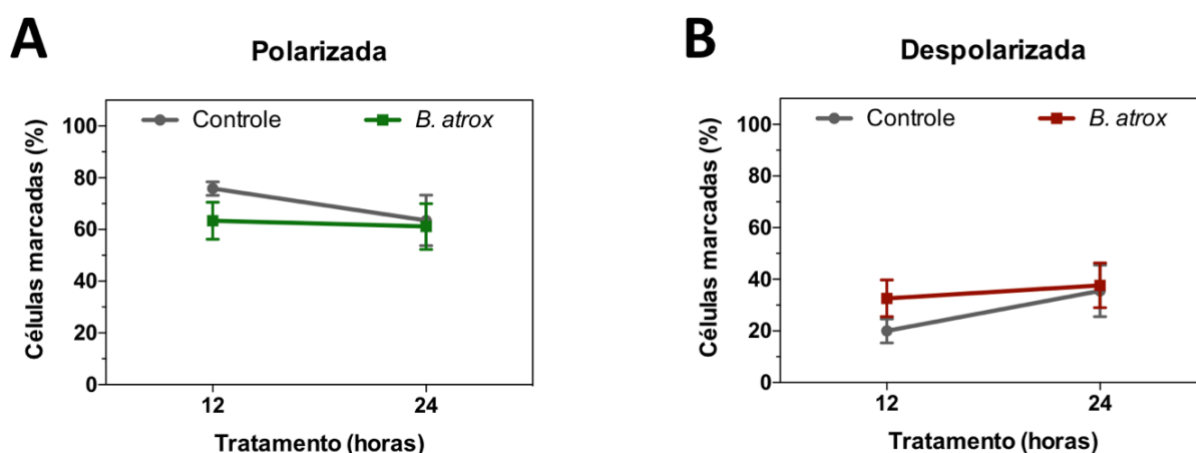


Figura 18: Análise do potencial de membrana mitocondrial de células tratadas com veneno de *B. atrox*. *Dot plots* mostrando células marcadas com JC-1. Queratinócitos foram tratados com 0,5 DC<sub>50</sub> de veneno por 6, 12 e 24 horas e células não tratadas foram usadas como controle negativo. FCCP 50 μM foi utilizado como controle positivo. Gráficos representativos de um experimento. Análise feita utilizando o software NucleoView NC-3000.

A porcentagem de células polarizadas e despolarizadas foi calculada e as médias plotadas nos gráficos da Figura 19. O número de células controle polarizadas caiu de 76% (12 horas) para 61% (24 horas) e de despolarizadas variou entre 20% (12 horas) e 35% (24 horas). No grupo controle, foi observado 63% de células polarizadas no tempo de 12 horas e 61% após 24 horas de tratamento. A despolarização nas células tratadas variou de 32% após 12 horas a 35% após 24 de tratamento. Não houve diferença estatística entre grupo controle e o tratado.



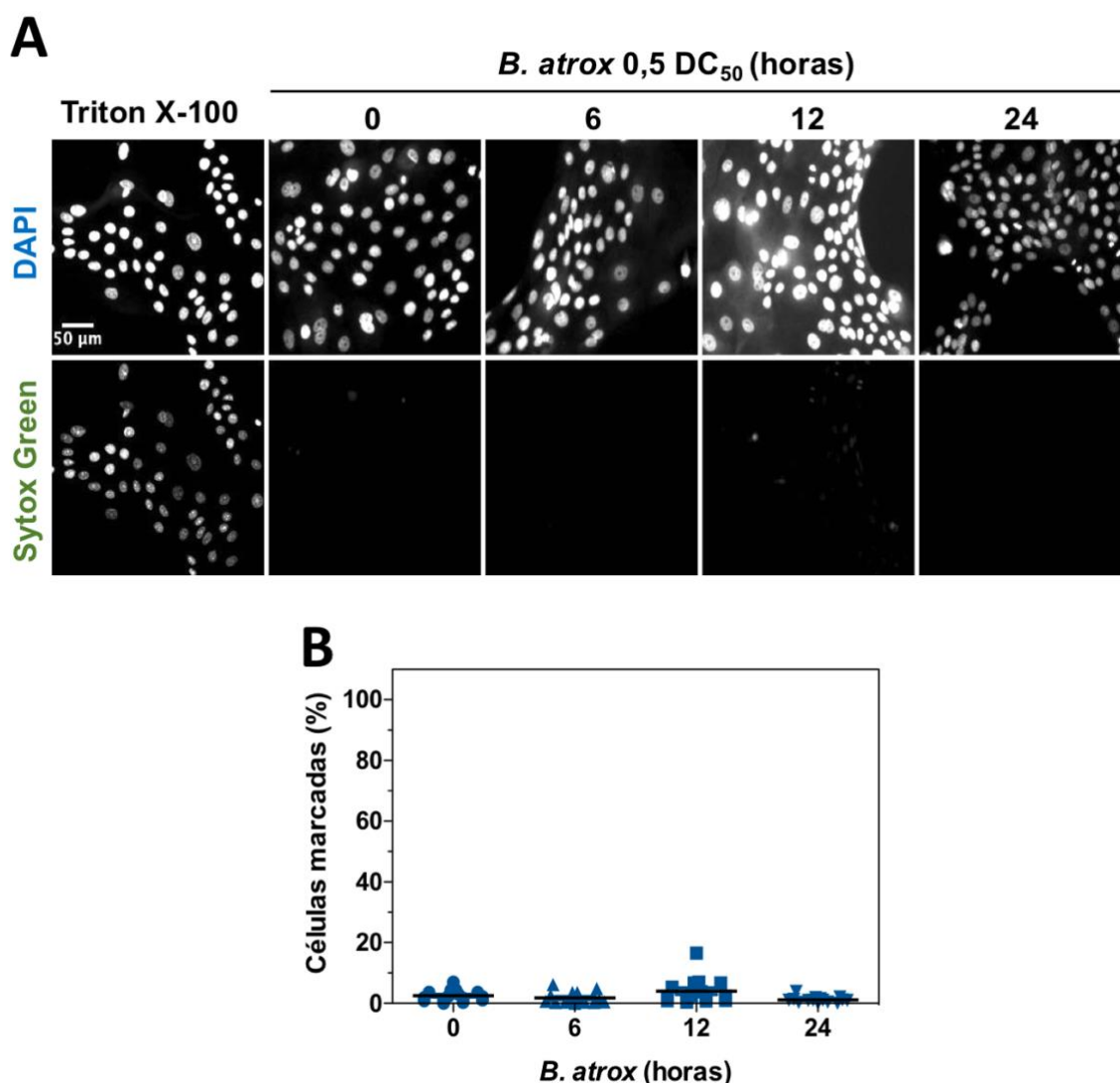
**Figura 19: Potencial de membrana mitocondrial em células tratadas com o veneno de *B. atrox* (0,5 DC<sub>50</sub>).** (A) Queratinócitos com membrana mitocondrial polarizada. (B) Queratinócitos com membrana mitocondrial despolarizada. Os valores representam médias de pelo menos três ensaios independentes e a barra de erros indica o erro padrão da média.

Adicionalmente, avaliou-se morte por necrose utilizando o reagente Sytox Green que possui o mesmo princípio que Iodeto de propídeo, porém, após se ligar em ácidos nucleicos, apresenta um aumento de 500 vezes na fluorescência emitida, sendo, portanto, mais sensível.

Os queratinócitos foram incubados com o veneno de *B. atrox* diluído em meio FAD contendo 1% de SFB por 6, 12 e 24 horas. Como controle negativo foram utilizadas células tratadas apenas com FAD (1%) e como controle positivo as células foram tratadas com Triton X-100 0,1% por 3 horas. As células foram coradas com DAPI e Sytox Green. O número total de células foi obtido pela contagem de núcleos corados com DAPI, enquanto os núcleos de células necróticas foram quantificados utilizando o canal de Sytox Green. A porcentagem de células necróticas foi calculada dividindo o número de células necróticas pelo número de células totais.



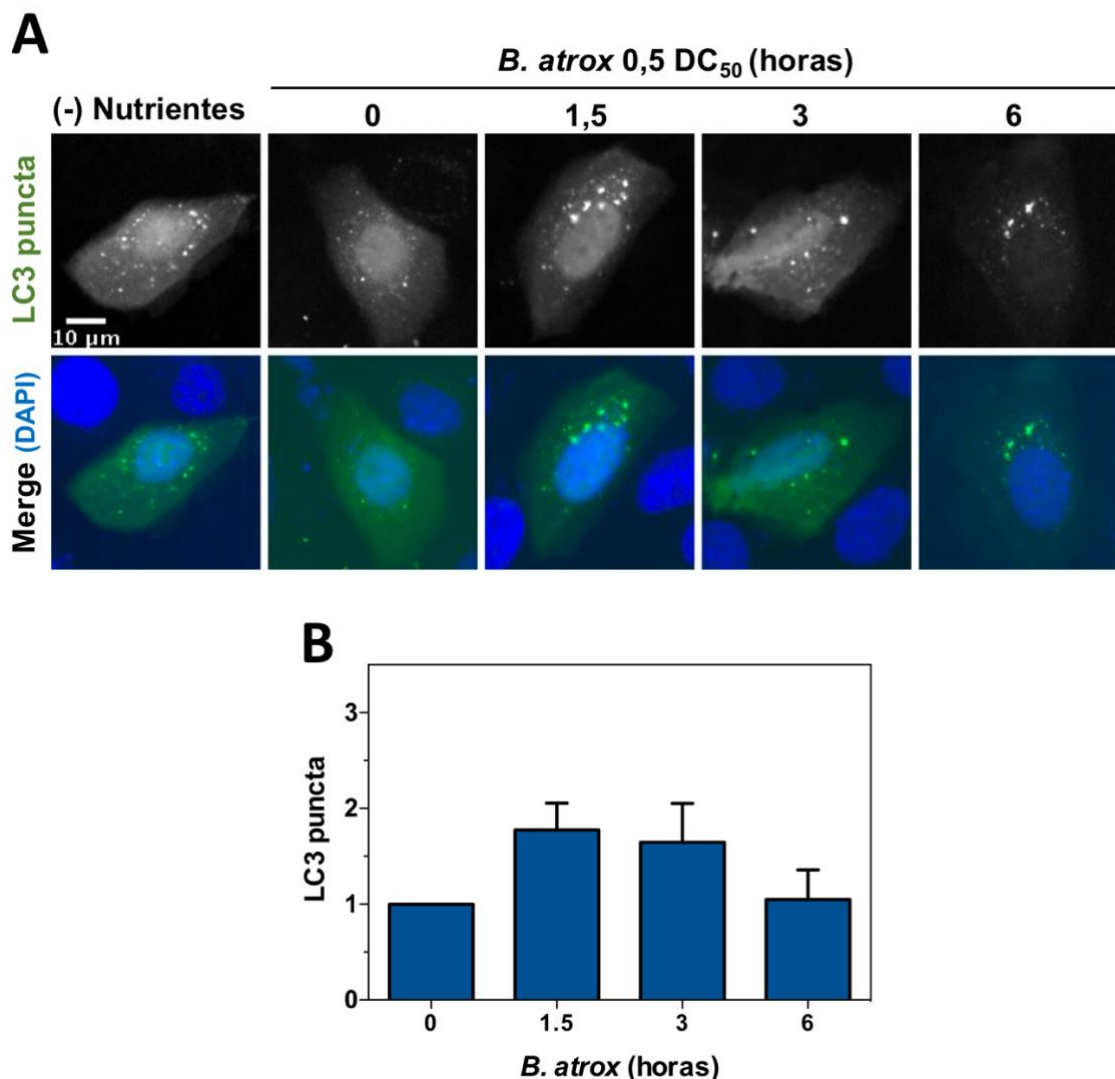
Comparando os canais DAPI e Sytox Green (Figura 20A), é possível observar que para o controle positivo, todos os núcleos corados com DAPI foram também corados com Sytox Green, o que comprova a confiabilidade deste método. As células do controle negativo assim como as células tratadas foram devidamente quantificadas e o resultado é mostrado na Figura 20B. Observa-se que a média da porcentagem de células necróticas é menor do que 10% em todos os grupos analisados, não havendo diferença estatística entre eles.



**Figura 20: Avaliação da necrose em queratinócitos tratados com o veneno de *B. atrox*.** **(A)** Imagens representativas de células coradas com DAPI e Sytox Green. Triton X-100 0,1% (3 horas de tratamento) foi utilizado como controle positivo, enquanto células não tratadas serviram como controle negativo. Células foram tratadas com 0,5 DC<sub>50</sub> de veneno de *B. atrox* por 6, 12 e 24 horas e em seguida fixadas, coradas e analisadas por microscopia de fluorescência. **(B)** Quantificação da porcentagem de células necróticas feita utilizando software FIJI. Os valores representam médias de pelo menos três ensaios independentes e a barra de erros indica o erro padrão da média.

Com os resultados de morte celular mostrados até o presente momento, conclui-se que apesar do veneno de *B. atrox* (0,5 DC<sub>50</sub>) induzir uma diminuição na viabilidade celular, não foi possível detectar um número relevante de eventos apoptóticos e/ou necróticos. Resolveu-se então avaliar uma terceira via de morte celular, a autofagia.

Os queratinócitos foram transfectados com LC3 fusionada a GFP visando a identificação de autofagossomos. Como controle positivo, as células receberam meio depletado de nutrientes (EBSS) e foram incubadas por 30 minutos. As células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. Os queratinócitos foram incubados com 0,5 DC<sub>50</sub> de veneno de *B. atrox* por 1,5; 3 e 6 horas. A Figura 21A mostra imagens representativas de células transfectadas. Foi possível visualizar a formação de LC3 puncta nas células que tiveram nutrientes depletados, assim como nas células controle (tempo 0), porém esta última apresentou menor número de vesículas. Após 1,5 e 3 horas observa-se um aumento de puncta, voltando a diminuir depois de 6 h de tratamento. O número de LC3 puncta de cada célula foi quantificado utilizando o software FIJI. Os valores foram normalizados (considerando o controle negativo=1) e as médias foram plotadas na Figura 21B. Nota-se que a alteração no número de LC3 puncta não foi estatisticamente significativa em nenhum dos tempos testados.



**Figura 21: Análise da autofagia em queratinócitos tratados com veneno de *B. atrox*.** (A) Imagens representativas de células transfectadas com LC3-GFP. As células foram tratadas com 0,5 DC<sub>50</sub> de veneno por 1,5; 3 e 6 horas. Células transfectadas e não tratadas foram utilizadas como controle negativo e células tratadas com meio EBSS (meio depletado de nutrientes) por 3 horas serviram de controle positivo. Após tratamento as células foram fixadas e coradas com DAPI para identificação e contagem dos núcleos. (B) Quantificação de LC3 punta por célula transfectada. As células foram analisadas em microscópio de fluorescência e o número de LC3 punta foi calculado. Os valores representam médias de três ensaios independentes e a barra de erros indica o erro padrão da média.

Com bases em todos os ensaios feitos para avaliar a via de morte celular desencadeada pelo veneno, conclui-se que, apesar de causar uma pequena diminuição na viabilidade celular de queratinócitos, 0,5 DC<sub>50</sub> não foi suficiente para causar apoptose, necrose ou autofagia nos tempos testados. Provavelmente a diminuição da viabilidade celular induzida pela concentração usada foi insuficiente para detectar o mecanismo de morte celular, limitados pela sensibilidade das técnicas.

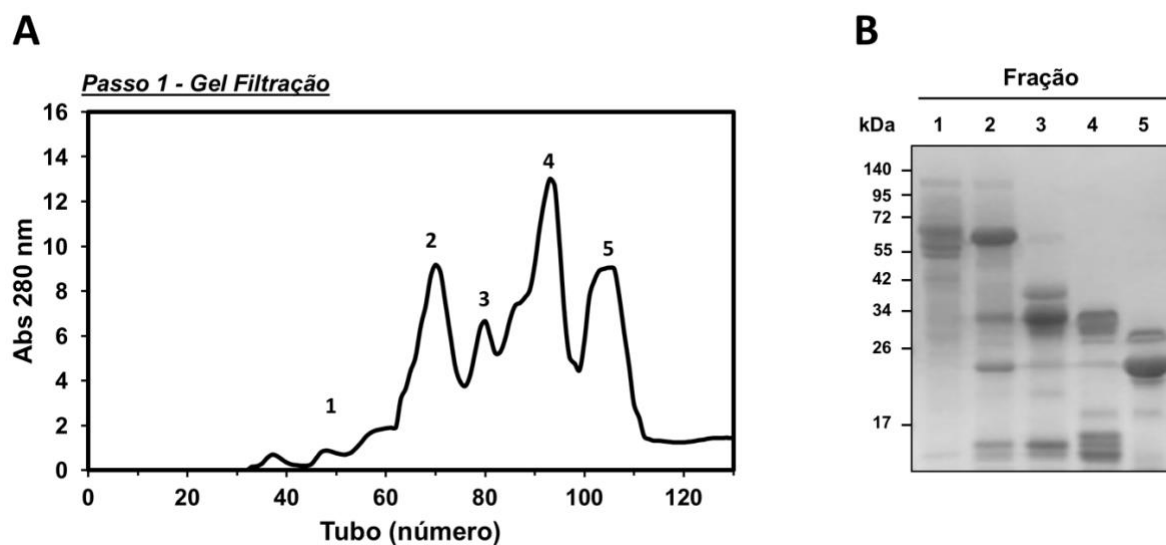
De acordo com resultados obtidos para tratamento de queratinócitos com o veneno de *B. atrox*, é possível concluir que apesar das alterações de morfologia observadas, as células se mantêm viáveis por longos períodos (viabilidade diminui consideravelmente apenas após 24 horas). Sendo assim, as mudanças no citoesqueleto precedem a diminuição da viabilidade celular.

#### 4.2 PURIFICAÇÃO DA LAAO E ANÁLISE DAS FRAÇÕES DO VENENO

Tendo em vista a sabida ação citotóxica da LAAO, essa proteína foi escolhida para ter o seu papel na morte celular estudado.

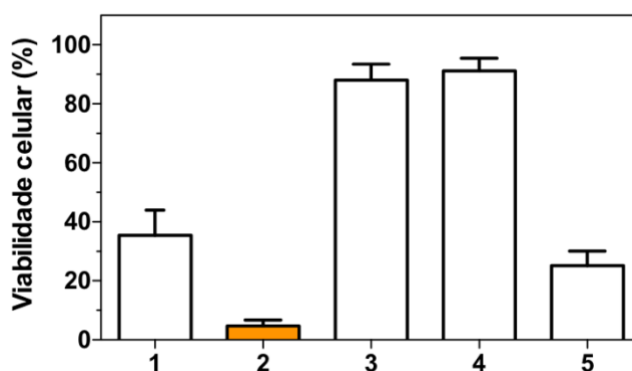
Para purificação de LAAO foram necessários três passos cromatográficos, (1) gel filtração, (2) troca iônica e (3) afinidade, que serão discutidos em detalhes a seguir. Após cada cromatografia, as frações tiveram seu conteúdo analisado por SDS-PAGE e as atividades de LAAO e citotoxicidade foram avaliadas.

O veneno total de *B. atrox* foi fracionado, primeiramente, por cromatografia de gel filtração. A amostra foi aplicada em coluna contendo resina Sephacryl S-200 previamente equilibrada com tampão acetato de sódio. A eluição das frações foi acompanhada por espectrofotometria a 280 nm e o perfil cromatográfico foi gerado (Figura 22A). O perfil proteico dos tubos foi avaliado e o material coletado foi dividido em 5 frações principais, nomeadas como Fração-1, Fração-2, Fração-3, Fração-4 e Fração-5. O Conteúdo proteico das frações pode ser verificado na Figura 22B.



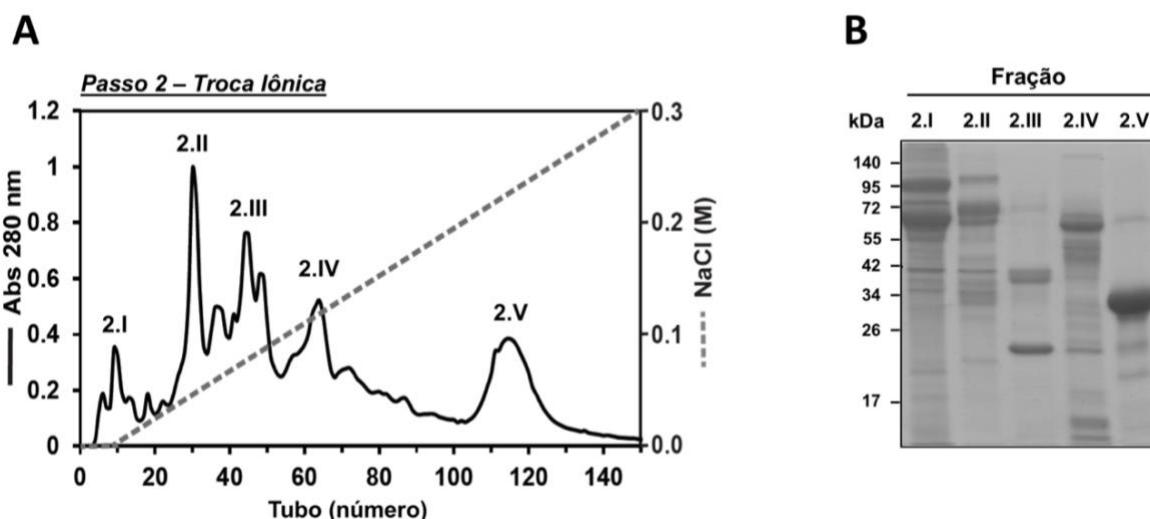
**Figura 22: Cromatograma representativo da purificação em coluna de gel filtração Sephacryl S-200 e perfil proteico das frações.** Veneno de *B. atrox* foi aplicado em colunas em série (2,5 x 100 cm) contendo resina Sephacryl S-200. **(A)** As proteínas foram eluídas com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 7.5) contendo 0,3 M de NaCl e 0,02% de azida sódica e as absorvâncias foram analisadas a 280nm. **(B)** Conteúdo proteico das frações S200-1 (1), S200-2 (2), S200-3 (3), S200-4 (4) e S200-5 (5) foi avaliado em SDS-PAGE 12% em condições redutoras. Foram aplicados 15 µg de cada uma das amostras e as bandas foram coradas por Coomassie Blue.

Foi realizada a atividade de LAAO das frações obtidas e observou-se que a Fração-2 continha esta atividade. A fim de avaliar se as frações seriam capazes de reduzir a viabilidade celular, os queratinócitos foram tratados por 24 horas com 40 µg/mL de cada uma das amostras e a viabilidade celular foi determinada utilizando Alamar Blue (Figura 23). A concentração utilizada foi escolhida por ter sido a concentração máxima testada para o veneno, tentando evitar assim, um resultado falso negativo. Atividade de viabilidade celular de células tratadas com as frações revelou que a Fração-1, Fração-2 e Fração-5 foram citotóxicas para queratinócitos, sendo a Fração-2 destacou-se por ser a mais citotóxica e por conter atividade de LAAO (destacada em laranja na Figura 23).



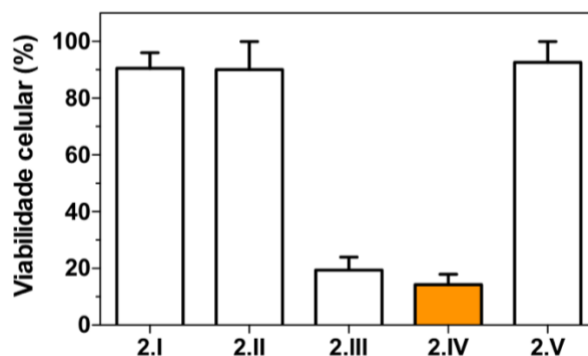
**Figura 23: Ensaio de citotoxicidade das frações da cromatografia de Sephacryl S-200, destacando em laranja a fração com atividade de LAAO.** Para o ensaio de viabilidade celular, queratinócitos foram incubadas com 40 $\mu$ g/mL do veneno e após 24 horas a viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de Alamar Blue. Os valores representam médias de três ensaios independentes e a barra de erros indica o erro padrão da média. Para atividade de LAAO, amostras (2 $\mu$ g) foram incubadas com solução Tris-HCl contendo 5 mM de L-leucina, *horseradish* peroxidase 5 IU/mL, 2 mM de OPD. Após 1 hora de incubação a 37°C a reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu$ L de de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. A absorbância foi determinada a 490nm.

A Fração-2 foi então selecionada por apresentar atividade de LAAO e submetida à cromatografia de troca iônica. A amostra foi aplicada em uma coluna contendo a resina DEAE Sepharose CL-6B previamente equilibrada com tampão Tris 50 mM pH 8,5. A eluição foi feita através de um gradiente linear de 0-0,3 M de NaCl e o perfil cromatográfico foi gerado utilizando os valores de absorbância a 280 nm (Figura 24A). O material eluído foi agrupado em 5 frações principais de acordo com o teor proteico dos tubos (Fração-2.I, Fração-2.II, Fração-2.III, Fração-2.IV, Fração-2.V). A eletroforese mostrando o perfil proteico das frações pode ser visualizada na Figura 24B.



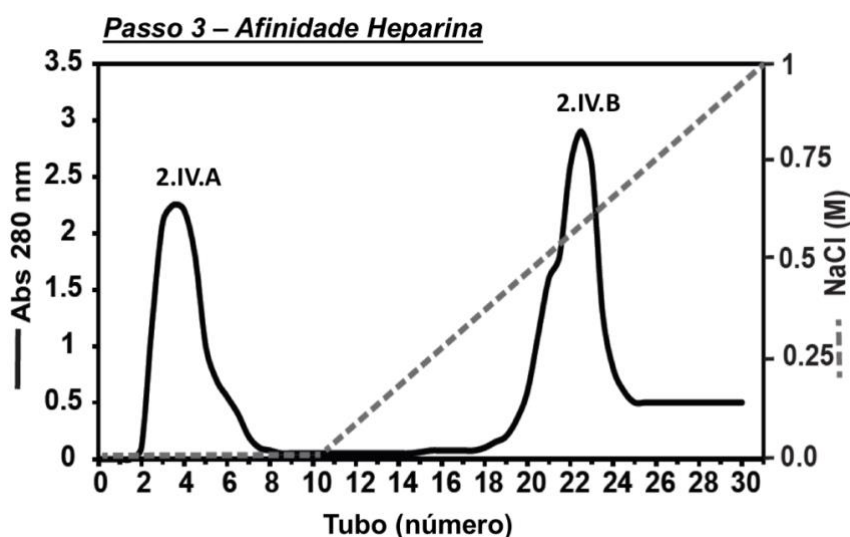
**Figura 24: Cromatograma representativo da purificação em coluna troca iônica em coluna DEAE Sepharose CL-6B e conteúdo das frações. (A)** A Fração-2 proveniente da cromatografia de gel filtração foi refracionada em coluna DEAE Sepharose CL 6B equilibrada com Tampão Tris 50 mM pH8,5. As proteínas foram eluídas com gradiente linear 0-0,3 M de NaCl e monitoradas a 280 nm. **(B)** Perfil proteico das frações 2.1, 2.2, 2.3, 2.4 e 2.5. Foram aplicados 15 µg de cada fração em gel de poliacrilamida 12%, em condições redutoras e as bandas foram reveladas utilizando Coomassie Blue.

A atividade de LAAO das cinco frações foi avaliada e esta atividade foi detectada na Fração-2.IV. Foi analisada a viabilidade celular de queratinócitos tratados com 40 µg/mL de cada fração por 24 horas. Conforme pode ser observado na Figura 25, a Fração-2.I, Fração-2.II, Fração-2.V não apresentaram citotoxicidade significativa. No entanto, a Fração-2.III e Fração-2.IV reduziram a viabilidade celular para 19,3 e 14,2%, respectivamente. Percebe-se que a fração mais tóxica também apresentou atividade de LAAO (Fração-2.IV- destacada em laranja).



**Figura 25: Ensaio de citotoxicidade das frações provenientes da cromatografia de troca iônica, destacando em laranja a fração com atividade de LAO.** Para o ensaio de viabilidade celular, células foram incubadas com 40µg/mL do veneno e após 24 horas a viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de Alamar Blue. Os valores representam médias de três ensaios independentes e a barra de erros indica o erro padrão da média. Para atividade de LAO, as frações (2µg) foram incubadas com tampão Tris-HCl contendo 5 mM de L-leucina, *horseradish* peroxidase 5 IU/mL, 2 mM de OPD. Após 1 hora de incubação a 37°C a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. A absorbância foi determinada a 490nm.

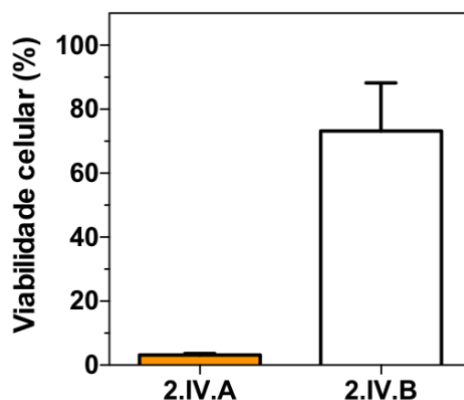
Visando a obtenção da LAO purificada, a Fração-2.IV foi submetida a cromatografia de afinidade HiTrap Heparin Hp. As proteínas ligadas foram eluídas por meio de gradiente linear de 0-1 M de NaCl e o perfil cromatográfico foi gerado utilizando os valores de absorbância a 280 nm (Figura 26). As frações foram separadas em Fração-2.IV.A e Fração-2.IV.B.



**Figura 26: Cromatograma representativo da purificação em coluna de afinidade por heparina.** A Fração-2.IV foi aplicada em coluna de afinidade HiTrap Heparin Hp (1,6 x 2,5cm) equilibrada com Tampão Tris 1 mM pH 6,0 contendo benzamidina 1mM. As proteínas foram eluídas com gradiente linear de 0-1 M de NaCl e o perfil cromatográfico foi gerado a partir das absorbâncias a 280 nm.

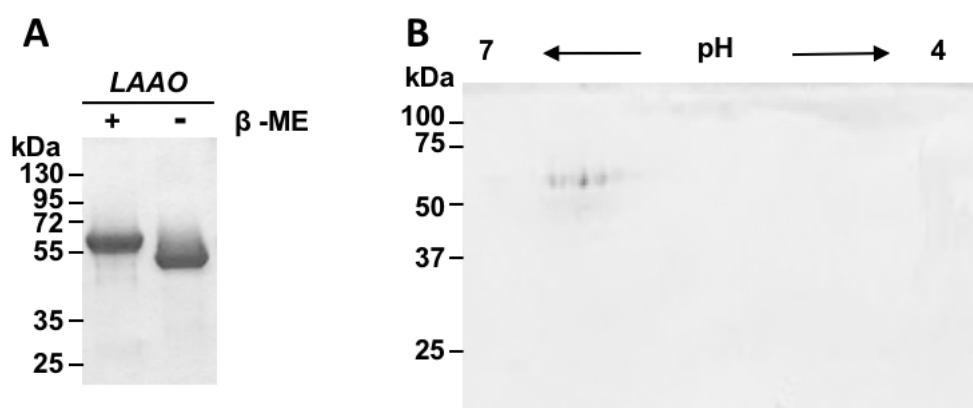


Por meio do ensaio de atividade de LAAO observou-se que a Fração 2.IV.A apresentava essa atividade. A atividade citotóxica das Fração-2.IV.A e Fração-2.4.B foi testada e, como pode ser observado na Figura 27, a Fração-2.IV.A apresentou maior citotoxicidade e é destacada em laranja por apresentar atividade de LAAO.



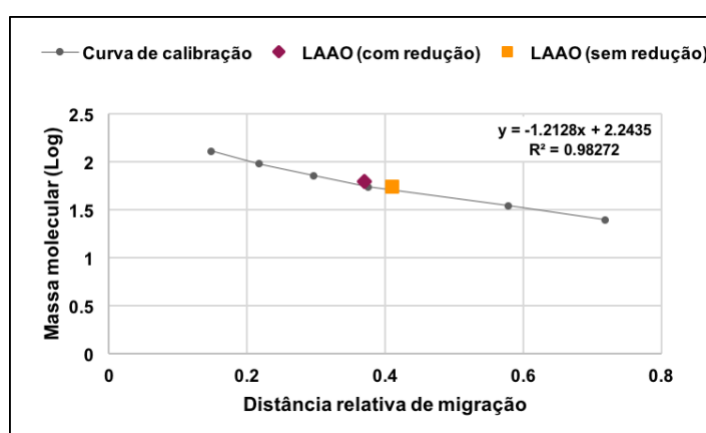
**Figura 27: Ensaio de citotoxicidade das frações da cromatografia de afinidade, destacando em laranja a atividade a fração com atividade de LAAO.** Viabilidade celular de queratinócitos incubados com 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Fração-2.4.A e Fração-2.4.B. Os valores representam médias de três ensaios independentes e a barra de erros indica o erro padrão da média. Para atividade de LAAO, as frações (2 $\mu\text{g}$ ) foram incubadas com solução Tris-HCl contendo 5 mM de L-leucina, *horseradish* peroxidase 5 IU/mL, 2 mM de OPD. Após 1 hora de incubação a 37°C a reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 M. A absorbância foi determinada a 490nm.

A análise do conteúdo proteico da Fração-2.4.A (15  $\mu\text{g}$ ) por SDS PAGE mostrou a presença de apenas uma banda, tanto quando em condições redutoras (+  $\beta$ -mercaptoetanol), quanto quando em condições não redutoras (-  $\beta$ -mercaptoetanol), levando a concluir que esta amostra se tratava da LAAO purificada (Figura 28A). A eletroforese bidimensional demonstrou a presença de 9 spots com pontos isoelétricos variando de 5.9 a 6.5 (Figura 28B).



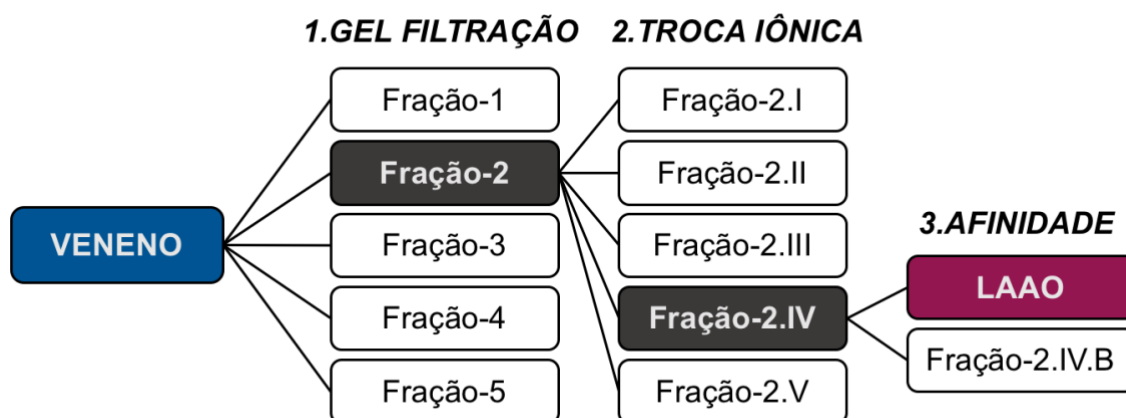
**Figura 28: Verificação da pureza de LAAO.** (A) SDS-PAGE mostrando apenas uma banda. As amostras (15 µg) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12% na presença (+) ou ausência (-) de β-mercaptoetanol (β-met). As bandas foram coradas por Coomassie Blue. (B) SDS-PAGE bidimensional da LAAO (30µg). A primeira dimensão foi realizada em uma strip de 7 cm de pH 4-7 e a eletroforese foi feita em gel contendo 12% de acrilamida.

A massa molecular da banda (com redução) de LAAO observada foi calculada através de uma curva de calibração utilizando o padrão de massa molecular como base (Figura 29). O Logaritmo da massa molecular foi calculado e plotado em função da distância relativa de migração (distância de migração da proteína/distância de migração do corante). A equação da reta foi obtida e o valor da massa molecular de LAAO com e sem redução foi calculado. A proteína em condições redutoras apresentou massa molecular de aproximadamente 62,5 kDa, quando em condições não redutoras este valor foi de aproximadamente 55,8 kDa.



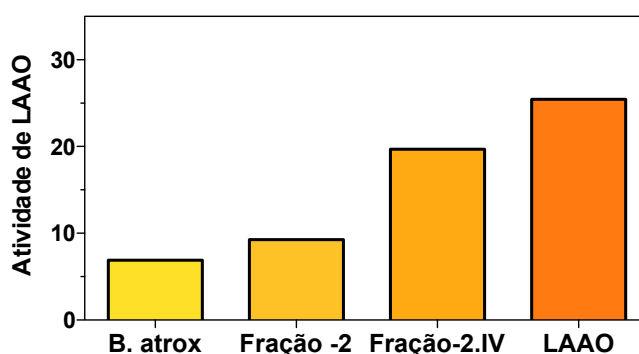
**Figura 29: Determinação da massa molecular de LAAO.** Curva de calibração de log da massa molecular versus distância relativa de migração.

A Figura 30 mostra um esquema simplificado da purificação da LAAO a partir do veneno bruto de *B. atrox*. Foram necessárias três etapas cromatográficas para obtenção da LAAO purificada.



**Figura 30: Esquema das etapas de purificação do veneno.** Destaca-se em cinza escuro as frações com maior citotoxicidade e que foram selecionadas para posterior fracionamento.

Um resumo da atividade de LAAO encontrada no veneno em cada uma das frações utilizadas para a purificação da LAAO pode ser visualizado no Figura 31. Observa-se que a medida que o grau de pureza das frações aumenta, a atividade de LAAO também aumenta.



**Figura 31: Atividade de LAAO do veneno total e frações utilizadas na purificação de LAAO.** Amostras (2µg) foram incubadas com 100 µl de solução Tris-HCl 100 mM pH 8,5 contendo 5 mM de L-leucina, *horseradish peroxidase* 5 IU/mL, 2 mM de OPD. Após 1 hora de incubação a 37°C a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. A absorbância foi determinada a 490nm.

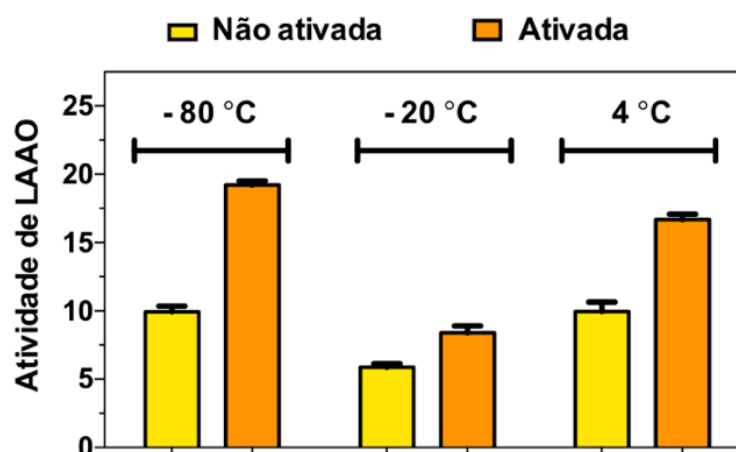
A Tabela 6 mostra o rendimento da purificação e a atividade específica de LAAO das frações. Foi purificado um total de 8150 mg de veneno bruto de *B. atrox*. Dessa quantidade foi possível obter 23,3 mg de LAAO purificada, o que significa que a recuperação da LAAO foi de 0,28%.

**Tabela 6: Etapas da purificação de LAAO.**

Passo	Proteína		Atividade Específica (U/mg)
	mg	%	
<b>Veneno <i>B. atrox</i></b>	8150	100	6,9
<b>Sephacryl S-200</b>	981,6	12	9,25
<b>DEAE Sepharose CL-6B</b>	73,3	0,9	19,7
<b>Heparina</b>	23,3	0,28	25,45

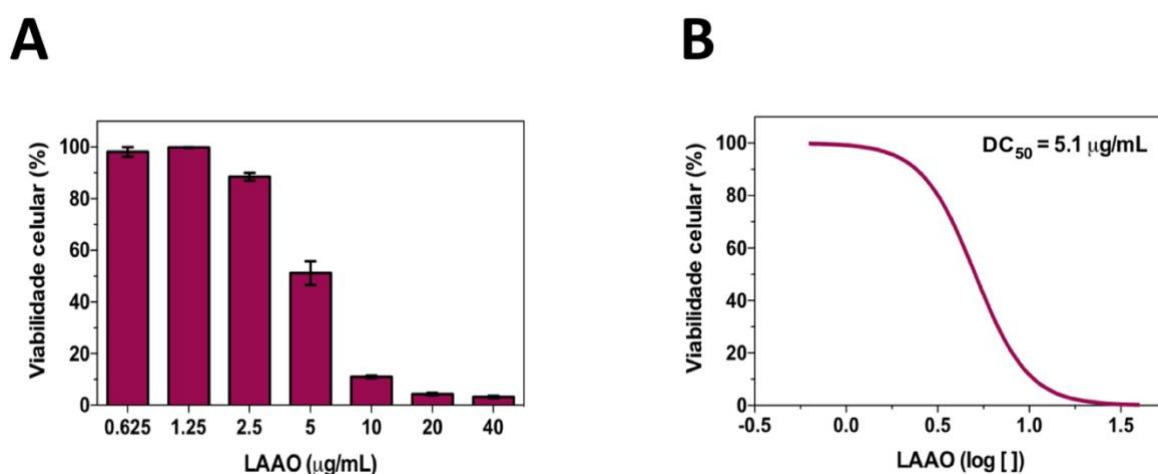
### 4.3 L-AMINOÁCIDO OXIDASE

Sabe-se que as LAAOs são termo lábeis e, por este motivo, foi testada a atividade desta enzima purificada em diferentes temperaturas, com e sem ativação por Tampão Acetato de Amônio pH 5,0. Para este ensaio, a enzima foi mantida na temperatura desejada por pelo menos 5 dias e, em seguida, foi ativada ou não com Tampão acetato de sódio pH 5,0 por 30 minutos a 37 °C. O gráfico da Figura 32 mostra que em todas as temperaturas a ativação da LAAO levou ao aumento da atividade enzimática, sendo que a melhor temperatura para armazenamento de enzima foi de - 80 °C, seguida de 4 °C e por último -20 °C. Usando este ensaio como base, decidiu-se armazenar a proteína sempre a - 80 °C e ativá-la antes do uso.



**Figura 32: Efeito da temperatura e ativação de LAAO na atividade enzimática.** O ensaio foi realizado de acordo com Bregge-Silva (2012) com modificações. Amostras (2  $\mu\text{g}$ ) foram incubadas com 100  $\mu\text{L}$  de solução Tris-HCl 100 mM pH 8,5 contendo 5 mM de L-leucina, horseradish peroxidase 5 IU/mL, 2 mM de OPD. Após 1 hora de incubação a 37°C a reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 M. A absorbância foi determinada a 490 nm. Os valores representam médias de três ensaios independentes e a barra de erros indica o erro padrão da média.

Uma vez obtida a LAAO purificada e definida as melhores condições de armazenamento e uso, resolveu-se avaliar sua citotoxicidade em queratinócitos, assim como determinar sua  $\text{DC}_{50}$ . Como nos ensaios prévios realizados neste trabalho, a viabilidade celular foi determinada utilizando o reagente Alamar Blue. Os queratinócitos foram incubados com LAAO em concentrações variando de 0,625 a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Observou-se que as células tratadas apresentaram redução concentração-dependente da viabilidade celular (Figura 36A) e a  $\text{DC}_{50}$  foi definida como 5,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 33B). Assim como para o veneno de *B. atrox*, foram realizados ensaios pilotos para escolha da concentração de LAAO a ser usada neste trabalho. Para LAAO, a concentração escolhida foi de 2  $\text{DC}_{50}$ , e foi utilizada em todos os ensaios descritos posteriormente.



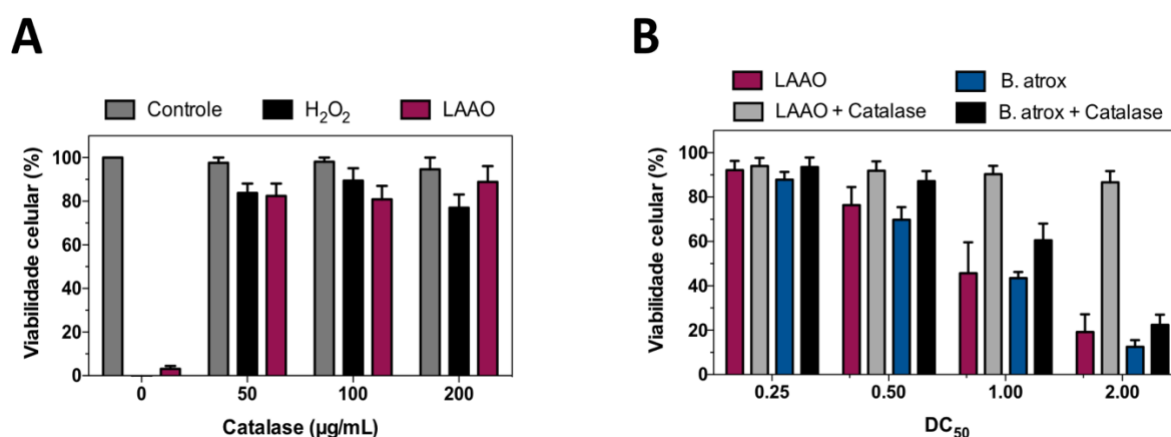
**Figura 33: Citotoxicidade de LAAO em queratinócitos de cultura primária. (A)** Concentração-resposta da citotoxicidade da enzima. **(B)** Cálculo da concentração efetiva do veneno capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% ( $DC_{50}$ ). Células foram incubadas com diferentes concentrações do veneno e após 24 horas de tratamento a viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de Alamar Blue. Os valores representam as médias de três ensaios independentes e a barra de erros indica o erro padrão da média.

Sabe-se que, em geral, o peróxido de hidrogênio liberado durante a reação enzimática desempenha um papel relevante nas atividades biológicas das LAAOs (Izidoro *et al.*, 2014). Dessa forma, resolveu-se testar se a catalase, enzima que catalisa a decomposição de  $H_2O_2$ , seria capaz de diminuir a atividade citotóxica de LAAO em queratinócitos.

Primeiramente foram testadas diferentes concentrações de catalase para definir qual seria a mais apropriada para o experimento (Figura 34A). As células do grupo controle (não tratadas com LAAO) foram incubadas com catalase (0, 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ), enquanto células do grupo tratado receberam LAAO na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$  (concentração capaz de matar mais de 90% das células de acordo com a Figura 33A) com adição das diferentes concentrações de catalase. Como controle positivo foi utilizado peróxido de hidrogênio (5 mM). A concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  foi escolhida para os ensaios posteriores já que foi capaz de aumentar a viabilidade de células tratadas com peróxido de hidrogênio e com LAAO em aproximadamente 90 e 80%, respectivamente.

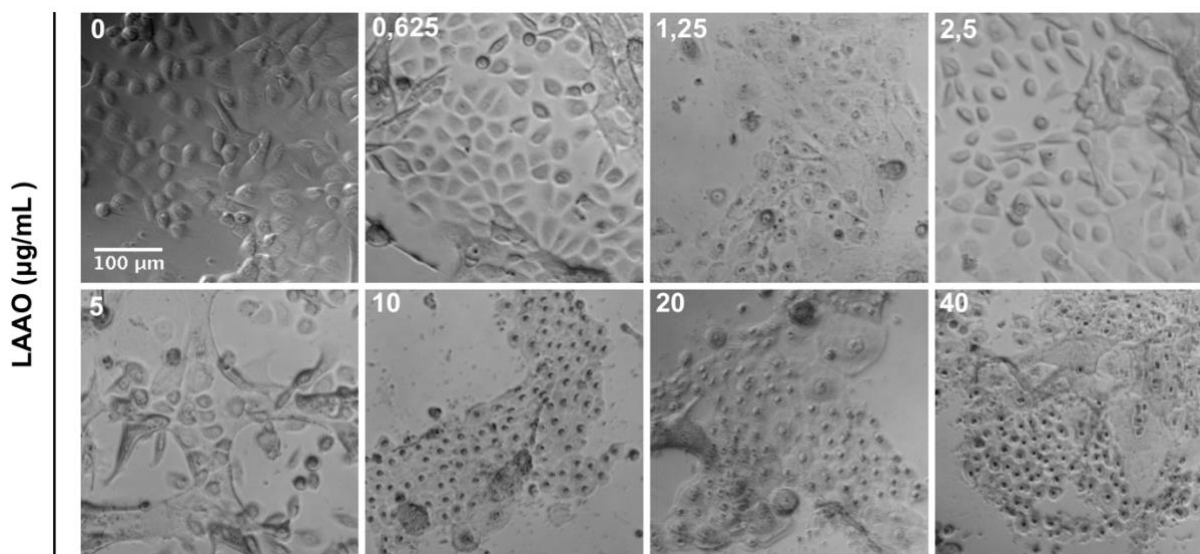
Em seguida, foram testadas diferentes  $DC_{50}$  de LAAO, com ou sem catalase (100  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 34B). Para 0,5  $DC_{50}$  de LAAO, catalase foi capaz de prevenir a citotoxicidade em aproximadamente 15,5%. Quando testada 1  $DC_{50}$  de LAAO, catalase inibiu cerca de 45% da citotoxicidade e para 2  $DC_{50}$  a inibição foi de aproximadamente 67,5%.

Com objetivo de investigar a contribuição indireta da LAAO para a citotoxicidade do veneno de *B. atrox* foi realizado o mesmo ensaio. A diferença da porcentagem de células viáveis quando tratadas com e sem catalase foi de aproximadamente 17,5% para 0,5 DC<sub>50</sub>, 17,2% para 1 DC<sub>50</sub> e 10% para 2 DC<sub>50</sub> (Figura 34B). Para o controle da citotoxicidade da catalase, as células foram incubadas com catalase 100 µg/mL e a média da viabilidade celular foi de 94,1% (dado não mostrado).



**Figura 34: Influência do peróxido de hidrogênio na citotoxicidade de LAAO e do veneno de *B. atrox*.** (A) Inibição da citotoxicidade e LAAO (20 µg/mL) e de peróxido de hidrogênio exógeno (5 mM) por diferentes concentrações da enzima catalase (0, 50, 100 e 200 µg/mL) (B) Efeito da catalase (100 µg/mL) na citotoxicidade de diferentes doses citotóxicas de LAAO e do veneno de *B. atrox*. Células foram incubadas com as amostras com ou sem catalase e após 24 horas de tratamento a viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de Alamar Blue. Os valores representam médias de três ensaios independentes e a barra de erros indica o erro padrão da média.

Para avaliar a morfologia dos queratinócitos após o tratamento, as células foram incubadas com diferentes concentrações de LAAO (0,625 a 40 µg/mL) diluída em FAD contendo 1% de SFB e observadas por microscopia de campo claro. As células controle foram incubadas com o veículo de diluição. É possível observar que células tratadas com 5 µg/mL de LAAO apresentam colônia retraída. Em concentrações iguais ou maiores que 10 µg/mL, foi possível observar que as células se encontravam contraídas, aparentemente mortas e com núcleo picnótico (Figura 35).

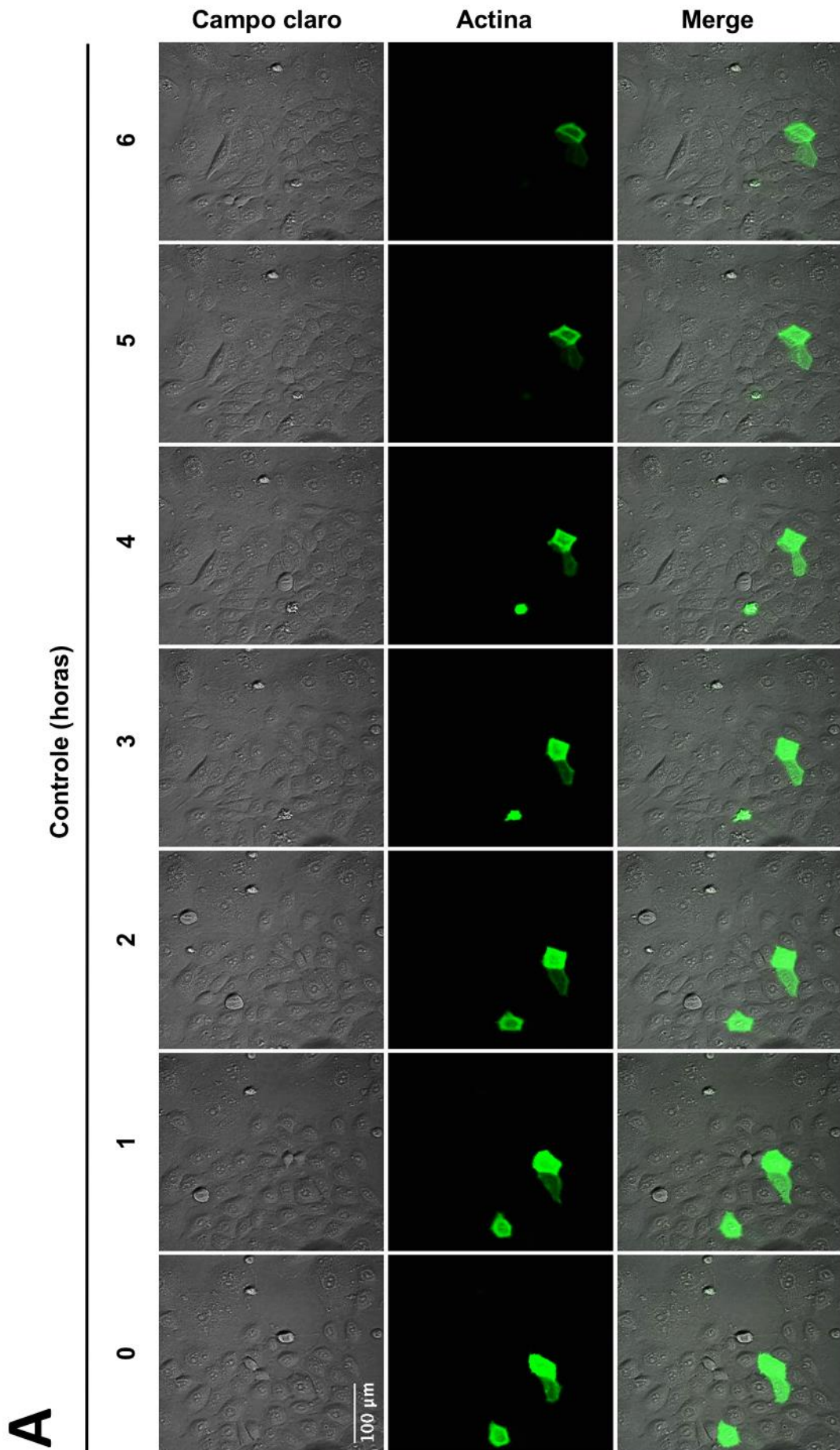


**Figura 35: Aspectos morfológicos de queratinócitos tratados com LAAO.** Células foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da enzima. Células não tratadas, concentração 0, foram consideradas como controle negativo.

Para visualizar como as células responderiam ao tratamento de LAAO em tempo real, os queratinócitos foram incubados com a proteína e observados em microscópio por 6 horas. As células foram transfectadas com plasmídeo contendo domínio de ligação da actina (*Lifect*) acoplado a RFP por 24 horas para visualização da estrutura celular. Os queratinócitos do grupo tratado receberam 2  $DC_{50}$ , enquanto os do grupo controle receberam apenas o veículo de diluição.

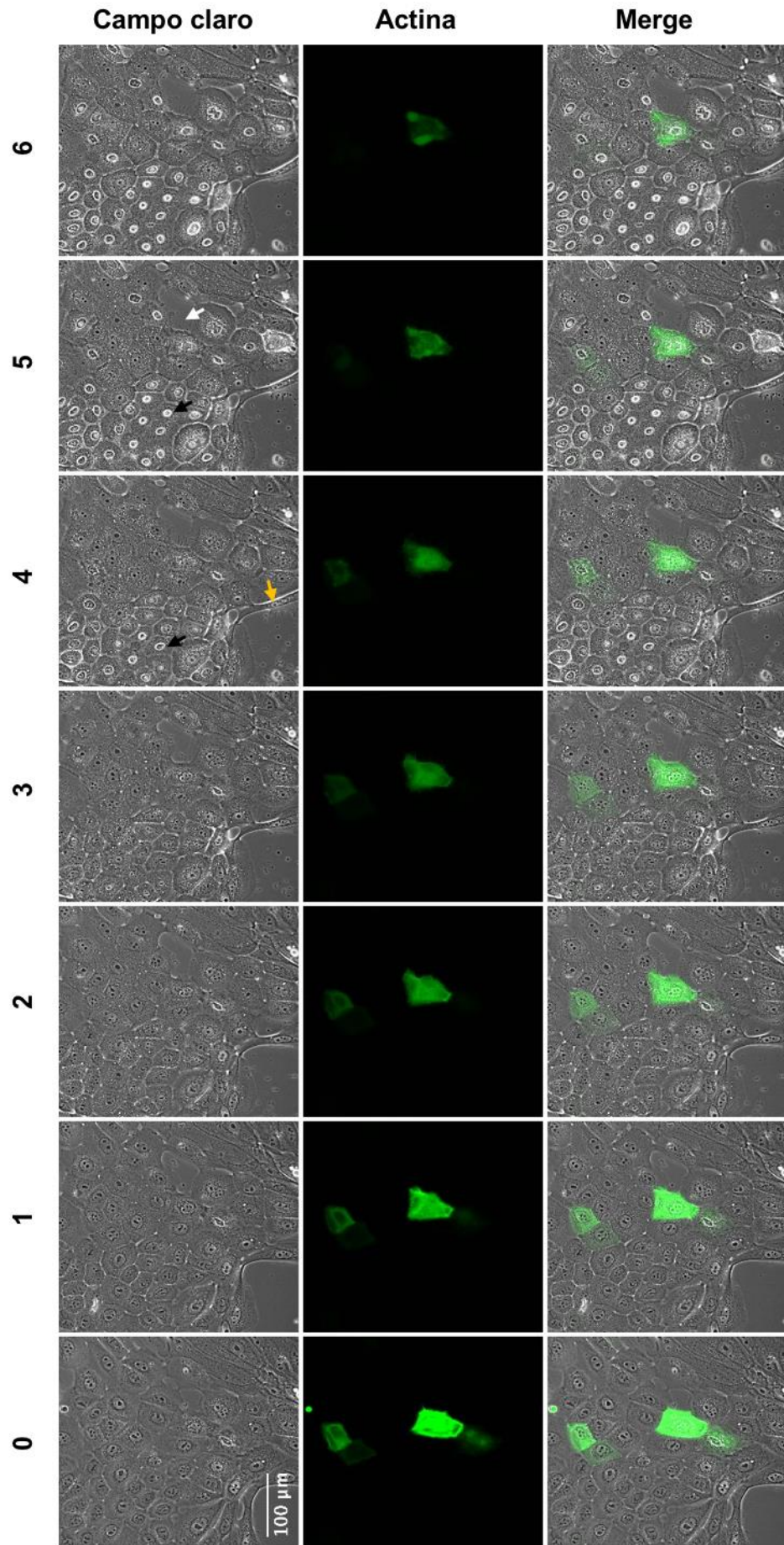
É possível observar que no grupo controle as células se encontram com morfologia normal e bem próximas umas das outras (Figura 36A). Após tratamento, houve alongamento celular (mostrado pela seta amarela – 4 horas de incubação com LAAO) e espaçamento entre as células (seta branca – 5 horas de tratamento com LAAO). Observou-se grande número de células com núcleos picnóticos (setas pretas) a partir de 4 horas de incubação com LAAO (Figura 36B). Uma ampliação da célula transfectada e tratada com LAAO é mostrada na Figura 36C. Nos tempos de 3, 4 e 5 horas de tratamento ficou evidente a presença de prolongamentos anormais na actina (setas brancas). Após 6 horas foi possível observar a presença de bolhas (setas vermelhas).

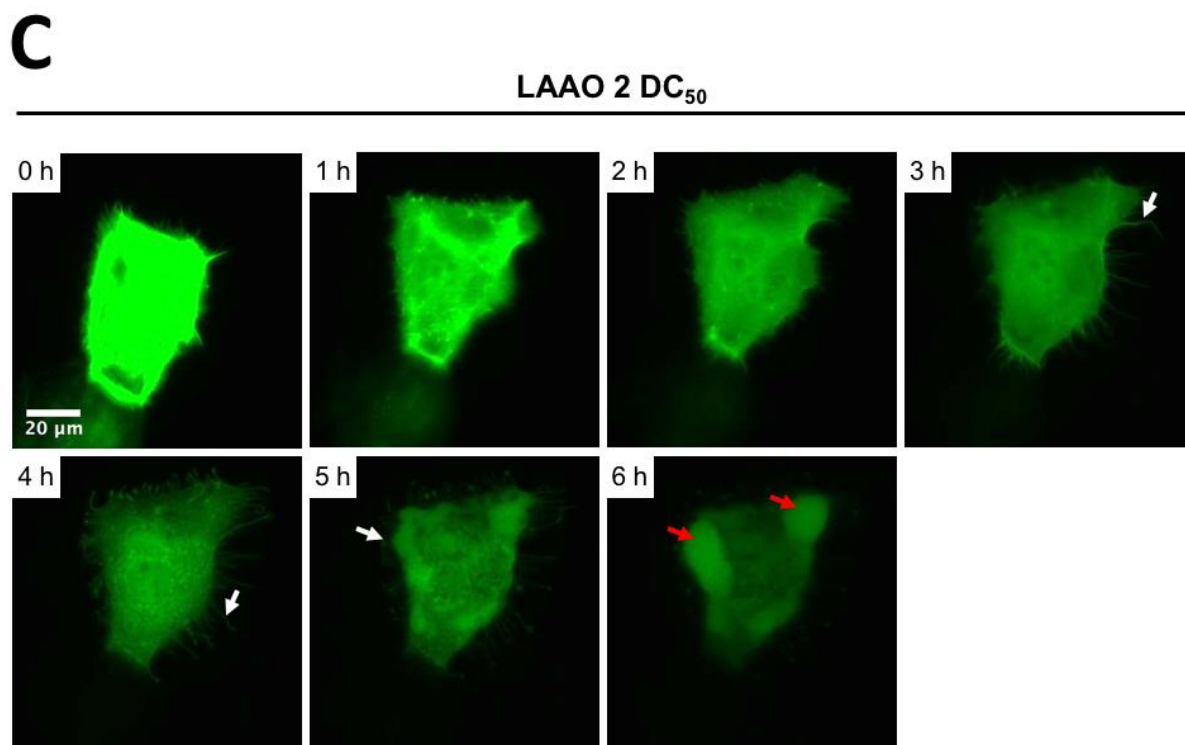




**B**

LAAO 2 DC<sub>50</sub> (horas)

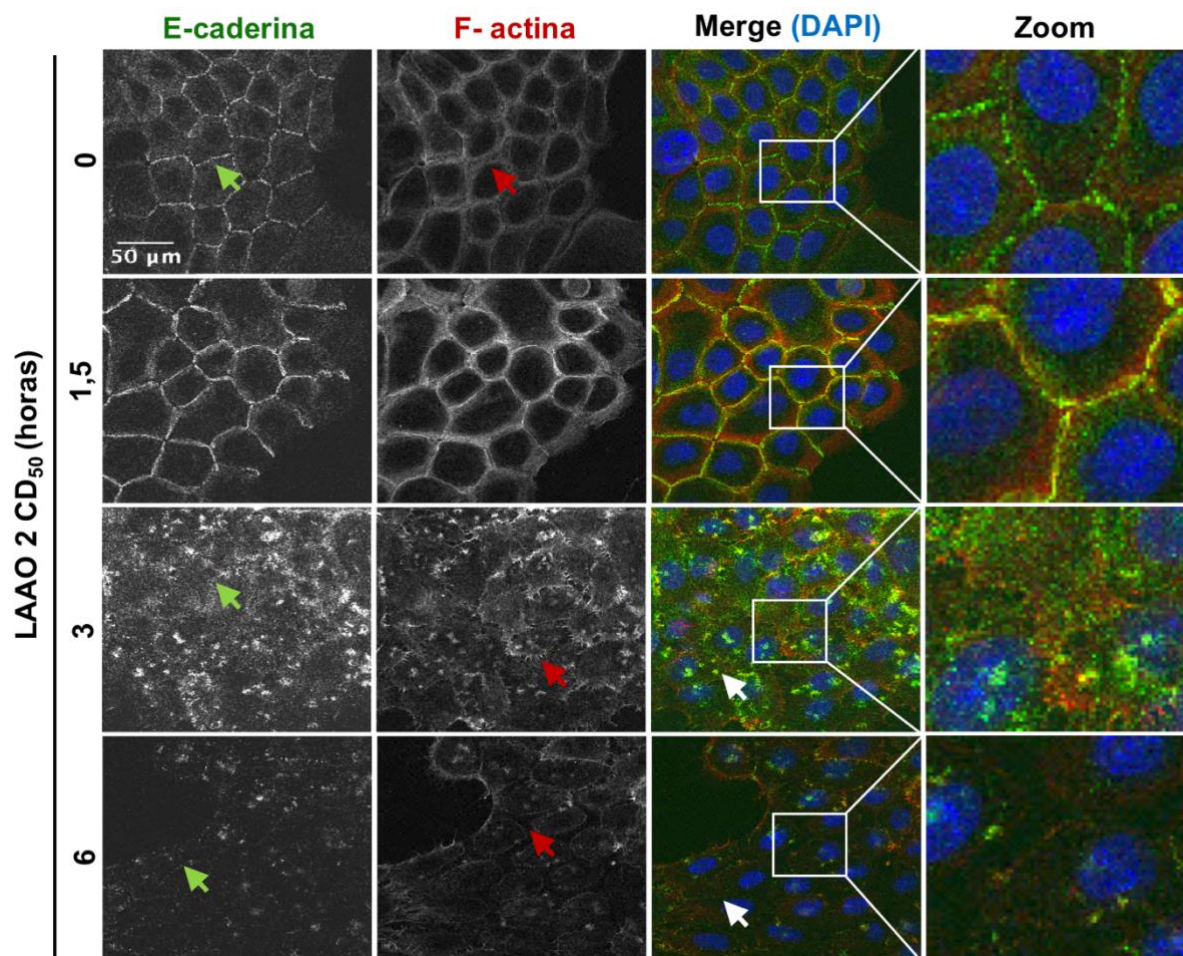




**Figura 36: Dinâmica e morfologia de células tratadas com LAAO. Células foram transfectadas com Actina-RFP (cor alterada para GFP usando software FIJI) por 24 horas e, após o devido tratamento, foram observadas por 6 horas. (A) Células incubadas apenas com veículo de diluição foram utilizadas como controle. (B) Queratinócitos do grupo tratado receberam 2 DC<sub>50</sub> de LAAO. Seta branca: espaçamento entre as células; Seta preta: núcleo picnótico. (C) Ampliação de célula transfectada e tratada com LAAO. Setas brancas: prolongamentos anormais da actina; Setas vermelhas: aparecimentos de bolhas. As células foram mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> e analisadas em microscópio widefield com objetiva de 20x. (n=3, experimentos realizados de forma independente).**

Após a observação de alterações na morfologia celular e no citoesqueleto de actina resolveu-se analisar em mais detalhes a estrutura de F-actina, como E-caderina. Para isso foi realizada imunofluorescência em células tratadas com LAAO diluída em meio FAD contendo 1% de SFB por 1,5, 3 e 6 horas. Como controle foram usadas células incubadas apenas com veículo de diluição.

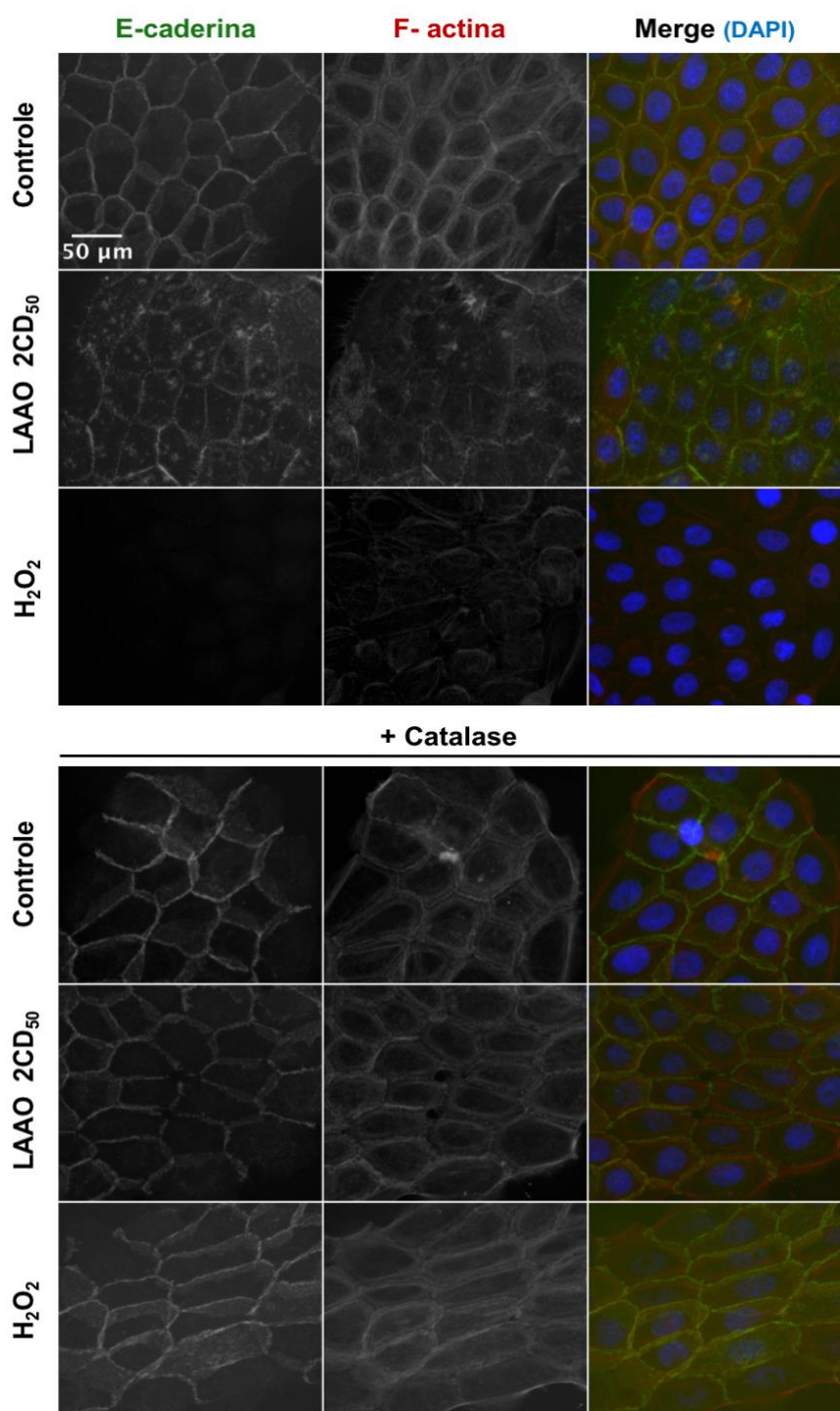
L-aminoácido oxidase causou desorganização da caderina após 3 horas de tratamento e diminuição local desta proteína após 6 horas de incubação, como evidenciado pelas setas verdes (Figura 37). Observou-se também que a partir de 3 horas de tratamento os feixes de actina se mostraram desorganizados, notando-se a presença de prolongamentos nessa estrutura (setas vermelhas). De maneira geral, as colônias perderam a organização e coesão, podendo ser observado espaçamento entre as células (setas brancas).



**Figura 37: Estrutura de E-caderina e F-actina em células tratadas com LAAO.** Células foram incubadas com 2 DC<sub>50</sub> LAAO por 1,5; 3 e 6 horas. Tempo 0 horas serviu de controle negativo e não recebeu tratamento. Após incubação os queratinócitos foram fixados e marcados para E-caderina e F-actina. Setas verdes: desorganização da caderina; Setas vermelhas: desorganização da actina; Setas brancas: espaçamento entre as células. Zoom é mostrado no painel da direita e representa aumento da área marcada. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal com objetiva de 60x. (n=3, experimentos realizados de forma independente).

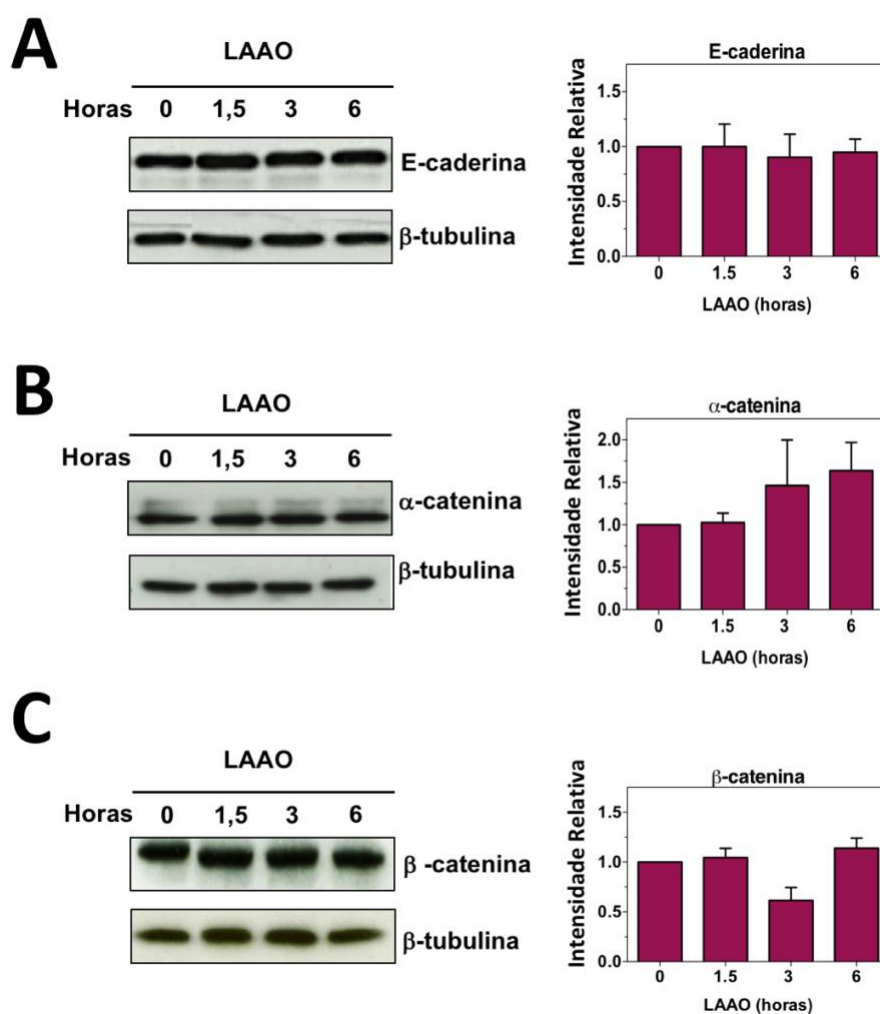
Para avaliar o papel do peróxido de hidrogênio no desencadeamento do fenótipo observado, LAAO foi adicionada às células juntamente com catalase (100 µg/mL). Como controle positivo foi utilizado peróxido de hidrogênio exógeno 5 mM. O painel superior da Figura 38 mostra as células tratadas sem adição de catalase, enquanto o painel inferior representa células tratadas com as amostras juntamente com catalase (controle recebeu apenas catalase). As células tratadas com a LAAO na ausência de catalase apresentaram as mesmas alterações descritas anteriormente. Entretanto, na presença de catalase, as células apresentaram morfologia similar às das células do controle negativo. O peróxido de hidrogênio causou desaparecimento total da caderina e desorganização da actina, sendo que

este fenótipo foi evitado quando o peróxido de hidrogênio foi adicionado juntamente com a catalase.



**Figura 38: Papel do peróxido de hidrogênio nas alterações de E-caderina e F-actina causadas por LAAO.** Células foram incubadas com 2 DC<sub>50</sub> de LAAO por 1,5; 3 e 6 horas. Tempo 0 horas serviu de controle negativo e não recebeu tratamento. Após incubação os queratinócitos foram fixados e marcados para E-caderina e F-actina. Zoom é mostrado no painel da direita e representa aumento da área marcada. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal com objetiva de 60x. (n=3, experimentos realizados de forma independente).

Para verificar se a LAAO foi capaz de alterar os níveis totais de E-caderina foram realizados *Western Blots* para E-caderina,  $\alpha$  e  $\beta$ -catenina presentes no lisado de células tratadas. Como controle de aplicação foi utilizada a  $\beta$ -tubulina. As bandas foram quantificadas utilizando o *software* FIJI, sendo que não foi observada diferença estatística entre grupo controle (incubado apenas com meio) e tratado (Figura 39 A-C).



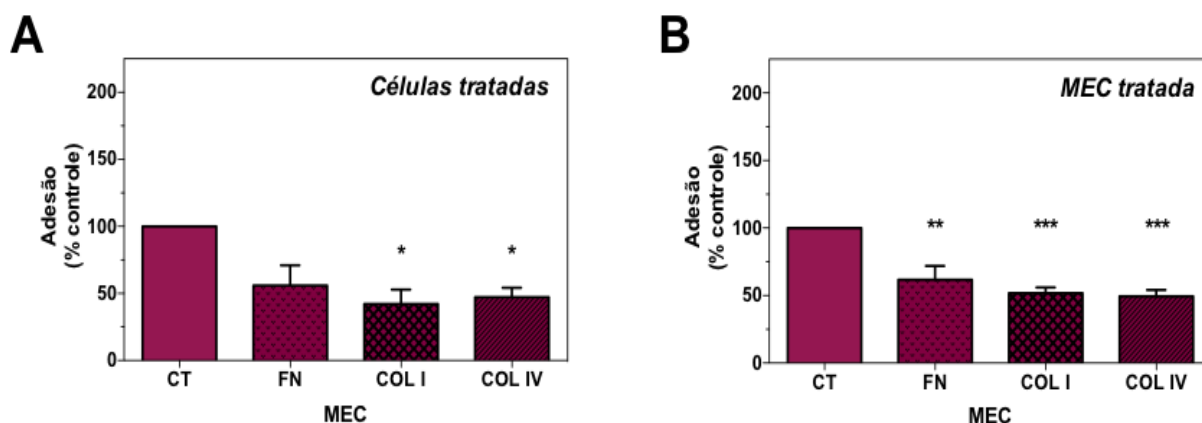
**Figura 39: Níveis totais de proteínas em queratinócitos incubados com a LAAO.** Células tratadas com 2 DC<sub>50</sub> de LAAO por 0; 1,5; 3 e 6 horas foram lisadas e submetidas a *Western Blot*. Membranas foram incubadas com anticorpos anti **(A)** E-caderina e  $\beta$ -tubulina, **(B)**  $\alpha$ -catenina e  $\beta$ -tubulina e **(C)**  $\beta$ -catenina e  $\beta$ -tubulina, a banda foi revelada pela adição do anticorpo secundário específico conjugado a HRP. As bandas foram quantificadas usando o *software* FIJI, normalizadas com o controle e os resultados foram plotados. (n=3, experimentos realizados de forma independente).

Em seguida foi avaliada a adesão célula-substrato (fibronectina, colágeno I e colágeno IV). O ensaio foi realizado utilizando o método da calceína e os gráficos plotados em relação

ao controle da respectiva matriz extracelular (considerada 100% de adesão), da mesma maneira descrita anteriormente para o veneno de *B. atrox*.

Em um primeiro momento foi avaliado a alteração na adesão de células tratadas com LAAO. Para isso, os queratinócitos foram tratados com 2DC<sub>50</sub> de LAAO por 1 hora, tripsinizados e adicionados a poços contendo a MEC (Figura 40A). Foi possível observar uma diminuição significativa na adesão das células ao colágeno I e colágeno IV, mas não à fibronectina.

Posteriormente, foi testado se células não tratadas teriam adesão alterada quando adicionadas a poços contendo a matriz tratada com LAAO. Neste caso, as MEC foram tratadas com 2 DC<sub>50</sub> de LAAO por 1 hora e, em seguida, as células foram adicionadas. Todas as matrizes testadas, quando tratadas com a LAAO, levaram a diminuição significativa da adesão celular, sendo que esta diferença entre controle e tratado foi um pouco maior para colágeno I e IV do que para fibronectina (Figura 40B).

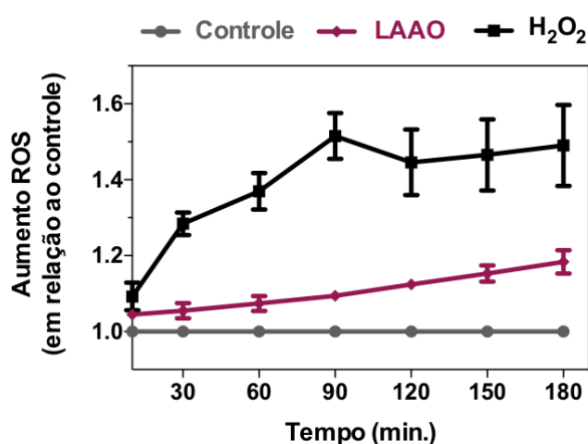


**Figura 40: Efeitos da LAAO na adesão celular. (A)** Queratinócitos foram pré-incubados com 2 DC<sub>50</sub> de LAAO por 1 hora a 37 °C. As células tratadas foram adicionadas aos poços sensibilizados com 1µg/mL de diferentes matrizes extracelulares (MEC) e foram incubadas por mais 1 hora a 37 °C. **(B)** MEC foram pré incubadas com 2 DC<sub>50</sub> de LAAO por 1 hora a 37 °C. Em seguida, queratinócitos foram adicionados a poços contendo as MEC e foram incubados por 1 hora a 37 °C. A adesão celular foi avaliada pelo método de calceína. Os valores representam médias de quatro ensaios independentes e a barra de erros indica o erro padrão da média. \* p < 0,05; \*\*P< 0,01; \*\*\*p < 0,001. Controle - CT, Fibronectina - FN, Colágeno I – COL I, Colágeno IV – COL IV.

Como os efeitos observados na estrutura celular e citotoxicidade causados por LAAO são, em grande parte, devido à ação do peróxido de hidrogênio, resolvemos testar se a incubação das células com LAAO acarretaria aumento intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS). O ensaio foi realizado em placa de 96 poços, utilizando a sonda Diclorofluoresceína Diacetato (DCFDA). Queratinócitos foram incubados com a sonda por 30

minutos, lavados e tratados com 2DC<sub>50</sub> de LAAO. Após a adição de LAAO a fluorescência foi monitorada por 180 minutos e o aumento de ROS foi calculado em relação ao controle negativo (células não tratadas com a LAAO). Como controle positivo foram utilizados queratinócitos tratados com peróxido de hidrogênio (5 mM).

As células tratadas com peróxido de hidrogênio apresentaram aumento de até aproximadamente 50% de ROS intracelular, comprovando a efetividade do método utilizado. Os queratinócitos tratados com a LAAO apresentaram um aumento progressivo de ROS intracelular. Após 10 minutos de tratamento houve aumento de 4,5%, seguido por 5,4% após 30 minutos, 7,4% após 60 minutos, 9,4% após 90 minutos, 12% após 120 minutos, 15% após 150 minutos e 18,3% após 180 minutos de tratamento (Figura 41).

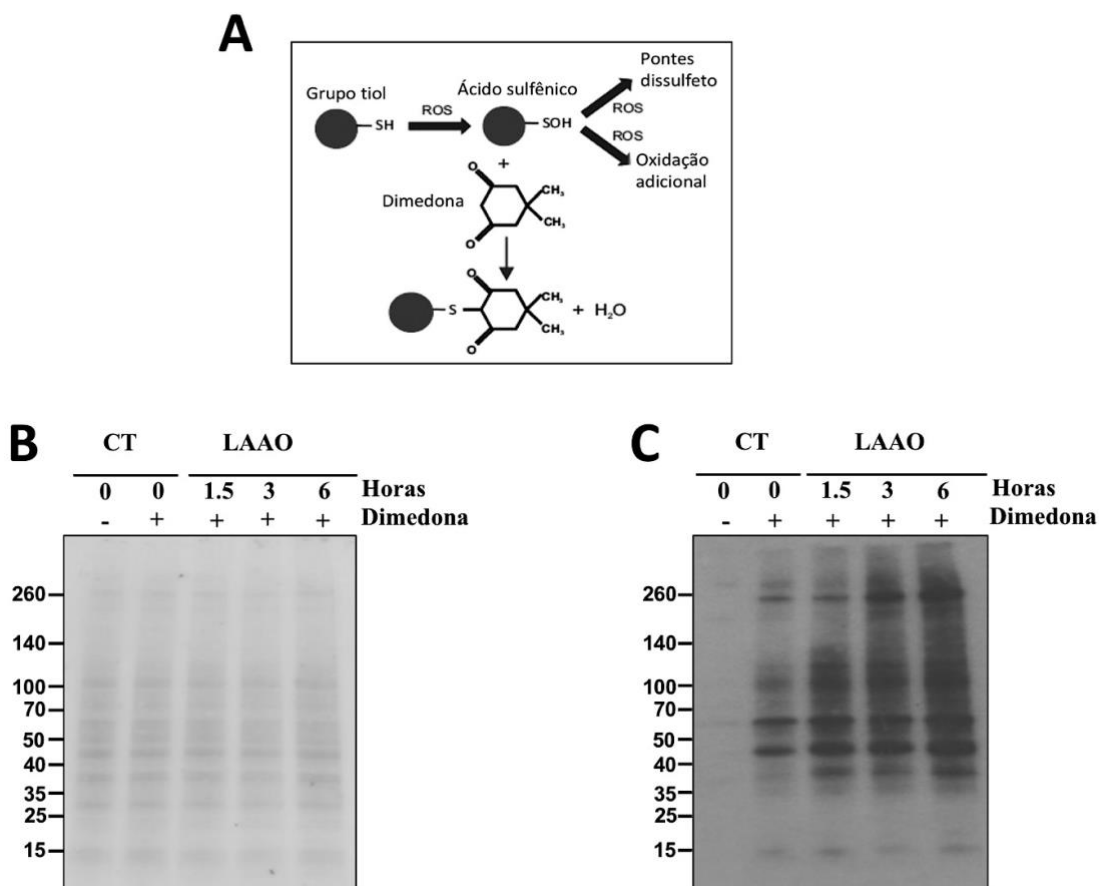


**Figura 41: Espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular em queratinócitos tratados.** Células foram tratadas com a sonda diclorofluoresceína diacetato por 30 minutos, lavadas e em seguida incubadas com 2 DC<sub>50</sub> de LAAO. Como controle negativo foram utilizadas células não tratadas e células incubadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5mM) serviram de controle positivo. A fluorescência foi monitorada (Excitação 485 nm, Emissão: 528 nm) por 180 minutos e o aumento de ROS foi calculado em relação ao controle negativo. Os valores representam médias de três ensaios independentes e a barra de erros indica o erro padrão da média.

Uma vez que foi detectado o aumento de ROS intracelular, decidiu-se avaliar se a LAAO seria capaz de induzir oxidação de proteínas celulares. Para isso, as células foram incubadas com 2DC<sub>50</sub> de LAAO por 0; 1,5; 3 e 6 horas e em seguida foram tratadas com dimedona (com exceção do controle negativo), reagente capaz de marcar proteínas oxidadas por uma reação irreversível com ácido sulfênico (Figura 42A). A oxidação proteica foi revelada por *Western Blot*. As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF e esta foi corada com amido



black para controle de aplicação (Figura 42B). O *Western Blot* com anticorpo anti dimedona-ácido sulfênico revelou que diversas proteínas de queratinócitos foram oxidadas após incubação com a LAAO e que essa oxidação se deu de forma tempo-dependente (Figura 42C).



**Figura 42: Oxidação de proteínas de queratinócitos por LAAO. (A)** Diagrama esquemático da reação de dimedona com ácido sulfênico. Fonte: Cameron, 2015. **(B)** Lisados de células incubadas com 2DC<sub>50</sub> de LAAO por 0; 1,5; 3 e 6 horas e tratadas ou não com dimedona foram aplicadas submetidos a SDS-PAGE e controle de aplicação foi feito por meio da coloração com amido black. **(C)** *Western Blot* com anticorpo anti dimedona-ácido sulfênico revelou as bandas contendo proteínas oxidadas. O ensaio foi realizado como descrito por Cameron, 2015 com pequenas modificações.

O ensaio de viabilidade celular utilizando Alamar Blue mostrou que a LAAO foi capaz de diminuir a viabilidade celular. A fim de determinar a via de morte celular desencadeada pelo tratamento com LAAO, foram realizados ensaios de apoptose, necrose e autofagia.

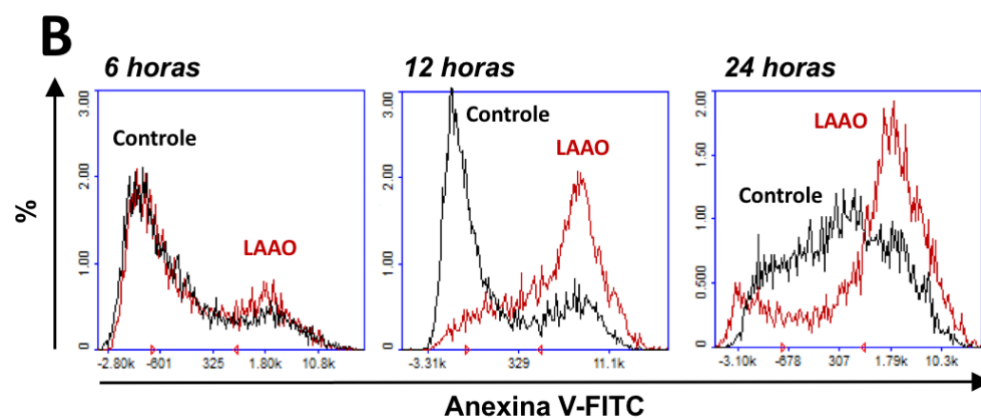
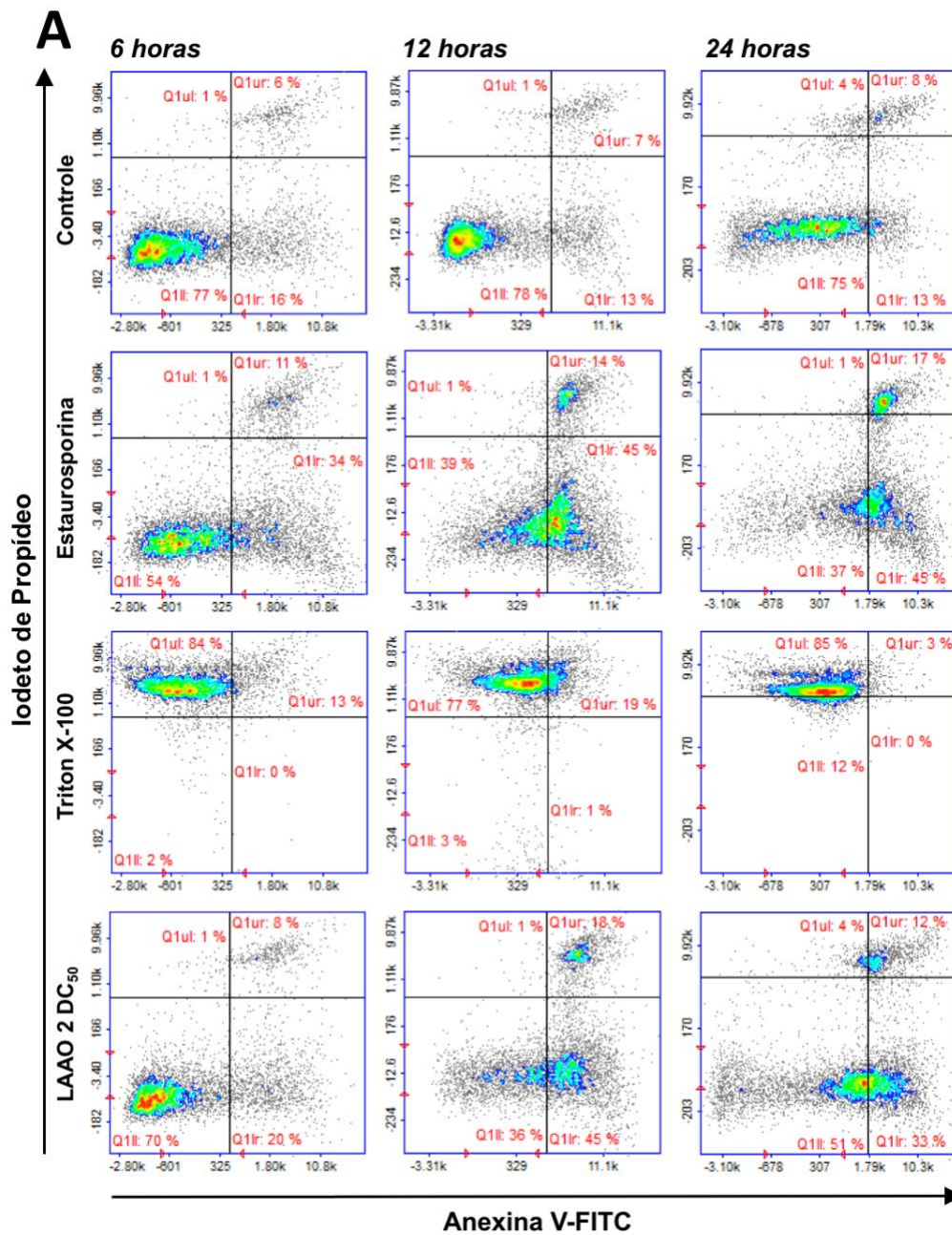
Como descrito anteriormente, apoptose foi avaliada utilizando Anexina-V e Iodeto de propídeo. Os queratinócitos foram incubados com 2 DC<sub>50</sub> de LAAO diluída em meio FAD

suplementado com 1% de SFB, por 6, 12 e 24 horas. Como controle negativo foram utilizadas células incubadas apenas com veículo de diluição.

Os *dot plots* e histogramas representativos para cada concentração e tempo testados podem ser observados na Figura 43. Nota-se que, principalmente após 12 e 24 horas de tratamento com LAAO, existe um maior número de células marcadas com Anexina-V e Anexina-V/IP quando comparado com o controle negativo (população de células está deslocada para direita e para cima nos *dot plots*) (Figura 43A). Os histogramas da Figura 43B também mostram um deslocamento tempo-dependente da curva de LAAO depois de 12 e 24 horas de tratamento (em relação ao controle negativo), indicando que existe uma maior porcentagem de células marcadas com Anexina-V.

A porcentagem de células marcadas foi quantificada e as médias são mostradas na Figura 44. As células que receberam tratamento de 6 h com a LAAO apresentaram 73% de viabilidade celular, valor similar ao observado para células controle (80%). Houve diminuição significativa da viabilidade celular após 12 e 24 horas de tratamento. As células tratadas com a LAAO por 12 horas apresentaram 24% de viabilidade celular, enquanto as células controle deste mesmo intervalo de tempo apresentaram 68% de viabilidade. O tratamento das células por 24 h com a LAAO diminuiu a viabilidade celular de 69% (células controle) para 43% (células tratadas) (Figura 44A). Observa-se também uma diminuição da viabilidade das células controles, que, provavelmente, se dá pelo fato de as células estarem incubadas em FAD contendo quantidade reduzida de SFB.

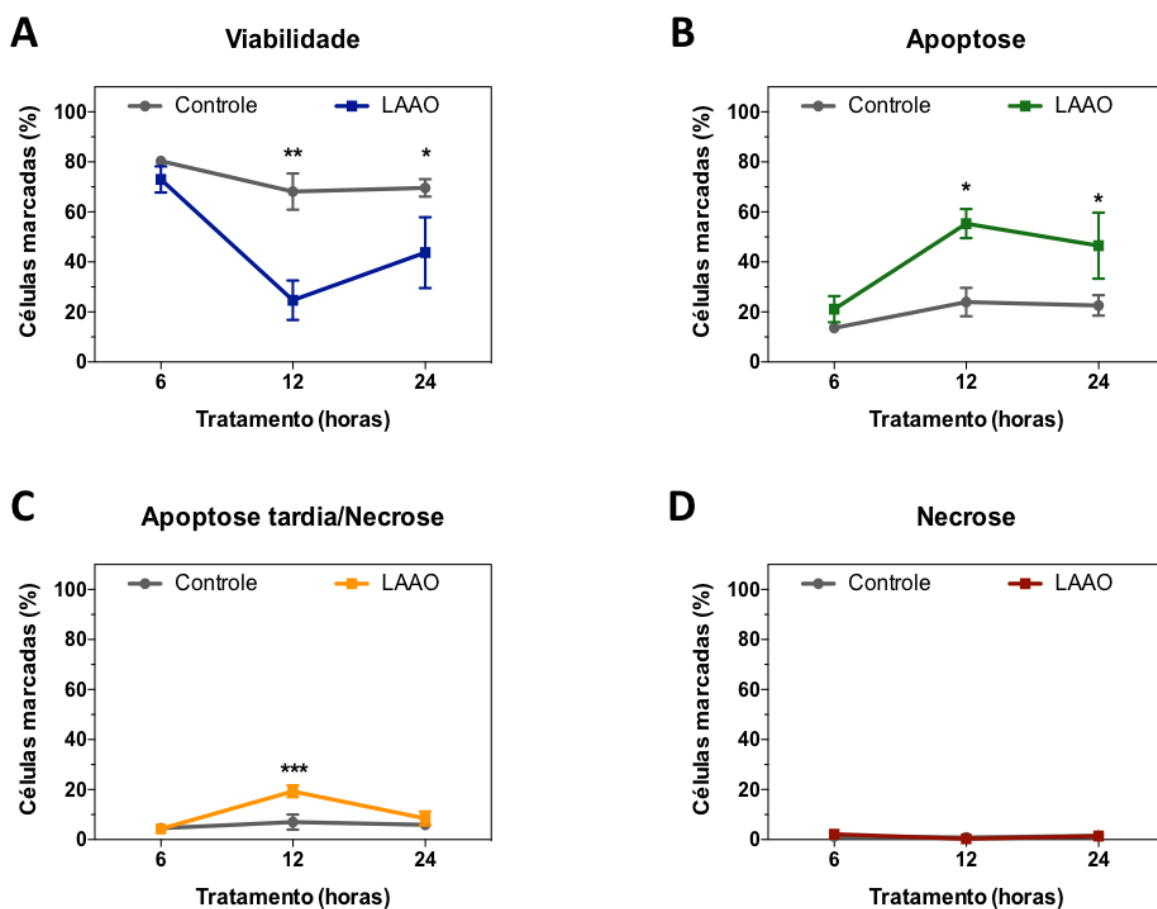
A porcentagem de células marcadas com Anexina-V foi estaticamente maior após o 12 e 24 horas de tratamento com a LAAO, quando comparadas com o controle (Figura 44B). Após 12 horas, o número de células apoptóticas foi de 55% no grupo tratado e de 24% no grupo controle. Após 24 horas, 22% das células controle apresentaram apoptose, enquanto este número foi de 46% para células tratadas. Seis horas de tratamento não foram suficientes para aumentar significativamente o número de células apoptóticas, sendo que as células controle e tratadas apresentaram 21 e 13.5% de apoptose, respectivamente.



**Figura 43: Análise de apoptose e necrose em células tratadas com LAAO. (A) Dot plots** evidenciando queratinócitos marcados com Anexina-V e/ou Iodeto de propídeo. Queratinócitos foram tratados com 2 DC<sub>50</sub> de LAAO por 6, 12 e 24 horas. Células não tratadas foram usadas como controle negativo. Estaurosporina 1 $\mu$ M e Triton X-100 0,1% foram usados como indutores de apoptose e necrose, respectivamente. **(B) Histogramas** representativos da distribuição células marcadas por Anexina-V FITC de células controles e tratadas. As células foram marcadas com Anexina V-FITC (1:500), Iodeto de propídeo (PI-5 $\mu$ g/mL) e Hoechst (1:3000). Gráficos representativos de um experimento. Análise feita utilizando o software NucleoView NC-3000.

As células que apresentaram dupla marcação (Anexina-V + IP) foram consideradas células em apoptose tardia ou necrose (Figura 44C). No tempo de 6 horas, não houve diferença de marcação entre os grupos controle e tratado (aproximadamente 4% de células marcadas para ambos os grupos). Entretanto, após 12 horas de tratamento, foi observado 7% de células marcadas no controle e 19% no grupo tratado com a LAAO, sendo que esta diferença foi considerada estatisticamente significativa. Após 24 horas de incubação foram observadas aproximadamente 6% de células marcadas, tanto no grupo controle quanto no tratado. Dessa forma, conclui-se que LAAO foi capaz de induzir morte por apoptose tardia ou necrose após 12 horas de tratamento.

Tanto para o grupo controle, quanto para o grupo tratado, em todos os intervalos de tempo, o número de células marcadas apenas com Iodeto de Propídeo (células necróticas) foi próximo de zero, não apresentando diferença estatística (Figura 44D).



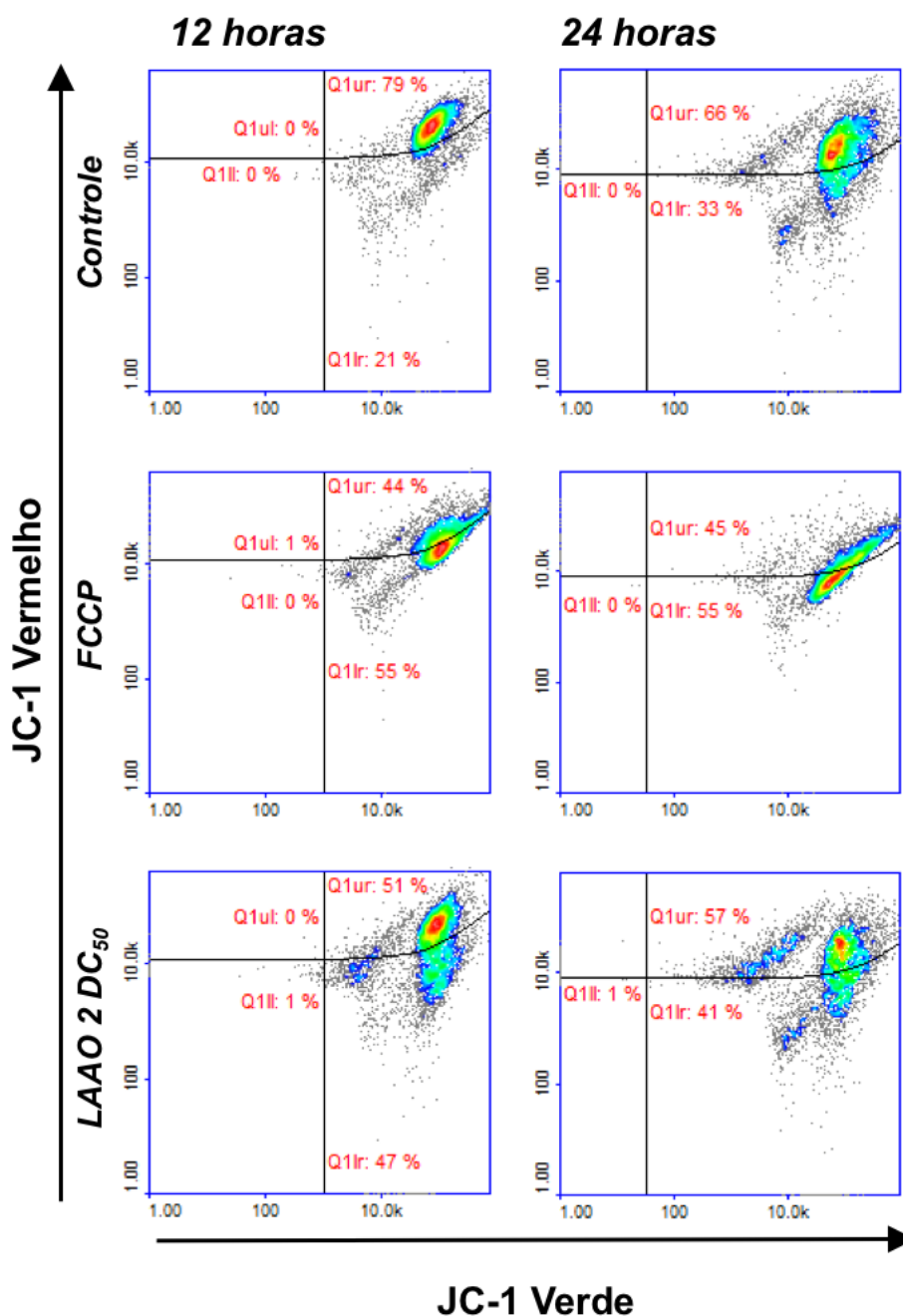
**Figura 44: Análise de eventos apoptóticos e necróticos após tratamento com a LAAO.** Queratinócitos foram tratadas com 2 DC<sub>50</sub> de veneno por 6, 12 e 24 horas. O resultado foi obtido utilizando citometria de fluxo. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. **(A)** Células viáveis (não marcadas). **(B)** Células em apoptose (marcadas com Anexina V-FITC). **(C)** Células em apoptose/necrose (duplamente marcadas com Anexina-V e Iodeto de propídeo). **(D)** Células necróticas (marcadas com Iodeto de propídeo). Os valores representam médias de pelo menos três ensaios independentes e a barra de erros indica o erro padrão da média. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Após observar que a LAAO foi capaz de desencadear apoptose, resolveu-se testar se mudança no potencial de membrana mitocondrial estaria envolvida no processo. Para isso avaliamos o potencial de membrana mitocondrial utilizando o reagente JC1. As células foram tratadas com 2 DC<sub>50</sub> de LAAO por 12 e 24 horas e como controle negativo foram utilizadas células incubadas apenas com meio FAD suplementado com 1% de SFB. Como indutor de despolarização foi usado o reagente FCCP (50  $\mu$ M).

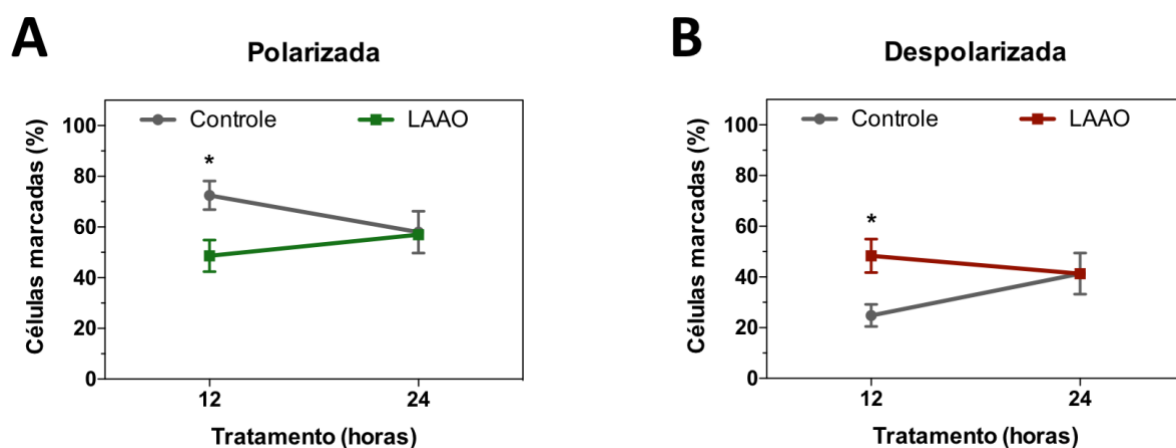
A Figura 45 mostra os gráficos contendo *dot plots* representativos do ensaio de alteração de potencial mitocondrial. É possível observar um deslocamento da população celular após o tratamento com a LAAO por 12 horas. Após 24 horas de tratamento também é

possível observar uma mudança e dispersão na distribuição dos eventos, entretanto tal fato também ocorre no grupo controle.

Foi calculada a porcentagem de células polarizadas e despolarizadas e as médias foram plotadas nos gráficos da Figura 46A. No grupo controle, a porcentagem de células polarizadas foi de 72% após 12 horas de incubação com meio com 1% de SFB, enquanto no grupo tratado este valor foi de aproximadamente 48%, representando uma diminuição significativa de 24%. Após 24 horas de tratamento, tanto no grupo controle quanto no tratado, 57% das células apresentavam mitocôndrias com membrana polarizada. A quantificação de células despolarizadas revelou que, no tempo de 12 horas aproximadamente 25% das células controles se encontravam despolarizadas, sendo que este valor foi de 28% para células tratadas (diferença significativa de 23%). No tempo de 24 horas, não houve diferença entre os grupos, sendo que para ambos o valor de células despolarizadas foi de 41% (Figura 46B).



**Figura 45: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de células tratadas com a LAAO.** *Dot plots* evidenciando células marcadas com JC-1. Queratinócitos foram tratados com 2 DC<sub>50</sub> de LAAO por 6, 12 e 24 horas e células não tratadas foram usadas como controle negativo. FCCP 50µM foi usado como indutor de despolarização de membrana mitocondrial. Gráficos representativos de um experimento. Análise feita utilizando o software NucleoView NC-3000.

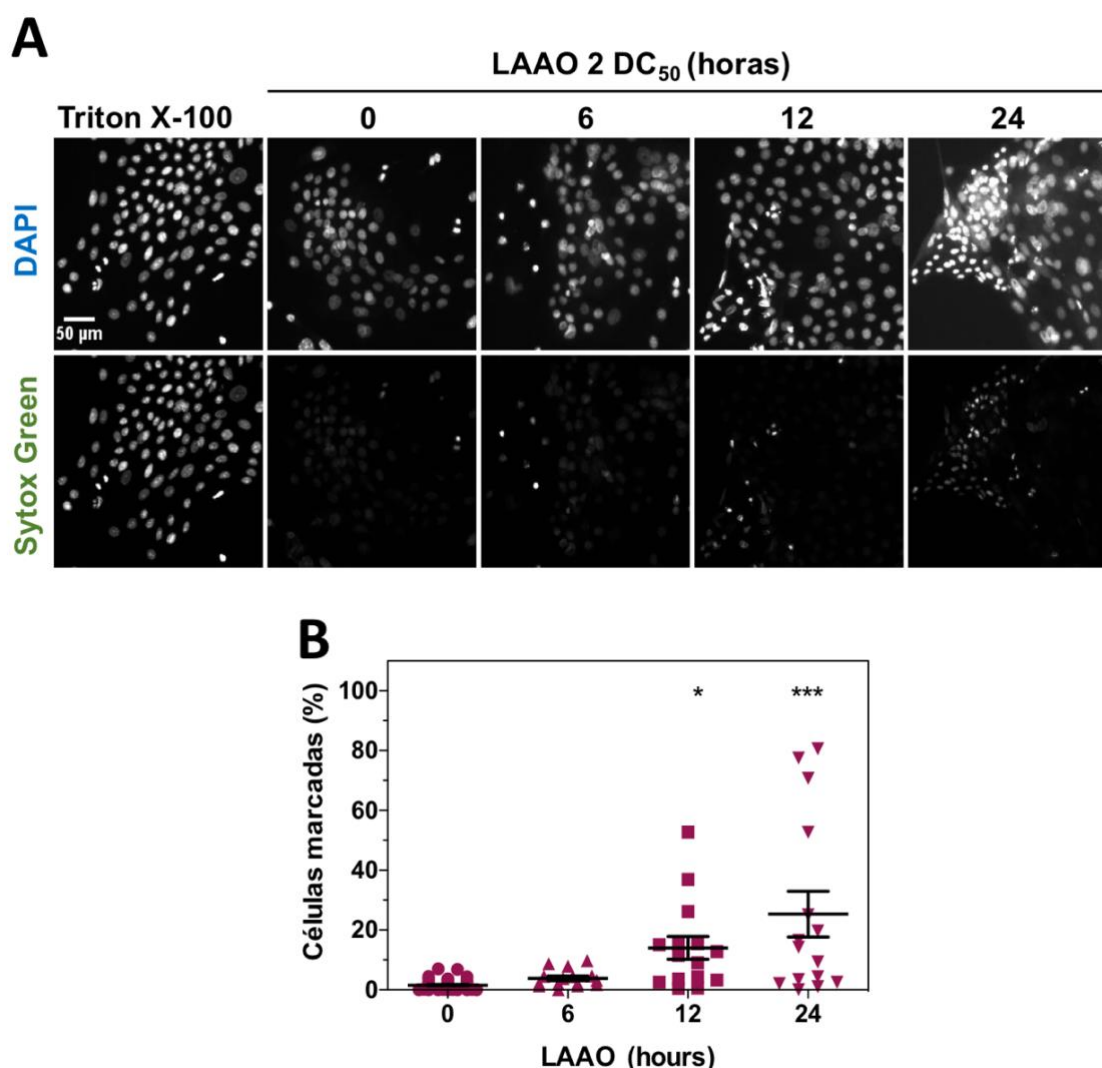


**Figura 46: Potencial de membrana mitocondrial após tratamento com a LAAO. (A)** Queratinócitos com membrana mitocondrial polarizada. **(B)** Queratinócitos com membrana mitocondrial despolarizada. Os valores representam médias de pelo menos três ensaios independentes e a barra de erros indica o erro padrão da média. (\* $p < 0,05$ ).

Em seguida o reagente Sytox Green foi utilizado para confirmar o resultado de morte por necrose observado pelo ensaio de Anexina-V/IP. Para isto, as células foram incubadas com 2 DC<sub>50</sub> de LAAO diluída em meio FAD suplementado com 1% de SFB por 6, 12 e 24 horas. Células incubadas apenas com a solução de diluição foram utilizadas como controle negativo como controle positivo utilizou-se células tratadas com Triton X-100 0,1% por 3 horas. Após tratamento as células foram coradas com DAPI e Sytox Green. O *software* FIJI foi utilizado para quantificação de células necróticas.

Pelas imagens mostradas na Figura 47A é possível observar que houve um aumento tempo-dependente de núcleos corados com Sytox Green após tratamento com a LAAO. Observa-se a efetividade do ensaio pelo controle positivo, já que células tratadas com Triton X-100 apresentam todos os núcleos corados por Sytox Green. A quantificação mostrou que não houve diferença entre o grupo controle e o grupo que foi incubado com a LAAO por 6 horas. Por outro lado, células tratadas com LAAO por 12 horas apresentaram em média 14% de células necróticas, contra 1,55% no grupo controle. A LAAO também induziu necrose em 25% das células tratadas por 24 horas (Figura 47B). Tanto no tempo de 12 h quando no tempo de 24 h, a diferença observada foi estatisticamente significativa, levando a conclusão de que nesses tempos houve morte por necrose.

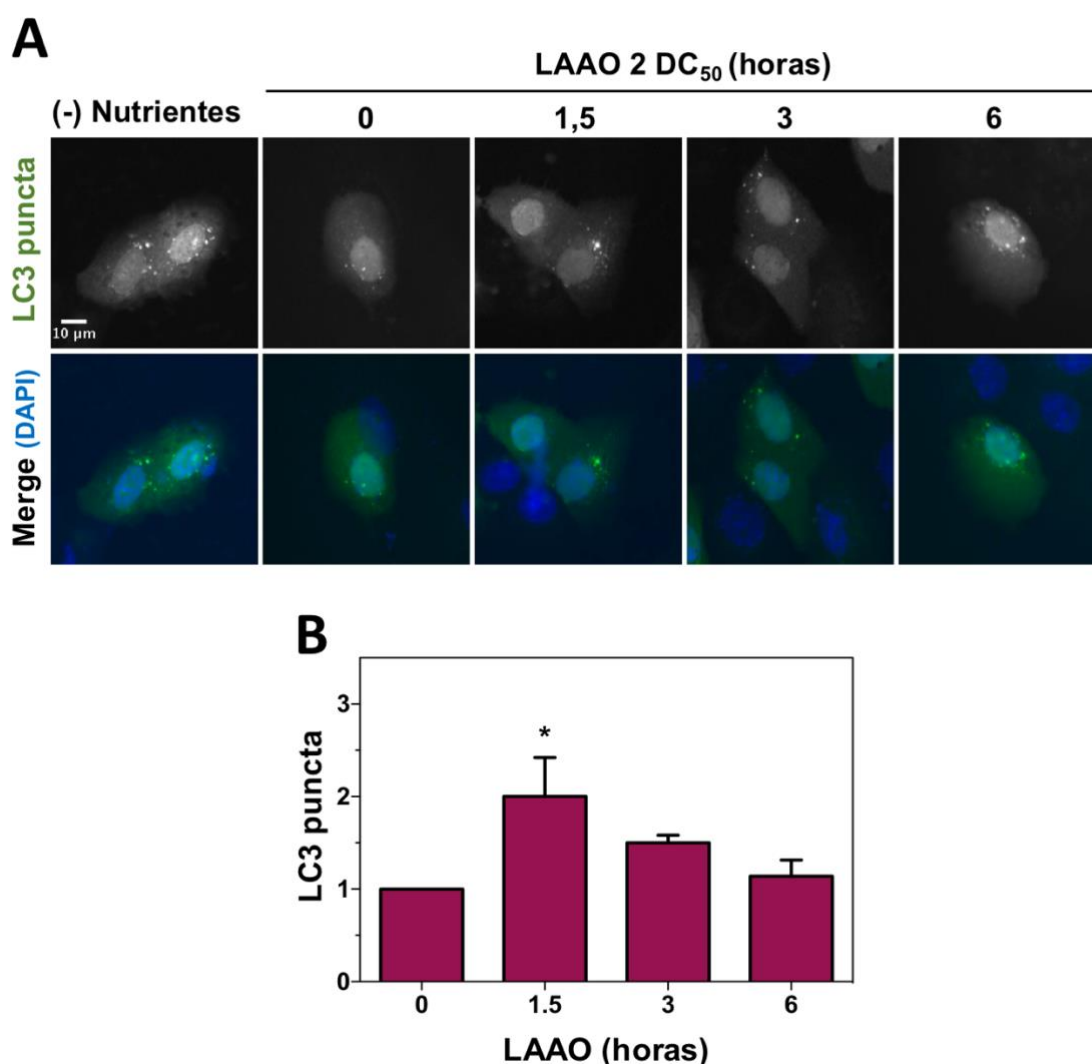




**Figura 47: Avaliação da necrose em células tratadas com a LAAO. (A)** Imagens representativas de queratinócitos corados com DAPI (núcleo) e Sytox Green. Como controle positivo foi utilizado Triton X-100 0,1% e células não tratadas serviram de controle negativo. Queratinócitos foram tratados com 2 DC<sub>50</sub> de LAAO por 6, 12 e 24 horas fixadas, corados e analisadas por microscopia de fluorescência. **(B)** Quantificação da porcentagem de células em necrose utilizando software FIJI. Os valores representam médias de pelo menos três ensaios independentes e a barra de erros indica o erro padrão da média. (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Além de apoptose e necrose, foi avaliada também a via autofágica por meio de transfecção de queratinócitos com a sequência da proteína LC3 fusionada a GFP. A indução de autofagia em células do controle positivo foi feita por incubação com meio EBSS, enquanto células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. Para avaliação do efeito da LAAO na autofagia, queratinócitos foram incubados com 2 DC<sub>50</sub> da proteína por 1,5; 3 e 6 horas. A Figura 48A mostra células representativas para cada condição testada. O número de LC3 puncta por célula foi quantificado utilizando o *software* FIJI. Os valores obtidos foram

normalizados, considerando o controle negativo=1, e as médias de cada grupo foram plotadas na Figura 48B. Foi possível visualizar grande número de LC3 puncta nas células que tiveram nutrientes depletados, o que validou o método utilizado. As células controle também apresentaram algumas vesículas, porém em menor quantidade. O tratamento das células com LAAO por 1,5 hora levou ao aumento significativo do número de LC3 puncta, sendo observado o dobro de vesículas neste grupo, quando comparado com o controle negativo. Após 3 e 6 horas este número diminuiu gradativamente e a diferença entre esses grupos e o controle não foi considerada significativa.



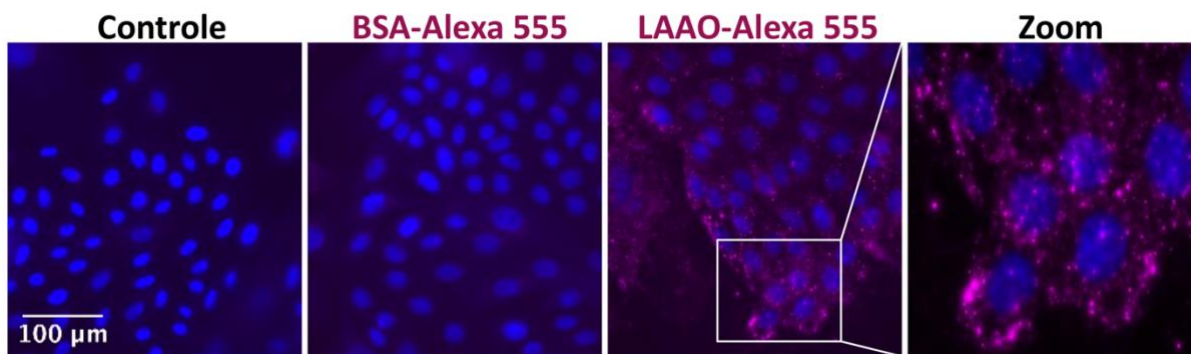
**Figura 48: Autofagia em células tratadas com a LAAO. (A)** Imagens representativas de células transfectadas com LC3-GFP. Os queratinócitos foram tratadas com 2 DC<sub>50</sub> de LAAO por 1,5; 3 e 6 horas. Células transfectadas e não tratadas foram utilizadas como controle negativo. Tratamento com EBSS (meio depletado de nutrientes) por 3 horas foi utilizado para induzir autofagia. Após tratamento as células foram fixadas e coradas com DAPI para identificação e contagem dos núcleos. **(B)** Quantificação de LC3 puncta por célula transfectada. As células foram analisadas em microscópio de fluorescência e

o número de LC3 puncta for calculado. Os valores representam médias de pelo menos três ensaios independentes e a barra de erros indica o erro padrão da média.

Considerando todos os resultados obtidos com o tratamento de queratinócitos com a LAAO neste trabalho, pode-se concluir que LAAO foi capaz de causar alterações da estrutura celular, bem como na adesão célula-substrato. Além disso LAAO levou ao aumento de ROS intracelular e a oxidação de proteínas celulares. A proteína diminuiu a viabilidade celular e desencadeou morte celular por autofagia (1,5 hora), apoptose (12 e 24 horas) e necrose (12 e 24 horas). Mostrou-se também que o peróxido de hidrogênio desempenha um importante papel nas atividades de LAAO, uma vez que a incubação com catalase foi capaz de diminuir o efeito de LAAO na viabilidade e alteração de estrutura celular.

Apesar de todos os efeitos causados pela LAAO, ainda não se sabe se esta proteína age externamente ou se é internalizada pela célula. Tendo isto em vista, o próximo passo do nosso trabalho foi marcar a proteína com fluoróforo e analisar se a célula seria capaz de internalizar a LAAO.

A proteína foi marcada com Alexa-555 conforme orientado pelo fabricante. Como controle foi usado BSA também marcado com Alexa-555. Após a marcação, a LAAO-Alexa 555 foi incubada ( $2DC_{50}$ ) com queratinócitos por 1,5 hora e o mesmo foi feito para o controle BSA-555. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. Após tratamento, as células foram fixadas e os núcleos foram corados com DAPI. A Figura 49 mostra as imagens adquiridas em microscópio de campo aberto. É possível observar que as células do controle negativo não apresentaram nenhuma marcação, como era esperado. Nas células incubadas com LAAO-Alexa 555 foi possível observar grânulos em todo citoplasma celular em volta dos núcleos, indicando que a proteína foi capaz de entrar nas células. A incubação das células com BSA-Alexa 555 mostrou que esta proteína não foi internalizada pelas células. Este controle foi importante também para mostrar que o sinal de fluorescência observado após tratamento com a LAAO-Alexa 555 não foi devido ao fluoróforo sozinho.



**Figura 49: Internalização de LAAO por queratinócitos.** A proteína LAAO foi marcada com Alexa-555 conforme descrito pelo fabricante e incubada com as células por 1,5 hora. O mesmo foi feito para o BSA, que foi usado como controle. Outro controle negativo foi obtido com células não tratadas. As imagens foram adquiridas em microscópio de campo aberto.

# ***DISCUSSÃO***

## 5. DISCUSSÃO

Os venenos botrópicos são uma mistura de moléculas rica em peptídeos e proteínas. Um importante componente desse veneno são as L- aminoácido oxidases (LAAOs). No presente trabalho purificamos a LAAO de *B. atrox* por meio de três etapas cromatográficas: em gel filtração, troca iônica e afinidade por heparina. Para escolha das propriedades a serem usadas na purificação, baseou-se em um método bem estabelecido que foi utilizado também em um trabalho sobre LAAO de *B. jararaca* previamente publicado (Ciscotto *et al.*, 2009). Os resultados mostraram que a LAAO representa 0,28% do veneno do *B. atrox* utilizado, rendimento similar foi encontrado para *Crotalus durissus cascavella* (0,29%) (Toyama *et al.*, 2006). Entretanto, o rendimento da purificação diferiu de 1,54% relatado anteriormente por Alves e colaboradores para LAAO de *B. atrox* (Alves *et al.*, 2008). Esta diferença pode ser explicada pela variação intraespecífica observada em venenos de serpentes e também pelas divergências entre os métodos de purificação utilizados.

Ao final das três etapas cromatográficas, foi obtida a LAAO e sua pureza e massa molecular foram avaliadas por SDS-PAGE. A massa molecular foi estimada por regressão linear utilizando uma curva de calibração baseada no padrão de massa molecular. Para LAAO em condições não redutoras, a massa obtida foi de 55,8 kDa, enquanto que para LAAO em condições redutoras, foi calculada massa de 62,5 kDa, valor similar ao descrito por Alves e colaboradores, que foi de 67 kDa. Nove spots diferentes foram detectados na eletroforese bidimensional, com pontos isoeletricos variando de 5.9 to 6.5, o que é corroborado por trabalhos anteriores abordando LAAOs de outras espécies de serpentes (Du e Clemetson, 2002; Naumann *et al.*, 2011; Toyama *et al.*, 2006), sugerindo a presença de isoformas da proteína ou de modificações pós-traducionais.

A L-aminoácido oxidase de *B. atrox* apresenta alta atividade catalítica para aminoácidos aromáticos e alifáticos com cadeia lateral longa, incluído L-Metionina, L-Leucina, L-Fenilalanina, L-Triptofano, L-Tirosina, L-Isoleucina (Alves *et al.*, 2008). Um padrão similar é observado para as enzimas de *B. jararacussu* e *B. pauloensis*, indicando que LAAOs do gênero *Bothrops* apresentam funções similares (Rodrigues *et al.*, 2009; Ullah *et al.*, 2012). Baseado nestes dados, a L-leucina, aminoácido pelo qual a enzima apresenta alta afinidade, foi escolhida para realização dos testes de atividade enzimática neste trabalho.

LAAOs são enzimas termo lábeis e acredita-se que sua inativação seja consequência de mudanças conformacionais na estrutura da proteína, especialmente no domínio de ligação ao FAD (KANG et al., 2011; GUO et al., 2012). Neste trabalho, foi detectado que a melhor temperatura de armazenamento para preservação da atividade de LAAO de *B. atrox* foi de -80°C (como mostrado em publicação anterior (CURTI; MASSEY; ZMUDKA, 1968)) e que a pré-ativação da enzima com tampão pH 5,0 restaura sua atividade catalítica. Quando mantida à -20°C, a LAAO apresentou a mais baixa das atividades, mesmo após reativação. Nossos dados enfatizam a importância de determinar as melhores condições de armazenamento destas enzimas termo lábeis e que a etapa de pré-ativação é aconselhável para minimizar a variabilidade por perda de atividade enzimática.

Além da LAAO purificada, o veneno de *B. atrox* também foi o foco deste estudo. Apesar do grande número de trabalhos que abordam os efeitos citotóxicos de venenos e toxinas botrópicas, informações sobre o mecanismo do veneno de *B. atrox* e da LAAO em células normais, que auxiliem a desvendar sua contribuição para a toxicidade do envenenamento local em tecidos *in vivo* ainda é restrita. Neste trabalho investigamos a citotoxicidade e via de morte celular, bem como alterações causadas na estrutura de queratinócitos, células de cultura primária que podem ser afetadas pelo veneno de serpentes durante o processo de envenenamento.

Foi analisada a ação citotóxica do veneno de *B. atrox* e da LAAO em queratinócitos utilizando o reagente Alamar Blue. O Alamar Blue é um reagente não citotóxico que avalia a viabilidade celular por medir a atividade metabólica da célula (Bopp e Lettieri, 2008). Tanto o veneno quanto a proteína foram capazes de reduzir a viabilidade celular de forma concentração-dependente. A DC<sub>50</sub> foi determinada utilizando de uma curva concentração-resposta e foi definida como 5,5 µg/mL para o veneno e 5,1 µg/mL para LAAO.

Um estudo recente determinou a DC<sub>50</sub> de venenos de diferentes espécies de *Bothrops* em células tumorais MGSO-3, encontrando valores entre 4,07 e 12,42 µg/mL (Lopes-de-Souza et al., 2015). Em outro trabalho, Jorge e colaboradores (2011) avaliaram a citotoxicidade de venenos de *Bothrops* em células normais humanas (PBMC) e obtiveram valores de DC<sub>50</sub> variando de 7,04 a 11,76 µg/mL. Diante do exposto, é possível observar que o valor de DC<sub>50</sub> encontrado para o veneno de *B. atrox* neste trabalho (5,5µg/mL) é, de forma geral, compatível com os valores encontrados para outras espécies de *Bothrops* em estudos prévios.

Apesar da potencial importância e contribuição da LAAO para o desenvolvimento dos efeitos locais do envenenamento botrópico, a maioria dos trabalhos publicados abordam o uso da LAAO como agente terapêutico (anti-tumoral, anti-bacteriano e anti-parasitário) (Costa *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2012). No presente trabalho, mostramos que a LAAO reduz a viabilidade celular de queratinócitos humanos normais de maneira concentração-dependente ( $DC_{50}=5,1\mu\text{g/mL}$ ). Em outros trabalhos a LAAO apresentou toxicidade celular variável e menor (i.e. maiores concentrações foram necessárias para matar as células) em linhagem de células (Alves *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2016). Em 2008, Alves e colaboradores demonstraram a citotoxicidade de LAAO de *B. atrox* para diferentes linhagens tumorais e obtiveram  $DC_{50}$  de aproximadamente  $50\mu\text{g/mL}$  para células HL-60 e  $25\mu\text{g/mL}$  para células Jurkat, PC12 e B16F10. Essa diferença sugere que linhagem celulares são mais resistentes a ação da toxina quando comparada às células normais. Essa interpretação é consistente com as distintas vias de sobrevivência que operam em linhagens celulares (transformadas e imortalizadas) quando comparadas às que operam em células normais. Além disso, a comparação entre estudos diferentes é dificultada pela variabilidade na estabilidade da LAAO purificada, como reportado neste trabalho, assim como pelo uso de métodos diferentes para determinar a citotoxicidade. Outro fator complicador das comparações é a quantidade de enzima ativa utilizada, assim como o tempo de tratamento, que podem afetar significativamente o resultado.

As células submetidas às mesmas condições usadas para o ensaio de Alamar Blue foram analisadas por observação direta em microscópio. Após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de veneno ou LAAO, as células foram fixadas e imagens foram coletadas. Observou-se que apesar do veneno e LAAO apresentarem valores de  $DC_{50}$  similares (próximas de  $5\mu\text{g/mL}$ ), as alterações morfológicas induzidas são distintas. O veneno afetou a morfologia das colônias mais rapidamente do que LAAO. Na concentração de  $0,625\mu\text{g/mL}$ , por exemplo, as células tratadas com LAAO ainda se assemelham às células controle, enquanto as células incubadas com veneno se apresentam em colônias desorganizadas. Queratinócitos tratados com  $2,5\mu\text{g/mL}$  de LAAO se encontram mais dispersos, fazendo com que a colônia fique menos compacta. Nesta mesma concentração, o veneno causa grande retração das extremidades da colônia, levando ao encolhimento da mesma. Esta retração nas bordas das colônias também pode ser observada após o tratamento com  $5\mu\text{g/mL}$  de LAAO, porém de forma mais sutil. Diferentemente do observado para o tratamento com a LAAO, a concentração



de 5 µg/mL de veneno causou significativa aglomeração das células, não sendo mais possível observar células individuais. Na concentração de 10 µg/mL de LAAO (e em todas as concentrações superiores testadas), observa-se que praticamente todos os núcleos se encontram compactados, sendo esta uma característica marcante de morte celular por apoptose (Elmore, 2007). As células tratadas com o veneno, nesta mesma concentração, apresentam alto grau de aglomeração, sendo que concentrações superiores de veneno causam aumento gradual desta aglomeração. Esta diferença entre os fenótipos desencadeados pelo veneno e pela LAAO na estrutura das células evidencia que não é possível correlacionar as alterações no metabolismo celular (que é parâmetro mensurado pelo ensaio de viabilidade), que foi similar para LAAO e para o veneno, com as alterações morfológicas e estruturais, que se apresentaram bem diversas.

As alterações morfológicas nas células estão diretamente relacionadas com a organização do citoesqueleto. Dessa forma resolveu-se analisar a distribuição de F-actina, bem como de E-caderina em células tratadas com veneno e LAAO. Como ressaltado anteriormente, foram realizados experimentos de padronização para definir a concentração das amostras e tempo de incubação a serem utilizados. Para o veneno, a melhor concentração foi de 0,5 DC<sub>50</sub> (equivalente a aproximadamente 2,75 µg/mL), pois, como mostrado no ensaio de morfologia celular, concentrações maiores induziram aglomeração celular, fato que impede a análise da estrutura celular. Para avaliação dos efeitos da LAAO, a melhor concentração foi de 2 DC<sub>50</sub> (equivalente a aproximadamente 10,2 µg/mL), sendo a concentração capaz de causar alteração na morfologia antes de levar a aparente morte celular (como também pode ser observado na análise de morfologia das células).

Considerando os ensaios realizados para dinâmica e estrutura celular foi observado que, tanto o veneno quanto a LAAO induziram alterações significativas na organização das proteínas analisadas, quando comparadas com o controle. As células tratadas com o veneno apresentaram alongamento celular, células em divisão, retração celular levando a formação de espaços entre as células e retração periférica da colônia como um todo. Foi observada alteração na distribuição de E-caderina, ocorrendo diminuição desta proteína nas junções celulares e dispersão para o restante da membrana. A actina também se apresentou desorganizada, já que após 3 horas de tratamento não foi possível visualizar os feixes de actina que são bem delimitados no controle. Alterações no formato celular, assim como na

organização da actina já foram descritas em células de rim canino (MDCK) após tratamento com veneno de *Lachesis muta muta* (Damico *et al.*, 2007). *B. alternatus* induziu desorganização da actina e E-caderina nestas mesmas células (Nascimento *et al.*, 2007). YAU e colaboradores (2012) também observaram mudanças na morfologia celular e rearranjo de actina em hemácias tratadas com veneno de *Pseudechis guttatus* (serpente Australiana)(Yau *et al.*, 2012).

Quando os queratinócitos foram tratados com LAAO, ocorreu a desorganização da E-caderina e aparente diminuição desta proteína na extremidade celular, o que possivelmente gerou diminuição da adesão célula-célula e consequente espaçamento entre células, levando a perda de coesão da colônia. Considerando a estrutura da actina, foram observados prolongamentos anormais do citoesqueleto e desorganização dos feixes de actina. Núcleos picnóticos foram detectados após 4 horas de tratamento, indicando provável morte celular. Foi relatada alteração no citoesqueleto de células tratadas com proteína purificada de veneno ofídico, como é o caso da graminelisina, uma metaloprotease isolada do veneno de *Trimeresurus gramineus* (serpente Indiana). Nesse estudo, células endoteliais incubadas com graminelisina apresentaram mudança acentuada na organização da actina e difusão de VE-caderina (caderina de endotélio vascular) para o citoplasma (Wu, 2003).

Nota-se que tanto o veneno quanto a LAAO afetaram a organização de E-caderina e F-actina, alterando a estrutura dos queratinócitos. Entretanto, essas alterações se deram de forma distinta para cada tratamento (veneno ou LAAO), o que sugere diferenças no mecanismo de ação e evidencia a importância de estudos comparativos entre toxinas isoladas e veneno. Apesar de relativamente poucos trabalhos abordarem a estrutura celular após tratamento com venenos ofídicos e toxinas purificadas, os fatos aqui expostos demonstram o potencial dessas amostras para causar danos no citoesqueleto de diferentes tipos celulares, o que provavelmente contribui para sua toxicidade.

Como o ensaio de imunofluorescência mostrou aparente alteração nos níveis de E-caderina e F-actina após tratamento com veneno e LAAO, resolveu-se avaliar os níveis totais dessas proteínas em lisados celulares. Os resultados indicaram que os níveis totais das proteínas permaneceram os mesmos em todos os tempos testados. Entretanto, outros experimentos devem ser feitos para avaliar se F-actina e E-caderina estão sendo internalizadas, uma vez que isso explicaria a diminuição das proteínas na superfície celular

com concomitante manutenção do nível total. Outra possibilidade seria a proteína estar dispersa na superfície celular, o que diminuiria seu sinal (imunofluorescência) nas extremidades e junções celulares.

Como dito anteriormente, durante a reação catalisada por LAAO ocorre liberação de  $H_2O_2$ , uma importante espécie reativa de oxigênio. As ROS podem atuar como mediadores de sinalização celular e estão envolvidos no crescimento, diferenciação, progressão, migração, adesão e morte celular (Hurd, DeGennaro e Lehmann, 2012; Zhang *et al.*, 2016). Dessa forma, resolveu-se avaliar se a catalase, enzima que catalisa a decomposição de  $H_2O_2$ , seria capaz de diminuir a atividade citotóxica e o dano na arquitetura celular causados em queratinócitos tratados.

Foi analisada a participação  $H_2O_2$  na citotoxicidade de células tratadas tanto pela LAAO quanto pelo veneno de *B. atrox*. A catalase foi capaz de aumentar, em grande parte, a viabilidade celular de queratinócitos tratados com LAAO, sugerindo o envolvimento de  $H_2O_2$  na citotoxicidade de LAAO. Entretanto, como nas condições utilizadas no presente estudo não foi observada 100% de inibição, é possível que LAAO apresente algum outro mecanismo citotóxico adicional não mediado por  $H_2O_2$ . O envolvimento do  $H_2O_2$  na toxicidade da LAAO também foi observado em trabalhos anteriores (Alves *et al.*, 2008; Naumann *et al.*, 2011).

Em relação ao tratamento com o veneno de *B. atrox*, foi observado que a catalase diminuiu a citotoxicidade do veneno em 17,5% quando tratada com 0,5  $DC_{50}$  e 10% quando tratada com 2  $DC_{50}$ . A inibição da citotoxicidade pela catalase indica que, apesar de representar apenas 0,28% do veneno, a LAAO provavelmente contribui para citotoxicidade do veneno. Nota-se que com o aumento da concentração de veneno, ocorre diminuição da inibição de citotoxicidade por catalase. Este fato se deve, provavelmente, à presença de muitas outras proteínas no veneno, que também contribuem para o aumento da citotoxicidade do veneno.

Para avaliar se  $H_2O_2$  desempenha algum papel no dano estrutural desencadeado por LAAO, esta toxina foi incubada com as células juntamente com a catalase. Quando submetidas a essas condições experimentais, as células apresentaram morfologia parecida com às de células normais, comprovando que o  $H_2O_2$  está envolvido nas alterações de citoesqueleto causadas por LAAO. A fim de comparação, foi testado o  $H_2O_2$  exógeno, porém, apesar de causar destruição da arquitetura celular o fenótipo desencadeado diferiu daquele causado

---

pela LAAO. Nos experimentos realizados neste trabalho, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi testado na concentração de 5 mM (valor foi baseado no usado por NAUMANN et al., 2011), porém após observar a diferença entre os fenótipos testou-se, em um ensaio piloto, a concentração de 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. É preciso ressaltar que nesta concentração, as alterações da estrutura celular causadas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se assemelharam às induzidas por LAAO.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são consideradas subprodutos tóxicos do metabolismo e são conhecidas por causar vários danos biológicos, podendo afetar lipídios, proteínas e DNA. Por outro lado, as ROS podem auxiliar no combate a patógenos quando produzidas apropriadamente (Taufet, Delorme-Walker e DerMardirossian, 2012; Thannickal e Fanburg, 2000). Sabe-se também que as ROS são importantes reguladores no processo de motilidade celular e estão envolvidas na indução de protrusões persistentes do citoesqueleto (Taufet, Delorme-Walker e DerMardirossian, 2012). Essa influência das ROS em alterações no citoesqueleto pode justificar os efeitos causados pela LAAO.

Por meio de ensaios para mensurar as ROS intracelulares, verificou-se um aumento tempo-dependente dessas moléculas em células tratadas com LAAO, sendo que este aumento foi de aproximadamente 20%, após 3 horas de incubação. A elevação dos níveis de ROS pelo tratamento com LAAO corrobora com a participação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas alterações de viabilidade e de citoesqueleto observadas neste trabalho. Aumento de ROS e consequente envolvimento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na citotoxicidade também foi observado por Fung e colaboradores (2015). Esses autores relataram que a LAAO de *Ophiophagus hannah* induziu a superexpressão de genes referentes ao citocromo P450, o qual é responsável produção excessiva de ROS induzindo stress oxidativo

Em seguida, avaliou-se as ROS produzidas após o tratamento com a LAAO seria capaz de oxidar as proteínas celulares. Para isto, foi utilizada uma sonda que permite a marcação de proteínas que sofreram oxidação. A técnica de *Western Blot* de lisado de células incubadas com LAAO revelou que o tratamento induziu o aumento, tempo-dependente, da oxidação de proteínas, sugerindo que as ROS liberadas pela reação catalítica da LAAO podem modificar proteínas celulares. Como trabalho futuro, pretende-se identificar as principais proteínas celulares que são oxidadas em níveis elevados pelas ROS produzidas após tratamento com LAAO. A identificação destas proteínas será importante para determinar quais as possíveis

---

vias de sinalização alteradas pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este dado providenciará informação substancial para elucidação do mecanismo de ação de LAAO de serpentes.

As análises de microscopia de queratinócitos tratados com veneno ou LAAO mostraram contração de células e colônias como um todo, sugerindo alteração no citoesqueleto e uma possível diminuição da adesão célula-substrato. Sabe-se que venenos de serpentes da família Viperidae possuem componentes como desintegrinas e lectinas do tipo-C que inibem a adesão célula-MEC mediada por integrinas (principal molécula envolvida na adesão célula com o substrato) (Marcinkiewicz, 2013). A diminuição da adesão ao substrato de células renais tratadas com veneno botrópico (*B. alternatus*) foi demonstrada por Nascimento e colaboradores (2007). Também foi relatada perda de adesão em células endoteliais incubadas com componente purificado (metaloprotease) do veneno de *B. neuwiedi* (Baldo *et al.*, 2008).

Tendo isto em vista, resolvemos avaliar alterações na adesão célula-MEC causadas pelo veneno e LAAO. Foi investigada a ação das amostras tanto nas células (células foram incubadas com veneno e LAAO) quanto nas MEC (MEC foram incubadas com as amostras). Células tratadas com veneno de *B. atrox* foram incubadas com três diferentes matrizes: fibronectina, colágeno I e colágeno IV. Não foi observada nenhuma alteração da adesão células-MEC nestas condições. Incubamos então as diferentes matrizes com veneno a fim de analisar se sua ação seria detectável na MEC tratada. Entretanto, não houve diferença significativa na adesão de colágeno I e IV incubados com veneno. Curiosamente, foi observado um aumento de aproximadamente 50% da adesão quando a fibronectina foi tratada com veneno de *B. atrox*. Como dito anteriormente, geralmente espera-se observar uma diminuição da adesão e não aumento. Serão necessários ensaios adicionais para elucidar o resultado observado. Planeja-se avaliar a adesão dos queratinócitos a MEC que é produzida pelos fibroblastos (camada alimentadora), pois esta é a condição em que as células são cultivadas normalmente. Serão testados também outros intervalos de tempo de incubação e outras concentrações do veneno.

Diferentemente do que foi observado para o veneno, células que foram incubadas com LAAO apresentaram redução de mais de 50% na adesão ao colágeno I e IV. Entretanto não foi observada alteração para fibronectina. Quando as matrizes foram tratadas, observou-se diminuição da adesão em aproximadamente 50% para fibronectina, colágeno I e colágeno IV.

Esta é, possivelmente, a primeira vez que o papel de LAAO é investigado na adesão célula-MEC. É provável que a diminuição da adesão celular causada por LAAO seja reflexo da ação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, já que este desempenha importante papel na migração e adesão celular. Acredita-se que as ROS alterem a expressão de integrinas na superfície celular, afetando assim a adesão celular (Hurd, DeGennaro e Lehmann, 2012). A redução na adesão celular leva ao comprometimento da integridade do tecido, podendo contribuir para a toxicidade da LAAO e do veneno.

O ensaio de viabilidade celular, discutido anteriormente, mostrou redução de células viáveis após tratamento tanto com veneno de *B. atrox* quanto com LAAO. Para avaliar a presença de morte celular de fato e identificar a via desencadeada, realizamos ensaios para detecção de apoptose, necrose e autofagia.

Apesar do tratamento com o veneno diminuir a viabilidade celular, não foi detectada ocorrência de apoptose ou necrose. Foi observada um aumento de vesículas autofágicas em consequência de 1,5 e 3 horas de tratamento, entretanto, após quantificação e análise estatística, essa diferença não foi considerada significativa. Os resultados negativos observados nesses experimentos se devem, provavelmente, a baixa concentração de veneno utilizada (aproximadamente 2,75 µg/mL). Como dito anteriormente, a concentração usada neste trabalho foi padronizada para possibilitar a visualização das alterações morfológicas das células. A concentração maior do que a utilizada levaria a aglomeração total das células, o que impediria a análise do citoesqueleto de queratinócitos tratados com veneno. Dessa forma serão necessários ensaios adicionais, utilizando doses maiores que 0,5 DC<sub>50</sub>, para identificar a via de morte celular provocada pelo veneno. Entretanto, os resultados aqui obtidos, sugerem que as alterações morfológicas precedem a diminuição da viabilidade celular e provavelmente, a morte celular causada pelo veneno.

Os dados obtidos no presente estudo revelam que, após o estímulo da LAAO, diferentes mecanismos de morte celular são ativados. A incubação das células com a LAAO acarretou diminuição da viabilidade celular. Considerando todas as vias avaliadas, conclui-se que, cronologicamente, as células sofreram autofagia após 1,5 hora seguida por despolarização de membrana mitocondrial após 12 horas e apoptose e necrose após 12 e 24 horas de tratamento.

---

A via autofágica consiste em um mecanismo de sobrevivência celular desencadeado, principalmente, por ausência de nutrientes (Mizushima, 2007). A autofagia é sugerida pelo aumento de vesículas citoplasmáticas detectadas por microscopia como LC3 puncta após tratamento com a LAAO. Este é o primeiro trabalho que reporta autofagia em células tratadas com uma LAAO. Em contraste com a rica quantidade de informação em apoptose e venenos de serpentes, a autofagia é pouco caracterizada como resposta a diferentes toxinas. Um estudo recente de Azevedo e colaboradores (2016) mostrou que uma fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno de *B. pauloensis* também foi capaz de induzir autofagia, apoptose e apoptose tardia em células de tumor de mama. Além disso, a autofagia seguida de apoptose foi observada em linhagem celular de leucemia mielóide crônica tratada com a crotoxina, uma neurotoxina isolada de *Crotalus durissus terrificus*. Acredita-se que a apoptose levou a morte das células em questão, enquanto a autofagia teve o papel de tentar atrasar a apoptose em favor da sobrevivência celular (Yan *et al.*, 2006).

No presente trabalho foi observado que a LAAO induziu um aumento do número de células em apoptose. Os dados mostraram que a LAAO causou despolarização do potencial de membrana mitocondrial dos queratinócitos, o que sugere ativação da via apoptótica intrínseca. Este dado corrobora com os obtidos por Alves e colaboradores (2008), que demonstraram que a LAAO de *B. atrox* foi capaz de desencadear a apoptose de maneira concentração dependente em células HL-60. Além disso, neste mesmo estudo, Alves detectou a indução de caspase-3 e caspase-9 após tratamento com LAAO, indicando o envolvimento da via apoptótica intrínseca (Alves *et al.*, 2008). A participação da via apoptótica intrínseca também foi observada em células tratadas com a LAAO do veneno de *Agkistrodon acutus* (ACTX-8) (Zhang e Wei, 2007). Em queratinócitos humanos normais, a despolarização da mitocôndria foi transiente e teve seu pico em 12 horas, enquanto o número de células em apoptose apresentou um platô entre 12 e 24 horas.

Foram observadas células em necrose após 12 horas de tratamento, coincidindo com o intervalo de tempo observado para a apoptose. Em contraste com a apoptose, a necrose deve ser um evento posterior, uma vez que o número de células em necrose tende a continuar aumentando depois de 12 horas, entretanto este aumento não se mostrou estatisticamente significativo.

---

Apoptose e necrose foram ambas reportadas em linhagens de células renais ou tumorais tratadas com LAAOs de venenos botrópicos (DANTAS et al., 2015; MORAIS et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016). Nestes estudos, um único intervalo de tempo foi testado e pode não ser suficiente para revelar o cenário completo de eventos desencadeados pela LAAO (Alves et al., 2008; Morais et al., 2015). Como mostrado aqui, é importante testar a toxicidade ao longo do tempo para identificar a cascata temporal dos mecanismos de morte desencadeados em resposta ao tratamento com a LAAO.

Outro mecanismo de toxicidade de LAAO seria devido a sua interação direta com a superfície celular e subsequente internalização (Ande et al., 2006). Suhr and Kim (1996) marcaram a LAAO de *Agkistrodon hylas* (serpente coreana) com fluoróforo e forneceram algumas evidências controversas sobre a interação de LAAO com a superfície celular. Eles observaram o acúmulo de fluoróforo na superfície celular de células L1210 (leucemia), mas não de HeLa (câncer cervical). A interação de LAAO de serpente com diferentes tipos de membrana também foi demonstrada recentemente (Abdelkafi-Koubaa et al., 2016). Acredita-se que essa interação da enzima com a membrana celular seja de extrema importância para sua ação tóxica. É postulado que quando a LAAO se liga na membrana celular ocorre concentração do peróxido de hidrogênio no local de interação, o que potencializa a ação citotóxica do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abdelkafi-Koubaa et al., 2016; Ehara et al., 2002), entretanto experimentos que comprovem tal fato ainda são necessários.

Apesar das várias tentativas para mostrar a interação das LAAO de serpentes com as células, nenhuma delas foi capaz de mostrar imagens claras da internalização da LAAO. No presente trabalho marcou-se a LAAO de *B. atrox* com o fluoróforo Alexa-555 e a incubou-se com os queratinócitos por 1,5 hora. As imagens obtidas por microscopia de fluorescência mostram nitidamente que a LAAO-555 foi internalizada pelas células. Os resultados mostram, pela primeira vez, a presença de LAAO dentro da célula, inclusive próxima ao núcleo. Acredita-se que uma vez que a LAAO é internalizada, podem ocorrer efeitos tóxicos adicionais, uma vez que a enzima seria capaz de gerar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no interior da célula e metabolizar aminoácidos e outros fatores essenciais para viabilidade celular (Ande et al., 2006). A detecção da LAAO dentro das células ocorreu simultaneamente a autofagia e possivelmente contribuiu para o mecanismo de morte celular e alterações celulares descritas neste trabalho. Pretende-se agora tentar elucidar qual o processo envolvido na internalização de LAAO e se este evento



depende da porção glicídica da proteína. Outro ponto de investigação, é se o bloqueio da internalização da LAAO seria capaz de reduzir sua citotoxicidade. Este estudo possibilitaria desvendar a importância da internalização da LAAO para sua ação tóxica na célula.

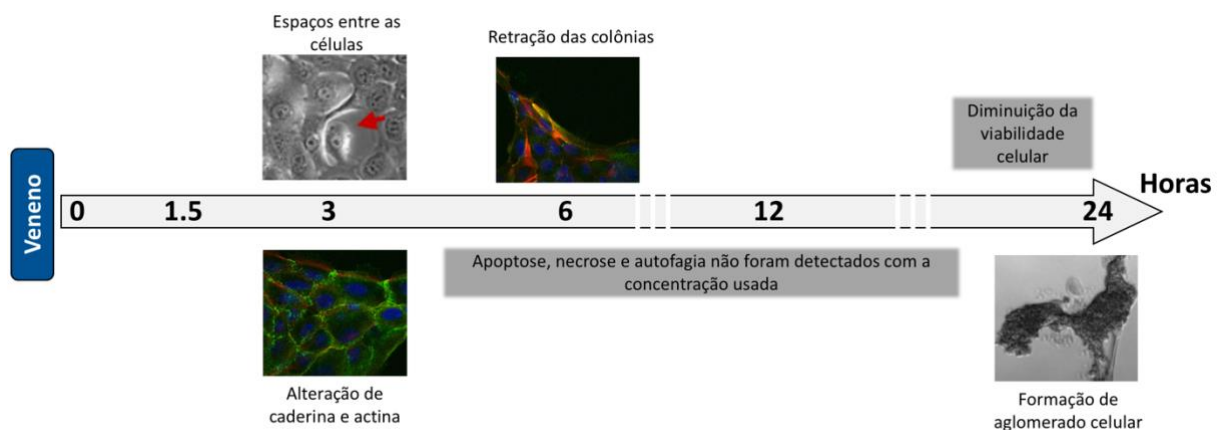
O presente trabalho possibilitou a caracterização e determinação da possível ordem cronológica de eventos citotóxicos desencadeados pelo veneno de *B. atrox* e pela LAAO purificada. Os resultados aqui obtidos trazem avanços no conhecimento sobre os mecanismos de ação desencadeados tanto pelo veneno quanto pela LAAO de *B. atrox*. As alterações celulares observadas podem contribuir para a destruição tecidual desencadeada no local da picada de serpentes do gênero *Bothrops*. Dessa forma, a caracterização dos efeitos na estrutura e na morte celular ajudam a entender os possíveis danos locais. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, nosso grupo está realizando uma triagem com biblioteca de fármacos em busca de identificar possíveis medicamentos capazes de neutralizar os danos teciduais descritos aqui. Neste sentido, os dados produzidos no presente trabalho auxiliaram a elucidar o mecanismo de ação do veneno e da LAAO, e podem contribuir para o desenvolvimento de terapias alternativas.

# ***CONSIDERAÇÕES FINAIS***

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho possibilitaram a visualização da dinâmica da ação do veneno e da LAAO purificada de *B. atrox* em queratinócitos.

A Figura 50 resume as alterações mais importantes causadas pelo veneno de *B. atrox*. Em um primeiro momento, o veneno causou alterações no citoesqueleto, levando a desorganização de caderina e actina. Possivelmente, a diminuição da adesão célula-célula ocasionou o espaçamento entre as células. Em seguida, houve retração da colônia como um todo e formação de aglomerados celulares com subsequente diminuição da viabilidade celular. Entretanto, na concentração testada, não foi observada apoptose, necrose ou autofagia. As alterações observadas podem acarretar desorganização do tecido após envenenamento, contribuindo, possivelmente, para a toxicidade do veneno.



**Figura 50: Resumo das alterações causadas pelo tratamento de queratinócitos com veneno de *B. atrox*.**

Um resumo das ações tóxicas causadas por LAAO é apresentado na Figura 51. Nossos dados nos levam a acreditar que a proteína seja internalizada antes de 1,5 hora de incubação. Conforme dito anteriormente, a interação da LAAO com a célula pode aumentar a toxicidade por concentrar o  $H_2O_2$  próximo da membrana celular, assim como por levar a metabolização de fatores dentro da célula. O aumento de ROS observado após o tratamento das células com a LAAO corrobora com esta hipótese. Após 1,5 hora de tratamento, foi observado um aumento de vesículas autofágicas, indicando ativação da autofagia, como provável mecanismo de sobrevivência contra a toxicidade da LAAO. Foi observado que a LAAO causou

a diminuição da adesão celular e desorganização da caderina e actina. Estas alterações podem levar a perda da integridade do tecido, contribuindo para toxicidade causada pela LAAO. Além disso, a LAAO foi capaz de diminuir de forma significativa a viabilidade dos queratinócitos tratados. Tanto a alteração no citoesqueleto, quanto a diminuição da viabilidade celular foram mediadas por ROS. Por último, foi observado que a LAAO induziu morte celular por apoptose e necrose.

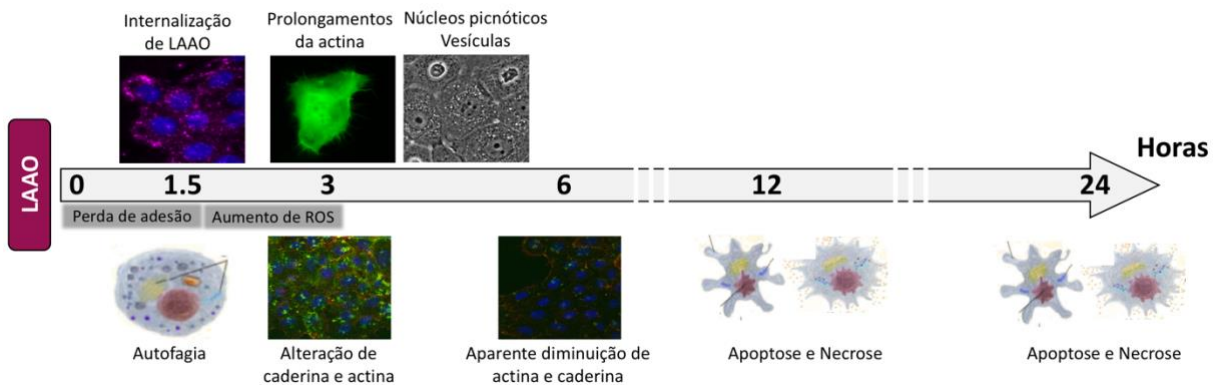


Figura 51: Resumo das alterações causadas pelo tratamento de queratinócitos com LAAO de *B. atrox*.

Este trabalho contribuiu para o melhor entendimento da toxicidade do veneno de *B. atrox* e da LAAO purificada. Os resultados aqui produzidos podem auxiliar a elucidar o mecanismo de ação tóxica das amostras durante o envenenamento botrópico e consequentemente contribuir para o desenvolvimento de terapias alternativas.

# ***PERSPECTIVAS***

## 7. PERSPECTIVAS

- Avaliar níveis E-caderina na superfície e no interior de células tratadas com as amostras, a fim de determinar se a caderina estaria sendo internalizada ou apenas redistribuída na superfície celular;
- Determinar quais proteínas celulares foram oxidadas após tratamento com a LAAO, para auxiliar a desvendar o mecanismo de ação de LAAO;
- Analisar a interação da LAAO com a célula e determinar seu mecanismo de internalização;
- Avaliar o papel da glicosilação de LAAO nas suas atividades citotóxicas;
- Produzir a LAAO na sua forma recombinante e verificar sua atividade citotóxica;
- Avaliar os eventos celulares causados pela ação do veneno de *B. atrox* e de LAAO em outros tipos celulares (tumoriais e normais);
- Identificar e testar inibidores específicos que possam interferir nos mecanismos citotóxicos desencadeadas por LAAO e veneno de *B. atrox*;
- Avaliar os eventos celulares causados pela ação de outras frações e toxinas purificadas do veneno de *B. atrox*.

***REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS***

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELKAFI-KOUBAA, Z.; AISSA, I.; MORJEN, M.; KHARRAT, N.; AYEB, M. EL; GARGOURI, Y.; SRAIRI-ABID, N.; MARRAKCHI, N. Interaction of a snake venom L -amino acid oxidase with different cell types membrane. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 757–764, jan. 2016.

ALVES, R. M. *et al.* Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from Bothrops atrox snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 151, n. 4, p. 542–550, dez. 2008.

ANDE, S. R.; KOMMOJU, P. R.; DRAXL, S.; MURKOVIC, M.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; FERRANDO-MAY, E. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, v. 11, n. 8, p. 1439–1451, 8 ago. 2006.

ARNOLD, B. Y. C. The snakebite fight. **Nature**, p. 6–8, 2016.

AYRES, L. R.; RÉCIO, A. DOS R.; BURIN, S. M.; PEREIRA, J. C.; MARTINS, A. C.; SAMPAIO, S. V.; CASTRO, F. A. DE; PEREIRA-CROTT, L. S. Bothrops snake venoms and their isolated toxins , an L-amino acid oxidase and a serine protease , modulate human complement system pathways. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, p. 1–8, 2015.

AZEVEDO, F. V. P. V.; LOPES, D. S.; CIRILO GIMENES, S. N.; ACHÊ, D. C.; VECCHI, L.; ALVES, P. T.; GUIMARÃES, D. DE O.; RODRIGUES, R. S.; GOULART, L. R.; RODRIGUES, V. DE M.; YONEYAMA, K. A. G. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA 2 homologue from Bothrops pauloensis venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 671–677, jan. 2016.

BALDO, C. *et al.* BnP1, a novel P-I metalloproteinase from Bothrops neuwiedi venom: Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 54–65, jan. 2008.

BARLOW, A.; POOK, C. E.; HARRISON, R. A.; WUSTER, W. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1666, p. 2443–2449, 7 jul. 2009.

BIGARELLA, C. L.; LIANG, R.; GHAFFARI, S. Stem cells and the impact of ROS signaling.



**Development**, v. 141, n. 22, p. 4206–4218, 15 nov. 2014.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, n. 3, p. 325–372, jan. 1994.

BOPP, S. K.; LETTIERI, T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. **BMC Pharmacology**, v. 8, n. 1, p. 8, 2008.

BORGES, C. C.; SADAHIRO, M.; SANTOS, M. C. DOS. Aspectos epidemiológicos e clínicos dos acidentes ofídicos ocorridos nos municípios do Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 6, p. 637–646, dez. 1999.

BRAUD, S. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, n. 9–10, p. 851–859, 10 set. 2000.

BROOKS, J. T. *et al.* Surveillance for Bacterial Diarrhea and Antimicrobial Resistance in Rural Western Kenya, 1997–2003. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 4, p. 393–401, 15 ago. 2006.

CALDERON, L. A. *et al.* Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–19, 2014.

CALVETE, J. J. *et al.* Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 4, p. 510–527, 1 abr. 2011.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 6, p. 476–477, jun. 2005.

CASAS-GODOY, L.; DUQUESNE, S.; BORDES, F. **Lipases and Phospholipases**. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. v. 861

CHANG, J.; MUSSER, J. H.; MCGREGOR, H. Phospholipase A2: Function and pharmacological regulation. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 15, p. 2429–2436, ago. 1987.

CINTRA, A. C. O.; TONI, L. G. B. DE; SARTIM, M. A.; FRANCO, J. J.; CAETANO, R. C.; MURAKAMI, M. T.; SAMPAIO, S. V. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 70–82, jul. 2012.

CISCOTTO, P.; MACHADO DE AVILA, R. A.; COELHO, E. A F.; OLIVEIRA, J.; DINIZ, C. G.; FARÍAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R. DE; MARIA, W. S.; SANCHEZ, E. F.; BORGES, A.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from Bothrops jararaca snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 3, p. 330–341, 1 mar. 2009.

COOPMAN, P.; DJIANE, A. Adherens Junction and E-Cadherin complex regulation by epithelial polarity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 18, p. 3535–3553, 5 set. 2016.

COSTA, T. R. *et al.* Myotoxic phospholipases A2 isolated from Bothrops brazili snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, v. 29, n. 10, p. 1645–1656, out. 2008.

COSTA, T. R.; BURIN, S. M.; MENALDO, D. L.; CASTRO, F. A DE; SAMPAIO, S. V. Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 23, 2014.

CROWLEY, L. C.; MARFELL, B. J.; SCOTT, A. P.; WATERHOUSE, N. J. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 11, p. pdb.prot087288, 1 nov. 2016.

CURTI, B.; MASSEY, V.; ZMUDKA, M. Inactivation of Snake Venom Acid Oxidase by Freezing. **The journal of biological chemistry**, v. 243, p. 2306–2314, 1968a.

\_\_\_\_\_. Inactivation of snake venom L-amino acid oxidase by freezing. **The Journal of biological chemistry**, v. 243, n. 9, p. 2306–14, 10 maio 1968b.

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

DANTAS, R. T.; JORGE, A. R. C.; JORGE, R. J. B.; MENEZES, R. R. P. P. B. DE; LIMA, D. B.; TORRES, A. F. C.; TOYAMA, M. H.; MONTEIRO, H. S. A.; MARTINS, A. M. C. L-amino acid oxidase from Bothrops marajoensis causes nephrotoxicity in isolated perfused kidney and cytotoxicity in MDCK renal cells. **Toxicon**, v. 104, p. 52–56, 15 set. 2015.

DEBONO, J.; XIE, B.; VIOLETTE, A.; FOURMY, R.; JAEGER, M.; FRY, B. G. Viper Venom Botox: The Molecular Origin and Evolution of the Waglerin Peptides Used in Anti-Wrinkle Skin

Cream. **Journal of Molecular Evolution**, v. 84, n. 1, p. 8–11, 18 jan. 2017.

DU, X.-Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom l-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659–665, jun. 2002.

EHARA, T.; KITAJIMA, S.; KANZAWA, N.; TAMIYA, T.; TSUCHIYA, T. Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. **FEBS letters**, v. 531, n. 3, p. 509–12, 20 nov. 2002.

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

ESPINO-SOLIS, G. P.; RIAÑO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. **Antidotes against venomous animals: State of the art and prospectives** **Journal of Proteomics**, 4 nov. 2009.

ESTEBAN-MARTÍNEZ, L.; BOYA, P. Autophagic flux determination in vivo and ex vivo. **Methods**, v. 75, p. 79–86, mar. 2015.

FELICIANO, P. R.; RUSTIGUEL, J. K.; SOARES, R. O. S.; SAMPAIO, S. V.; CRISTINA NONATO, M. Crystal structure and molecular dynamics studies of L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox*. **Toxicon**, v. 128, p. 50–59, mar. 2017.

FERREIRA, S. H.; ROCHA E SILVA, M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. **Experientia**, v. 21, n. 6, p. 347–349, jun. 1965.

FOX, J. W. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: L-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. **Toxicon**, v. 62, p. 75–82, fev. 2013.

FRANÇA, F. O. DE S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. *In*: **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2 ed. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 81–95.

FUNG, S. Y.; LEE, M. L.; TAN, N. H. Molecular mechanism Of cell death induced by king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom l-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 96, p. 38–45, mar. 2015.

GALLUZZI, L.; BLOMGREN, K.; KROEMER, G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 7, p. 481–494, jul. 2009.

GEUEKE, B.; HUMMEL, W. A new bacterial l-amino acid oxidase with a broad substrate specificity: purification and characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 1–2, p. 77–87, jul. 2002.

GOODING, J. M.; YAP, K. L.; IKURA, M. The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. **BioEssays**, v. 26, n. 5, p. 497–511, maio 2004.

GUÉRCIO, R. A. P.; SHEVCHENKO, A. A.; SHEVCHENKO, A. A.; LÓPEZ-LOZANO, J. L.; PABA, J.; SOUSA, M. V; RICART, C. A. O. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome science**, v. 4, p. 11, 11 maio 2006.

GUO, C.; LIU, S.; DONG, P.; ZHAO, D.; WANG, C.; TAO, Z.; SUN, M.-Z. Akbu-LAAO exhibits potent anti-tumor activity to HepG2 cells partially through produced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via TGF- $\beta$  signal pathway. **Scientific Reports**, v. 5, n. November, p. 18215, 14 dez. 2015.

GUO, C.; LIU, S.; YAO, Y.; ZHANG, Q.; SUN, M.-Z. Past decade study of snake venom l-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 302–311, set. 2012.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; HERRERA, C. Hemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteinases: A Journey of Discovery and Understanding. **Toxins**, v. 8, n. 4, p. 93, 26 mar. 2016.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1529–1538, nov. 1998.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; PLA, D. Immunological profile of antivenoms: Preclinical analysis of the efficacy of a polyspecific antivenom through antivenomics and neutralization assays. **Journal of Proteomics**, v. 105, p. 340–350, jun. 2014.

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 6, p. e150, 6 jun. 2006.

HAMZA, M.; IDRIS, M. A.; MAIYAKI, M. B.; LAMORDE, M.; CHIPPAUX, J.-P.; WARRELL, D. A.; KUZNIK, A.; HABIB, A. G. Cost-Effectiveness of Antivenoms for Snakebite Envenoming in 16 Countries in West Africa. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004568, 30

mar. 2016.

HARRISON, R. A.; HARGREAVES, A.; WAGSTAFF, S. C.; FARAGHER, B.; LALLOO, D. G. Snake Envenoming: A Disease of Poverty. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 12, p. e569, 22 dez. 2009.

HARVEY, A. L. Toxins and drug discovery. **Toxicon**, v. 92, p. 193–200, dez. 2014.

HIGUCHI, D. A.; BARBOSA, C. M. V.; BINCOLETTA, C.; CHAGAS, J. R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; PESQUERO, J. L. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 89, n. 3, p. 319–328, mar. 2007.

HOLMSTRÖM, K. M.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 411–421, 1 jun. 2014.

HOTCHKISS, R. S.; STRASSER, A.; MCDUNN, J. E.; SWANSON, P. E. Cell Death. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 16, p. 1570–1583, 15 out. 2009.

HUANG, M. Z.; WANG, Q. C.; LIU, G. F. Effects of an acidic phospholipase A2 purified from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom on rat heart. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 31, n. 5, p. 627–35, maio 1993.

HURD, T. R.; DEGENNARO, M.; LEHMANN, R. Redox regulation of cell migration and adhesion. **Trends in Cell Biology**, v. 22, n. 2, p. 107–115, fev. 2012.

IZIDORO, L. F. M. *et al.* Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 20, p. 7034–7043, out. 2006.

IZIDORO, L. F. M. *et al.* Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: Trends in Pharmacology and Biochemistry. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–19, 2014.

KANG, T. S. *et al.* Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**, v. 278, n. 23, p. 4544–4576, dez. 2011.

KANZAWA, N.; SHINTANI, S.; OHTA, K.; KITAJIMA, S.; EHARA, T.; KOBAYASHI, H.; KIZAKI, H.; TSUCHIYA, T. Achacin induces cell death in HeLa cells through two different mechanisms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 422, n. 1, p. 103–109, 2004.

KOH, C. Y.; KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics – Cardiovascular examples. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 497–506, mar. 2012.

KOHLHOFF, M.; BORGES, M. H.; YARLEQUE, A.; CABEZAS, C.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 7, p. 2181–2195, abr. 2012.

KROEMER, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 10 jan. 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 10, p. 790–802, out. 2003.

LI, R.; LI, A. Antibacterial efficacy of recombinant *Siganus oramin*-amino acid oxidase expressed in *Pichia pastoris*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 41, n. 2, p. 356–361, dez. 2014.

LOPES-DE-SOUZA, L.; STRANSKY, S.; GUERRA-DUARTE, C.; FLOR-SÁ, A.; SCHNEIDER, F. S.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Determination of Toxic Activities in *Bothrops* spp. Snake Venoms Using Animal-Free Approaches: Correlation Between In Vitro Versus In Vivo Assays. **Toxicological Sciences**, v. 147, n. 2, p. 458–465, out. 2015.

MALLER, C.; SCHRÖDER, E.; EATON, P. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is unlikely to mediate hydrogen peroxide signaling: studies with a novel anti-dimedone sulfenic acid antibody. **Antioxidants & redox signaling**, v. 14, n. 1, p. 49–60, jan. 2011.

MARCINKIEWICZ, C. Applications of snake venom components to modulate integrin activities in cell–matrix interactions. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 9, p. 1974–1986, set. 2013.

MARIÑO, G.; NISO-SANTANO, M.; BAEHRECKE, E. H.; KROEMER, G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 81–94, 8 jan. 2014.

MARKLAND, F. S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 3–18, fev. 2013.

MCCAFFREY, L. M.; MACARA, I. G. Epithelial organization, cell polarity and tumorigenesis. **Trends in Cell Biology**, v. 21, n. 12, p. 727–735, dez. 2011.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas no Brasil. *In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2 ed ed. [s.l.] Sarvier, 2009. p. 42–70.

MENALDO, D. L.; BERNARDES, C. P.; PEREIRA, J. C.; SILVEIRA, D. S. C.; MAMEDE, C. C. N.; STANZIOLA, L.; OLIVEIRA, F. DE; PEREIRA-CROTT, L. S.; FACCIOLI, L. H.; SAMPAIO, S. V. Effects of two serine proteases from Bothrops pirajai snake venom on the complement system and the inflammatory response. **International Immunopharmacology**, v. 15, n. 4, p. 764–771, abr. 2013.

MENEZES, M. C.; FURTADO, M. F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; CAMARGO, A. C. M.; SERRANO, S. M. T. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen Bothrops jararaca siblings. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 304–312, mar. 2006.

MIZUSHIMA, N. Autophagy: process and function. **Genes & Development**, v. 21, n. 22, p. 2861–2873, 15 nov. 2007.

MORAIS, I. C. O.; PEREIRA, G. J. S.; ORZÁEZ, M.; JORGE, R. J. B.; BINCOLETTO, C.; TOYAMA, M. H.; MONTEIRO, H. S. A.; SMAILI, S. S.; PÉREZ-PAYÁ, E.; MARTINS, A. M. C. L- Aminoacid Oxidase from Bothrops leucurus Venom Induces Nephrotoxicity via Apoptosis and Necrosis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0132569, 20 jul. 2015.

MORASSO, M. I.; TOMIC-CANIC, M. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. **Biology of the Cell**, v. 97, n. 3, p. 173–183, mar. 2005.

MORE, S.; KIRAN, K.; VEENA, S.; GADAG, J. Purification of an L-amino acid oxidase from Bungarus caeruleus (Indian krait) venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 1, p. 60–76, 2010.

MOURA-DA-SILVA, A.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of Snake Venom Metalloproteinases in Cell Biology: Effects on Platelets, Inflammatory and Endothelial Cells. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 28, p. 2893–2905, 1 out. 2007.

NASCIMENTO, J. M.; FRANCHI, G. C.; NOWILL, A. E.; COLLARES-BUZATO, C. B.; HYSLOP, S. Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by Bothrops alternatus snake venom in

cultured Madin–Darby canine kidney cells. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 85, n. 5, p. 591–605, out. 2007.

NAUMANN, G. B. *et al.* Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from Bothrops leucurus venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1810, n. 7, p. 683–694, jul. 2011.

NICOLAS, J.; LIN, Y.; LAMBEAU, G.; GHOMASHCHI, F.; LAZDUNSKI, M.; GELB, M. H. Localization of Structural Elements of Bee Venom Phospholipase A 2 Involved in N-type Receptor Binding and Neurotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 11, p. 7173–7181, 14 mar. 1997.

NÚÑEZ, V.; CID, P.; SANZ, L.; LA TORRE, P. DE; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J. Snake venomomics and antivenomics of Bothrops atrox venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards pedomorphism. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 1, p. 57–78, 2 nov. 2009.

PAPUSHEVA, E.; HEISENBERG, C.-P. Spatial organization of adhesion: force-dependent regulation and function in tissue morphogenesis. **The EMBO journal**, v. 29, n. 16, p. 2753–68, 18 ago. 2010.

PARDAL, P. P. DE O. *et al.* Clinical trial of two antivenoms for the treatment of Bothrops and Lachesis bites in the north eastern Amazon region of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 28–42, jan. 2004.

PESSINI, A. C.; TAKAO, T. T.; CAVALHEIRO, E. C.; VICHNEWSKI, W.; SAMPAIO, S. V; GIGLIO, J. R.; ARANTES, E. C. A hyaluronidase from Tityus serrulatus scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 39, n. 10, p. 1495–504, out. 2001.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24–29, mar. 2001.

POWELL, D. W. Barrier function of epithelia. **The American journal of physiology**, v. 241, n. 4, p. G275-88, out. 1981.

PRIJATELJ, P.; CHARNAY, M.; IVANOVSKI, G.; JENKO, Z.; PUNGERCAR, J.; KRIZAJ, I.;



FAURE, G. The C-terminal and beta-wing regions of ammodytoxin A, a neurotoxic phospholipase A2 from *Vipera ammodytes ammodytes*, are critical for binding to factor Xa and for anticoagulant effect. **Biochimie**, v. 88, n. 1, p. 69–76, jan. 2006.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C. V.; FURTADO, M. DE F. D.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 842–851, dez. 2008.

RATES, B.; VERANO-BRAGA, T.; SANTOS, D. M.; NUNES, K. P.; PIMENTA, A. M. C.; LIMA, M. E. DE. From the stretcher to the pharmacy's shelf: drug leads from medically important brazilian venomous arachnid species. **Inflammation & allergy drug targets**, v. 10, n. 5, p. 411–9, out. 2011.

RECZEK, C. R.; CHANDEL, N. S. ROS-dependent signal transduction. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 33, p. 8–13, abr. 2015.

REERS, M.; SMITH, T. W.; CHEN, L. B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**, v. 30, n. 18, p. 4480–6, 7 maio 1991.

RIBEIRO, P. H.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. F. C.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; NOMIZO, A.; SOARES, A. M. Mechanism of the cytotoxic effect of l -amino acid oxidase isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 329–337, nov. 2016.

RODRIGUES, R. S.; SILVA, J. F. DA; BOLDRINI FRANÇA, J.; FONSECA, F. P. P.; OTAVIANO, A. R.; HENRIQUE SILVA, F.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S. K.; SANTOS, J. I. DOS. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie**, v. 91, n. 4, p. 490–501, abr. 2009.

SALDARRIAGA, M. M.; OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; TORO, M. F.; DÍAZ, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. **Toxicon**, v. 42, n. 4, p. 405–411, set. 2003.

SAMEL, M.; TÕNISMÄGI, K.; RÖNNHOLM, G.; VIJA, H.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, E. l-Amino acid oxidase from *Naja naja oxiana* venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 149, n. 4, p. 572–580, abr. 2008.

SAMEL, M.; VIJA, H.; RÖNNHOLM, G.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, E. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting l-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1764, n. 4, p. 707–714, abr. 2006.

SÁNCHEZ, E. E.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; PALOMAR, R.; LUCENA, S. E.; BASHIR, S.; SOTO, J. G.; PÉREZ, J. C. Colombistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. **Archives of Toxicology**, v. 83, n. 3, p. 271–279, 2 mar. 2009.

SANTANA MALAQUE, C. M.; GUTIERREZ, J. M. **Critical Care Toxicology**. Cham: Springer International Publishing, 2017.

SERRANO, S. M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 19–26, fev. 2013.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115–1132, jun. 2005.

SHANBHAG, V. K. L. Applications of snake venoms in treatment of cancer. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 4, p. 275–276, abr. 2015.

SHAPIRO, L.; WEIS, W. I. Structure and Biochemistry of Cadherins and Catenins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 3, p. a003053–a003053, 1 set. 2009.

SILVEIRA, L. B.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; SILVA, F. P.; MARCUSSI, S.; FULY, A. L.; NOMIZO, A.; SILVA, S. L. DA; STÁBELI, R. G.; ARANTES, E. C.; SOARES, A. M. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A2 from *Bothrops moojeni* snake venom. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, p. 35–43, 25 jan. 2013.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1488, n. 1–2, p. 1–19, out. 2000.

SOUSA, L. F. *et al.* Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.

7, n. 9, p. e2442, 12 set. 2013.

STÁBELI, R. G. *et al.* Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: Biochemical and functional characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 2, p. 132–140, jul. 2007.

STÁBELI, R. G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B.; PIETRO, R. C. L. R. L. R.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. H. S.; GIGLIO, J. R.; OLIVEIRA, E. B.; SOARES, A. M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 11, p. 2881–2886, 1 jun. 2004.

SUHR, S. M.; KIM, D. S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 224, n. 1, p. 134–9, jul. 1996.

SUN, L.; WANG, X. A new kind of cell suicide: mechanisms and functions of programmed necrosis. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 12, p. 587–593, dez. 2014.

TAULET, N.; DELORME-WALKER, V. D.; DERMARDIROSSIAN, C. Reactive Oxygen Species Regulate Protrusion Efficiency by Controlling Actin Dynamics. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e41342, 2 ago. 2012.

TAVARES, C.; MACIEL, T.; BURIN, S.; AMBRÓSIO, L.; GHISLA, S.; SAMPAIO, S.; CASTRO, F. L-Amino acid oxidase isolated from *Calloselasma rhodostoma* snake venom induces cytotoxicity and apoptosis in JAK2V617F-positive cell lines. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, n. 2, p. 128–134, abr. 2016.

TEIXEIRA, T. L.; OLIVEIRA SILVA, V. A.; CUNHA, D. B. DA; POLETTINI, F. L.; THOMAZ, C. D.; PIANCA, A. A.; ZAMBOM, F. L.; SILVA LEITÃO MAZZI, D. P. DA; REIS, R. M.; MAZZI, M. V. Isolation, characterization and screening of the in vitro cytotoxic activity of a novel L-amino acid oxidase (LAAOcdt) from *Crotalus durissus terrificus* venom on human cancer cell lines. **Toxicon**, v. 119, p. 203–217, set. 2016.

THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 279, n. 6, p. L1005-28, dez. 2000.

TÕNISMÄGI, K.; SAMEL, M.; TRUMMAL, K.; RÖNNHOLM, G.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.;

SIIGUR, E. L-Amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: Isolation, characterization, effects on platelets and bacteria. **Toxicon**, v. 48, n. 2, p. 227–237, ago. 2006.

TOYAMA, M. H. *et al.* Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 47–57, jan. 2006.

ULLAH, A.; SOUZA, T. A. C. B.; ABREGO, J. R. B.; BETZEL, C.; MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K. Structural insights into selectivity and cofactor binding in snake venom L-amino acid oxidases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 421, n. 1, p. 124–128, abr. 2012.

WARRELL, D. A. Snake venoms in science and clinical medicine 1. Russell's viper: biology, venom and treatment of bites. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 6, p. 732–740, nov. 1989.

WEI, J.-F.; YANG, H.-W.; WEI, X.-L.; QIAO, L.-Y.; WANG, W.-Y.; HE, S.-H. Purification, characterization and biological activities of the L-amino acid oxidase from *Bungarus fasciatus* snake venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 54, n. 3, p. 262–71, 1 set. 2009.

WEI, X.-L.; WEI, J.-F.; LI, T.; QIAO, L.-Y.; LIU, Y.-L.; HUANG, T.; HE, S.-H. Purification, characterization and potent lung lesion activity of an L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* snake venom. **Toxicon**, v. 50, n. 8, p. 1126–1139, 15 dez. 2007.

WILLIAMS, D.; GUTIÉRREZ, J. M.; HARRISON, R.; WARRELL, D. A.; WHITE, J.; WINKEL, K. D.; GOPALAKRISHNAKONE, P. **The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite** *The Lancet*, 2010.

WU, W. Activation of MMP-2, cleavage of matrix proteins, and adherens junctions during a snake venom metalloproteinase-induced endothelial cell apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 288, n. 1, p. 143–157, 1 ago. 2003.

YAN, C.-H.; LIANG, Z.-Q.; GU, Z.-L.; YANG, Y.-P.; REID, P.; QIN, Z.-H. Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX-induced death of K562 cells. **Toxicon**, v. 47, n. 5, p. 521–530, abr. 2006.

YANG, C.-A.; CHENG, C.-H.; LIU, S.-Y.; LO, C.-T.; LEE, J.-W.; PENG, K.-C. Identification of antibacterial mechanism of L-amino acid oxidase derived from *Trichoderma harzianum* ETS

323. **FEBS Journal**, v. 278, n. 18, p. 3381–3394, set. 2011.

YAU, T. W.; KUCHEL, R. P.; KOH, J. M. S.; SZEKELY, D.; MIRTSCHIN, P. J.; KUCHEL, P. W. Cytoskeletal rearrangements in human red blood cells induced by snake venoms: light microscopy of shapes and NMR studies of membrane function. **Cell Biology International**, v. 36, n. 1, p. 87–97, 1 jan. 2012.

ZAMUNÉR, S. R.; CRUZ-HÖFLING, M. A. DA; CORRADO, A. P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian Bothrops venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 259–271, set. 2004.

ZHANG, J.; WANG, X.; VIKASH, V.; YE, Q.; WU, D.; LIU, Y.; DONG, W. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–18, 2016.

ZHANG, L.; WEI, L.-J. ACTX-8, a cytotoxic l-amino acid oxidase isolated from Agkistrodon acutus snake venom, induces apoptosis in Hela cervical cancer cells. **Life Sciences**, v. 80, n. 13, p. 1189–1197, mar. 2007.

ZHIFEN, Y.; KLIONSKY, D. J.; YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. Eaten alive : a history of macroautophagy. v. 12, n. 9, p. 814–822, set. 2013.

# ***ANEXOS***

## 9. ANEXOS

Assim como o ofidismo, o escorpionismo também representa um problema de saúde pública em diversas partes do mundo. O escorpião *Hadruides lunatus* é o mais abundante na costa central do Peru, onde ocorre a maioria dos casos de picadas e envenenamento em humanos. Entretanto, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação do veneno. Durante a realização desta tese foram publicados dois trabalhos que visaram a caracterização patofisiológica do envenenamento por *H. lunatus*.

Em 2015 foi publicado, na *Toxicon*, o artigo intitulado “Serological, biochemical and enzymatic alterations in rodents after experimental envenomation with *Hadruides lunatus* scorpion venom.”, desenvolvido por **Costal-Oliveira F**, Guerra-Duarte C, Castro KL, Tintaya B, Bonilla C, Silva W, Yarlequé A, Fujiwara R, Melo MM, Chávez-Olórtegui C., anexado a seguir.

Em 2016 foi publicado, na *Journal of Venomous Animals and Toxins*, o trabalho intitulado “Cardiorespiratory alterations in rodents experimentally envenomed with *Hadruides lunatus* scorpion venom.”, desenvolvido por **Costal-Oliveira F**, Guerra-Duarte C, Oliveira MS, Castro KL, Lopes-de-Sousa L, Lara A, Gomes ER, Bonilla C, Guatimosim S, Melo MM, Chávez-Olórtegui C., anexado a seguir.



## Serological, biochemical and enzymatic alterations in rodents after experimental envenomation with *Hadruides lunatus* scorpion venom



F. Costal-Oliveira <sup>a,1</sup>, C. Guerra-Duarte <sup>a,1</sup>, K.L.P. Castro <sup>a</sup>, B. Tintaya <sup>c</sup>, C. Bonilla <sup>c</sup>, W. Silva <sup>c</sup>, A. Yarlequé <sup>e</sup>, R. Fujiwara <sup>d</sup>, M.M. Melo <sup>b</sup>, C. Chávez-Olórtegui <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamentos de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> Instituto Nacional de Salud, Lima, Peru

<sup>d</sup> Departamento de Parasitología do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil

<sup>e</sup> Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 May 2015

Received in revised form

22 June 2015

Accepted 25 June 2015

Available online 30 June 2015

#### Keywords:

*Hadruides lunatus*

Scorpion venom

Envenoming

Serological parameters

### ABSTRACT

Toxic effects of Peruvian *Hadruides lunatus* scorpion venom on different biochemical and enzymatic parameters in blood serum of Wistar rats and Swiss mice were determined after experimental envenomation. An increase in enzymatic activities of Aspartate Aminotransferase (AST), Lactate Dehydrogenase (LDH) and levels of serum protein and albumin were observed while a decrease in creatinine level in serum was perceived after 30 min of envenomation. No alterations in urea levels and in kidney histology were detected in the envenomed rats. The global leukocytes count was diminished, with decrease in lymphocytes, eosinophils and neutrophils levels in the bloodstream, while no alterations were found in hematological parameters of red series in rats injected with *H. lunatus* venom. IL-2, IL-4, IL-6, INF- $\gamma$ , TNF, IL-17A and IL-10 levels were evaluated 0.5, 3 and 6 h after experimental envenomation of mice with *H. lunatus* venom. From all the analyzed cytokines, only IL-6 showed an increase in serum levels. Taken together, these results point out that envenomation by *H. lunatus* can impair hematological and immunological parameters and therefore might be monitored in accidents involving this species.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

In accidents by scorpion stings is frequently observed a complex pattern of clinical symptoms due to perturbation of the nervous, cardiovascular and respiratory systems, a process that can lead to death (Campos et al., 1980; Ismail, 1995). Pain, agitation, tachycardia, tachypnea, salivation, sweating, hypertension, hyperglycemia, convulsions, abdominal pain and bronchospasm have already been reported. Most of these symptoms are caused by the action of neurotoxins on the victim's ion channels (Chippaux, 2012). Leukocytosis, hyperglycemia and lactic acidosis are common findings in envenomed patients (Adi-Bessalem et al., 2008). Disturbance of electrolytes (Correa et al., 1997), alteration of

hematological parameters (Cusinato et al., 2010) and altered lung mechanics (Adi-Bessalem et al., 2011; Paneque-Peres et al., 2009) are also important effects of scorpion envenomation, as well as increased serum levels of biomarkers for necrosis (Chippaux, 2012).

*Hadruides spp.* scorpions are included in the Luridae family and have been reported in Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador, Peru, and Venezuela (Mello-Leitão, 1945; Esquivel de Verde, 1968; Kinzelbach, 1973; Maury, 1974; Cekalovic, 1983; Sissom and Fet, 2000), however they are currently restricted to Peru, Ecuador, northern Chile and several offshore islands (Ochoa and Prendini, 2010). *Hadruides lunatus* ("escorpion de los pedregales") is the most medically relevant species of this gender in Peru. According to the Health Ministry of Peru (Ministerio de Salud del Perú, 2004), the number of human envenomation cases reported has increased over the past years, with most incidents occurring in the Central Coast of the country, which corresponds with the main area of geographical distribution of *H. lunatus* scorpions (Zavaleta et al., 1981). Injection of mice with *H. lunatus* soluble venom displayed typical symptoms of intoxication such as excitability, agitation,

\* Corresponding author. Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, CP: 486, Belo Horizonte CEP: 31270-901, Brazil.

E-mail address: [olortegi@icb.ufmg.br](mailto:olortegi@icb.ufmg.br) (C. Chávez-Olórtegui).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.



salivation, eye secretions, sweating, convulsions and paralysis of legs. The observed symptoms closely resemble those produced by the venom of Buthidae scorpions of the genera *Centruroides* or *Tityus* (Possani et al., 1977; Costal Oliveira et al., 2012).

It has been verified that systemic inflammatory response also takes place in victims of scorpionism and this scenario cannot be solely explained by direct neurotoxin's action. It was demonstrated that the injection of scorpion venom can cause an increase in pro-inflammatory cytokines production, resulting in fever, anorexia, vasodilatation, hypotension and increased of vessel permeability, that may ultimately lead to multiple organ dysfunction and death (Petricevich, 2010; Adi-Bessalem et al., 2011).

Since a full characterization of envenomation by *H. lunatus* in mice has not been done, the present work aimed to describe some hematological, biochemical and immunological alterations caused by the sub-cutaneous injection of *H. lunatus* venom in rodents, as a model to mammal envenomation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and venoms

*H. lunatus* scorpions were collected in the region of Atocongo (Lima, Peru) and maintained in the herpetarium of the Centro Nacional de Producción de Biologicos of Instituto Nacional de Salud (INS), in Lima, Peru. Scorpions were maintained in plastic boxes with water ad libitum and were fed weekly with cockroaches. The venom from mature scorpions was obtained by electrical stimulation (12 V) of the telsons. The venom collected in micropipettes was diluted in ultrapure water (Phoneutria Biotecnologia, Brazil), pooled and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. The protein concentration was determined following Lowry et al. (1951) protocol.

Twelve male Wistar rats (110–150 g) and thirty Swiss mice (18–22 g) were maintained at the Centro de Bioterismo of the Instituto de Ciências Biológicas of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil. All animals received water and food under controlled environmental conditions. The experimental protocols were approved by the “Ethics Committee on the Use of Laboratory Animals of UFMG” (CETEA-UFMG protocol 092/11).

### 2.2. Biochemical analyses

Rats were distributed in two experimental groups ( $n = 6$ ). Animals in the control group received 400  $\mu\text{L}$  of ultra-pure water, and those in treated group received 400  $\mu\text{L}$  of a solution containing 750  $\mu\text{g}$  of *H. lunatus* scorpion venom (*Hlsv*) (a dose equivalent to approximately one fourth of the  $\text{LD}_{50}$  for rats), in water, via sub-cutaneous injection in the interscapular region.

To evaluate tissue damage, different enzyme profiles were measured. Before blood collection animals were anaesthetized by intramuscular injection of a mixture of xylazine hydrochloride (10 mg/kg) and ketamine (75 mg/kg). Blood samples were collected by intracardiac puncture 30 min after the administration of the venom or water. Serum urea, creatinine and total protein were determined using commercial kits from Bioclin (Belo Horizonte, MG, Brazil), according to manufacturer's instructions.

### 2.3. Hematological parameters

Hematological parameters were measured using the same blood samples collected for biochemical analysis. Total red blood cells, leucocytes and hemoglobin (Hb) concentration were determined using electronic counter (Celm CC-530<sup>®</sup>-CELM). For the differential counts of leucocytes and platelets, blood smears were made in glass

slides, fixed and stained with panoptic. Corpuscular volume was measured using the microhematocrit method and total protein concentration was determined by refractometry.

### 2.4. Electrophoresis

Serum proteins profile was obtained by electrophoresis in agarose gel (Celmgel, CELM general agarose gel), stained with Ponceau. In order to determine albumin and globulin concentrations, it was used CELM SE-250 software.

### 2.5. Cytokine quantification

Swiss mice were divided in six groups of five animals each. Mice from venom group were injected subcutaneously with 20  $\mu\text{g}$  of *Hlsv* dissolved in 0.1 ml of saline solution while control animals received 0.1 ml of saline solution. Mice were bled 30, 180 and 360 min after de injection. Th1/Th2/Th17 cytokine profiles were evaluated in the serum of mice injected with *Hlsv* or saline solution (as described above). The cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10 and IL-17A were measured via flow cytometry with a FACScan flow cytometer (BD Biosciences, USA) using a Cytometric Bead Array kit (CBA - BD Biosciences, USA).

### 2.6. Statistical analysis

Quantitative data were expressed as means + SD. The statistical analysis was determined by performing analysis of variance (ANOVA), and by Mann–Whitney test. The significance level was set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Biochemical analyses

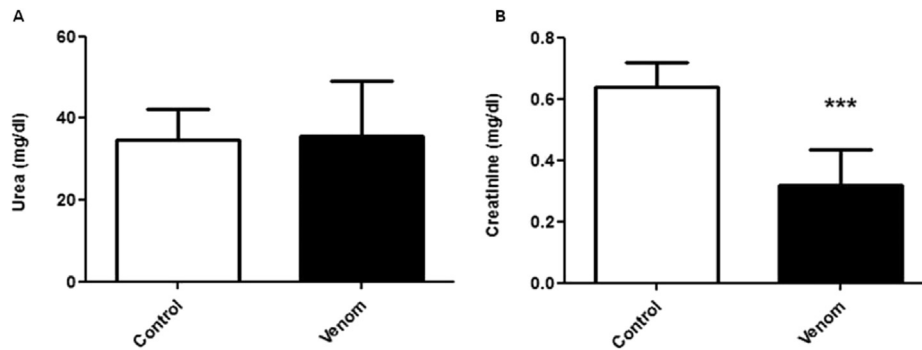
Urea and creatinine serum levels are used in routine as a diagnosis of renal function. As shown in Fig. 1, rats treated with *Hlsv* showed no significant alterations in serum concentration of urea when compared with the control group. On the other hand it was observed a decrease in creatinine levels in the venom group.

Tissue injury caused by scorpion envenoming can be detected by biochemical markers as creatine kinase (CK), aspartate amino transferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) (Chippaux, 2012). CK levels in *H. lunatus* envenoming has already been measured, showing significant alterations (Costal-Oliveira et al., 2012). AST and LDH tests were developed in this study. As shown in Fig. 2, the concentration of AST and LDH levels in envenomed rats were significantly greater than those of the control group, which indicates tissue damage.

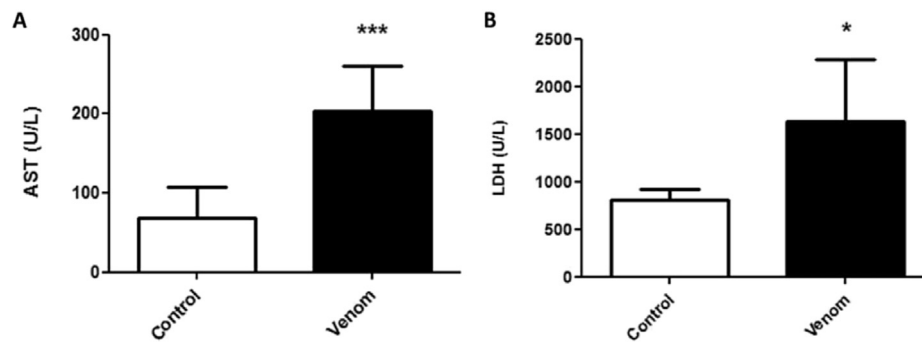
### 3.2. Hematological parameters

Most hematological parameters of the *Hlsv* treated group were similar to those shown by untreated group. In the red series, no alterations were detected comparing envenomed versus control groups (Table 1). However, envenomed rats presented significant decrease in blood levels of leucocytes, neutrophils, lymphocytes and eosinophil (Table 2).

Total serum protein mainly comprises albumin, globulins and fibrinogen. In this study, it was observed that both total serum protein (Fig. 3A) and albumin (Fig. 3B) had a considerable increase after the injection of *Hlsv*. Electrophoresis showed augmented alfa and gama globulins fractions of the serum proteins in treated animals whilst beta globulins were diminished (Fig. 3C).



**Fig. 1.** Plasmatic levels of urea and creatinine in *Hlsv* treated and normal rats. No significant variation was found in urea level. Creatinine levels showed a significant decrease in *Hlsv* treated group. Values are means  $\pm$  SEM of 6 animals. \*\*\* $P < 0.001$  compared to control group.



**Fig. 2.** Plasmatic levels of AST and LDH in *Hlsv* treated and normal rats. These enzymes showed significant increased levels in *Hlsv* treated rats plasma, compared to control group. Values are means  $\pm$  SEM of 6 animals. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared to control group.

**Table 1**

Red series. Mean values for platelets, red blood cells, hemoglobin (Hb), hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) in rats blood, 30 min after treatment.

Group	Platelets ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	Red blood cells ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	Hb (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (%)
Control	616.6 $\pm$ 66.03	6.61 $\pm$ 0.58	13.38 $\pm$ 0.49	43.16 $\pm$ 0.98	65.32 $\pm$ 6.6	20.14 $\pm$ 2.05	30.63 $\pm$ 1.58
Venom	550.16 $\pm$ 145.33	6.21 $\pm$ 1.08	12.18 $\pm$ 2.48	38 $\pm$ 7.42	61.11 $\pm$ 5.44	20.36 $\pm$ 2.49	32.07 $\pm$ 1.83

**Table 2**

White series. Mean counts of leukocytes and total neutrophil, ring cells, lymphocytes, rod cells, monocytes, and eosinophil, 30 min after treatment.

Group	Leucocytes ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	Neutrophils ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	Ring cells ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	Lymphocytes ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	Rod cells ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	Moriocvtes ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	Eosinophils ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )
Control	6.6 $\pm$ 0.94	0.98 $\pm$ 0.1	0.19 $\pm$ 0.08	5.06 $\pm$ 0.95	0.15 $\pm$ 0.07	0.12 $\pm$ 0.06	0.08 $\pm$ 0.05
Venom	3.65 $\pm$ 2.29*	0.61 $\pm$ 0.35*	0.13 $\pm$ 0.09	2.06 $\pm$ 1.06***	0.21 $\pm$ 0.19	0.11 $\pm$ 0.09	0**

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , compared to control group.

### 3.3. Cytokine production

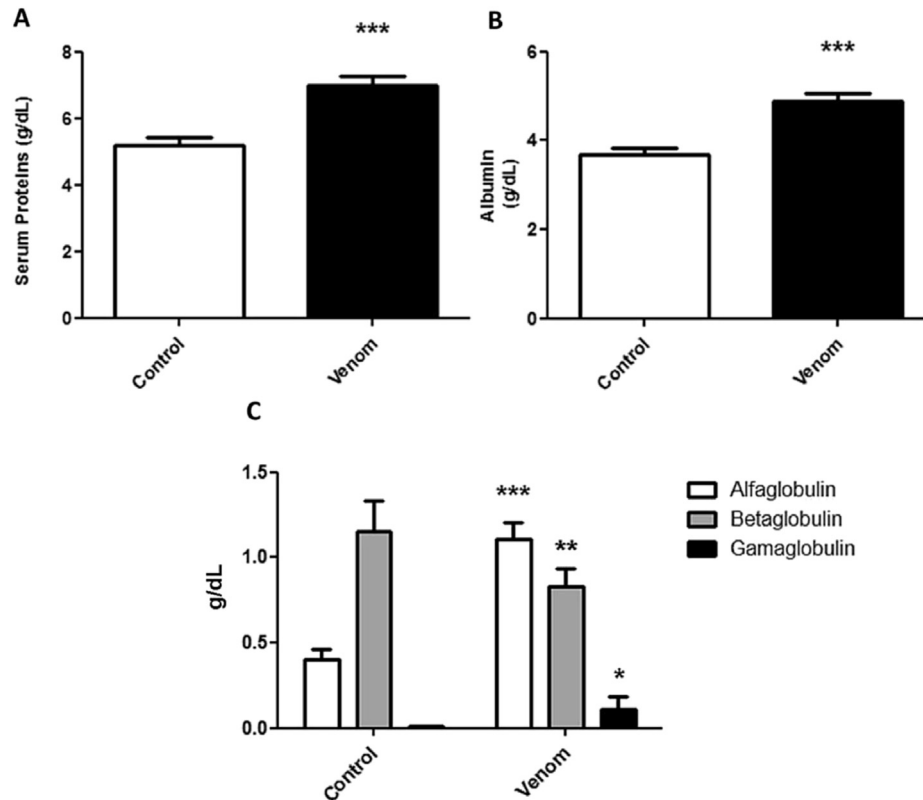
Fig. 4 shows the kinetics of cytokine production after the injection of *Hlsv* in mice. It was observed an increase of IL-6 serum levels after 180 min when compared to the placebo (Fig. 4B). There was no significant difference of IL-2, IL-4, INF- $\gamma$ , TNF, IL-17A and IL-10 levels when compared to control group.

## 4. Discussion

Classical neurotoxic symptoms are caused by *Hlsv* in mammals experimentally envenomed (Cáceres et al., 1972; Zavaleta et al., 1981). Except for a general descriptions of biochemical and immunological characteristics of this envenomation, (Costal-Oliveira et al., 2012), alterations of hematological and cytokines

profile after experimental injection of *Hlsv* in rodents were not investigated until the moment.

In the first part of this work, we observed the levels of urea, creatinine, albumin, total serum protein and verified kidney tissue histology changes after 30 min of mice envenomation by *Hlsv*. Significant augmentation of total serum protein and albumin, lower creatinine levels, no-alterations in urea levels and no alterations in kidney histology (data not shown) were found in the envenomed group. Creatinine decrease is usually a marker of kidney damage and some previous works have described such alteration resulting from scorpion envenomation (Alvez et al., 2005; Correa et al., 1997; Heidarpour et al., 2012). Low creatinine may also indicate dehydration, which is a symptom often observed in scorpion envenomation. The high level of total serum protein and albumin corroborates to illustrate the dehydration caused by the venom. The



**Fig. 3.** Effects of *Hlsv* treatment in the levels of total protein (A), albumin (B), and alpha, beta and gamma-globulins (C). Values are means  $\pm$  SEM of 6 animals. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared to control group.

time elapsed between the envenomation of the experimental animals and the organ collection might not have been enough to make it possible to visualize the histological alteration of the kidney, but the creatinine decrease is a sign that this organ is targeted by *Hlsv*.

High levels of aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) were also detected in envenomed mice, suggesting that muscles, heart, liver and lungs are also possible toxicity targets. These last results related with tissue lesion are in accordance with previous studies of Pessini et al. (2001); El-Alfy et al. (2008); Adi-Bessalem et al., (2008); Cusinato et al. (2010) and Pinto et al. (2010), which also described the release of AST, LDH and CK in the blood stream after scorpion envenoming. The increase in CK after *Hlsv* envenoming has already been reported (Costal-Oliveira et al., 2012 and Pinto et al., 2010).

Unlike the experiment performed in 2010 by Cusinato and co-workers, that described significant increase in hematocrit, red blood cells count and Hb, 30 min to 6 h after *Tityus serrulatus* venom injection, and the study from Ribeiro et al., 2010, no significant alterations were found in the hematological parameters of the red series of rats injected with *Hlsv*. However, in these previous works, the hemoconcentration caused by *T. serrulatus* envenoming was detected after 2 h of venom inoculation. In this experiment, blood was withdrawn 30 min after envenomation and might not have been sufficient to detect alterations in the erythrogram.

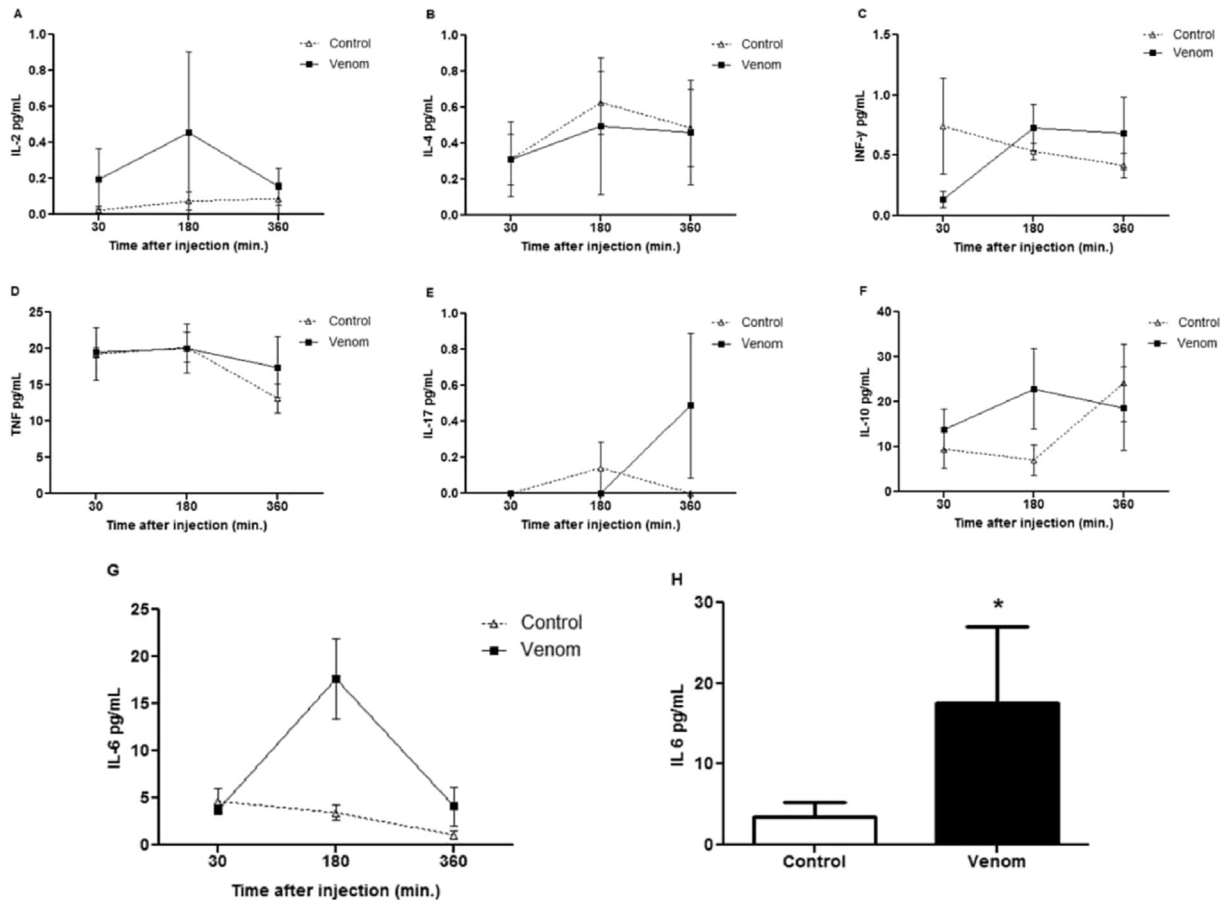
The global leukocytes count in *Hlsv* envenomed rats was diminished, with significant decrease in lymphocytes, eosinophils and neutrophils levels in the bloodstream. The work of Pessini et al., 2003, that reported acute-phase response in *T. serrulatus* envenomation, observed leukocytosis 8 h after envenoming but showed a discrete yet non-statistically significant diminishing after 4 h of venom injection. Also, the work of Adi-Bessalem et al., 2008, showing alterations after *Androctonus australis* envenoming,

observed a decrease in lymphocyte count after 45 min of envenomation that continued until 4 h elapsed. Unlike these results, leukocytosis has been observed after scorpion venom administration in other cases, after 2–4 h of envenoming (Cupo et al., 2003; Pessini et al., 2003; Ribeiro et al., 2010).

When there is tissue damage, the organism strategy is to recruit leukocytes to the injured site (Smith, 1994). Previously, we have seen that it was possible to detect infiltrated cells in lungs of *Hlsv* envenomed rats (data not published). Furthermore, it was already observed leukocytes infiltration in heart tissue, 1 h after *Hadrur-oides charcasus* experimental envenomation in *Bufo spinulosus* (Zuñiga et al., 2014).

Rodents present some particularities in hematological parameters. Most of their circulating leukocytes are lymphocytes and can account for up to 70% of total white cells (Lindstrom et al., 2015). Unlike neutrophils, which are short-lived cells with fast turnover and compose the first line of recruited cells during acute inflammation (Summers et al., 2010), lymphocytes are not specialized in resolving inflammation and are not particularly activated to expand in these cases. To explain the leucopenia detected in rats acutely envenomed with *Hlsv*, our hypothesis is that the venom affected organs, setting signals that attracted leukocytes to the injured site. As the majority of circulating cells are lymphocytes, late cells that take longer time to turnover, they might have migrated from the marginal pool. The short period of time elapsed between venom administration and blood collection might not have been enough to stimulate cell proliferation.

In addition to blood cell count, it was analyzed the plasmatic protein concentration in *Hlsv* envenomed rats. A significant raise in total plasmatic protein and albumin was detected, corroborating the results of Cusinato et al., 2010 and Pessini et al., 2003, confirming once more the dehydration. Electrophoresis of plasmatic



**Fig. 4.** Kinetics of cytokine production after *Hsv* treatment. Swiss mice received 20  $\mu$ g of *Hsv*. Analyses were made 30, 180 and 360 min after venom inoculation. Control animals received PBS under the same conditions. IL-2 (A), IL-4 (B), INF- $\gamma$  (C), TNF (D), IL-17 (E) e IL-10 (F). (G) Production of IL-6 180 min after inoculation in *Hsv* treated animals was significantly higher than control ones. Values are means  $\pm$  SEM of 5 animals \* $P < 0.05$ .

proteins revealed raise in alpha and gamma-globulins fractions and decrease in beta-globulin fraction in treated animals, compared to controls. Augmentation in acute phase proteins has been reported for scorpionism and high levels of alfa-globulins might be related to intense tissue lesion (Cusinato et al., 2010; Pessini et al., 2003).

In the last part of present study, the production of IL-2, IL-4, IL-6, INF- $\gamma$ , TNF, IL-17A and IL-10 were evaluated 30, 180 (3 h) and 360 min (6 h) after experimental envenomation of mice with *Hsv*. From all the analyzed cytokines, only IL-6 showed significant alterations. Maximum production was reached 3 h after venom administrations. IL-6 is associated with acute phase protein induction and together with other pro-inflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, TNF and INF- $\gamma$  can be responsible for local and systemic effects (Petricevich et al., 2002). In this way, Fukuhara et al. (2003), observed raise in pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8) and in regulatory IL-10 in patients stung by *T. serrulatus*. In the mentioned work, the authors observed a positive correlation between cytokines production and envenomation severity, concluding that, at least in part, the pathophysiology of *T. serrulatus* envenoming is mediated by these molecules.

In conclusion, it can be stated that, in spite of not being a member of the Buthidae family, where all medically relevant scorpion species are grouped, *H. lunatus* is a toxic scorpion species that causes a variety of enzymatic, hematological and immunological changes in the victim, potentially impairing its health. Recognizing this form of scorpionism and stablishing adequate treatments is important for medical care, taking into account the

increase in reported cases. The findings reported in our study might help to do so.

#### Conflict of interest

None.

#### References

- Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F., 2008. Pathophysiological effects of *Androctonus australis* hector scorpion venom: tissue damages and inflammatory response. *Exp. Toxicol. Pathol.* 60, 373–380. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2008.03.006>.
- Adi-Bessalem, S., Mendil, A., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F., 2011. Lung immunoreactivity and airway inflammation: their assessment after scorpion envenomation. *Inflammation* 35 (2), 501–508. <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-011-9338-0>.
- Alvez, R.S., do Nascimento, N.R.F., Barbosa, P.S.F., Kerntopf, M.R., Lessa, L.M.A., de Sousa, C.M., Monteiro, H.S.A., 2005. Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon* 46, 271–276. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.04.013>.
- Cáceres, I.E., Aguilar, P.G., Meneses, O., 1972. Escorpiones y escorpionismo en el Perú: II. Efectos del veneno del “Escorpion de los pedregales” en la costa central. *Rev. Per. Entom.* 15 (1), 38–43.
- Campos, J.A., Silva, O.S., Lopez, M., Freire-Maia, L., 1980. Signs, symptoms and treatment of severe scorpion poisoning in children. In: Eaken, D., T.Wadstrom (Eds.), *Natural Toxins*, pp. 61–68 (New York: Pergamon).
- Cekalovic, K.T., 1983. Catálogo de los escorpiones de Chile (Chelicerata, Scorpiones), 54. *Boletín de la Sociedad Biológica de Concepción*, pp. 43–70.
- Chippaux, J.-P., 2012. Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug Des. Dev. Ther.* 6, 165–173. <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S24754>.
- Correa, M., Sampaio, S., Lopes, R., Mancuso, L., Cunha, O., Franco, J., Giglio, J., 1997.

- Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I. *Toxicon* 35 (7), 1053–1067.
- Costal-Oliveira, F., Duarte, C.G., Machado de Avila, R.A., Melo, M.M., Bordon, K.C.F., Arantes, E.C., Chávez-Olórtegui, C., 2012. General biochemical and immunological characteristics of the venom from Peruvian scorpion *Hadruroides lunatus*. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinol.* 60 (5), 934–942. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.06.013>.
- Cupo, P., Azevedo-Marques, M.M., Hering, S.E., 2003. Acidentes por animais peçonhentos: escorpiões e aranhas. *Medicina*, pp. 490–497.
- Cusinato, D. a C., Souza, a M., Vasconcelos, F., Guimarães, L.F.L., Leite, F.P., Gregório, Z.M.O., Arantes, E.C., 2010. Assessment of biochemical and hematological parameters in rats injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* 56 (8), 1477–1486. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.09.003>.
- El-Alfy, A.T., Ahmed, A.A.E., Fatani, A.J., Kader, F., 2008. Amelioration of the cardiovascular manifestations of the yellow scorpion *Leiurus quinquestriatus* envenomation in rats by red grape seeds proanthocyanidins. *Toxicon* 51 (3), 321–333.
- Fukuhara, Y.D.M., Reis, M.L., Dellalibera-joviliano, R., Cunha, F.Q.C., Donadi, E.A., 2003. Increased plasma levels of IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-a in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 41, 49–55.
- Heidarpour, M., Ennaifer, E., Ahari, H., Srairi-Abid, N., Borchani, L., Khalili, G., Shahbazzadeh, D., 2012. Histopathological changes induced by *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom in mice. *Toxicon* 59 (3), 373–378. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.12.011>.
- Ismail, M., 1995. The scorpion envenomation syndrome. *Toxicon* 33 (7).
- Kinzelbach, R., 1973. Scorpions from the Galapagos islands. In: Galapagos, Studi e Ricerche. Spedizione "L. Mares – G.R.S.T.S.". Museo Zoologico dell'Universita' di Firenze, Firenze, pp. 1–12.
- Lindstrom, N.M., Moore, D.M., Zimmerman, K., Smith, S.A., 2015. Hematologic assessment in pet rats, mice, hamsters, and gerbils identification. *Hamst. Mouse Rat. Gerbil Blood Collect. Hematol. Hemogram* 18, 21–32.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Lewis Farr, A., Randal, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1), 265–275.
- Maury, E.A., 1974. Escorpiones y escorpionismo en el Perú IV, Revisión del género *Hadruroides* Pocock, 1893 (Scorpiones, Vejovidae). *Rev. Peru. Entomol.* 17 (1), 9–21.
- Mello-Leitão, C., 1945. Escorpiões sul-americanos. *Arq. do Mus. Nac. Rio J.* 407–468.
- Ochoa, J.A., Prendini, L., 2010. The genus *Hadruroides* Pocock, 1893 (Scorpiones: Iuridae), in Peru: new records and descriptions of six new species. *Am. Mus. Novitates* 3687, 1–56.
- Paneque-Peres, A.C., Nonaka, P.N., Carvalho P de, T., Toyama, M.H., Melo e Silva, C.A., Vieira, R.P., de Oliveira, L.V., 2009. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on lung mechanics and inflammation in mice. *Toxicon* 53, 779–785. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.002>.
- Pessini, A.C., Takao, T.T., Cavalheiro, E.C., Vichnewski, W., Sampaio, S.V., Giglio, J.R., Arantes, E.C., 2001. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon* 39, 1495–1504.
- Pessini, A.C., de Souza, A.M., Faccioli, L.H., Gregório, Z.M.O., Arantes, E.C., 2003. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. *Int. Immunopharmacol.* 3 (5), 765–774. [http://dx.doi.org/10.1016/S1567-5769\(03\)00078-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1567-5769(03)00078-X).
- Petricevich, V.L., 2002. Effect of *Tityus serrulatus* venom on cytokine production and the activity of murine macrophages. *Mediat. Inflamm.* 11, 23–31. <http://dx.doi.org/10.1080/09629350120117266>.
- Petricevich, V.L., 2010. Scorpion venom and the inflammatory response. *Mediat. Inflamm.* 2010. <http://dx.doi.org/10.1155/2010/903295>.
- Pinto, M.C.L., Borboleta, L.R., Melo, M.B., Labarre, C.R., Melo, M.M., 2010. *Tityus fasciolatus* envenomation induced cardio-respiratory alterations in rats. *Toxicon* 55, 1132–1137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.002>.
- Possani, L.D., Alagon, A.C., Fletcher Jr., P.L., Erickson, B.W., 1977. Purification and properties of mammalian toxins from the venom of Brazilian Scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Arch. Biochem. Biophys.* 180, 94–103.
- Ribeiro, E.L., Pinto, M.C.L., Labarrère, C.R., Paes, P.R.O., Paes-Leme, F.O., Chávez-Olórtegui, C., Melo, M.M., 2010. Biochemical profile of dogs experimentally envenomed with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* 55 (6), 1125–1131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.001>.
- de Salud, Peru, Ministério, 2004. Norma Técnica sobre Prevencion y Tratamiento de Accidentes por Animales Ponzonosos. <http://www.minsa.gob.pe/dgsp/documentos/deais/Norma%20Final%20Ponzo%C3%B1os-2004.pdf>, 16 March 2012.
- Sissom, W.D., Fet, V., 2000. Family iuridae Thorell, 1876. In: Fet, V., Sissom, W.D., Lowe, G., Braunwalder, M.E. (Eds.), *Catalog of the Scorpions of the World (1758–1998)*. New York Entomological Society, pp. 409–420.
- Smith, J.A., 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leukoc. Biol.* 56, 672–686.
- Summers, C., Rankin, S.M., Condliffe, A.M., Singh, N., Peters, a. M., Chilvers, E.R., 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 31, 318–324. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2010.05.006>.
- Esquivel de Verde, M.A., 1968. Notas sobre scorpionidae de Venezuela, Nuevos registros y comentarios sobre la distribución de algunos grupos en Venezuela. *Acta Biol.* 6 (2), 66–70.
- Zavaleta, A., Navarro, J., Castro De La Mata, R., 1981. Pharmacological effects of a Peruvian scorpion (*Hadruroides lunatus*) venom. *Toxicon* 19 (6), 906–909.
- Zuniga, E.J., Vargas, K.C., Vásquez, D.D., Vásquez, Y.M., Vilca, E.G., Vigo, J.P., Villanueva, G.L., Zavala, S.O., Zavaleta, D.G., Silva, C.C., 2014. Effect of *Hadruroides charcasus* venom on cardiac tissue of *Bufo spinulosus*. *Rev. Pharm.* 2 (1).

RESEARCH

Open Access



# Cardiorespiratory alterations in rodents experimentally envenomed with *Hadruidoidea lunatus* scorpion venom

Fernanda Costal-Oliveira<sup>1</sup>, Clara Guerra-Duarte<sup>1</sup>, Maira Souza Oliveira<sup>2</sup>, Karen Larissa Pereira de Castro<sup>1</sup>, Leticia Lopes-de-Sousa<sup>1</sup>, Aline Lara<sup>3</sup>, Enéas Ricardo de Moraes Gomes<sup>3</sup>, Cesar Bonilla<sup>4</sup>, Sílvia Guatimosim<sup>3</sup>, Marília Martins Melo<sup>2</sup> and Carlos Chávez-Olórtegui<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** *Hadruidoidea lunatus* is the most abundant scorpion species in the Peruvian central coast, where most of the accidents involving humans are registered. In spite of its prevalence, there are only very few studies on *H. lunatus* envenomation. The aim of the present study was to analyze the cardiorespiratory alterations caused by *H. lunatus* envenomation in rodents.

**Methods:** Wistar rats injected with *H. lunatus* scorpion venom were submitted to electrocardiography. After euthanasia, rat lungs were collected and histopathologically analyzed. Mouse cardiomyocytes were used to perform immunofluorescence and calcium transient assays. Data were analyzed by ANOVA or Student's *t*-test. The significance level was set at  $p < 0.05$ .

**Results:** It was observed that *H. lunatus* venom increased heart rate and caused arrhythmia, thereby impairing the heart functioning. Lungs of envenomed animals showed significant alterations, such as diffuse hemorrhage. In addition, immunofluorescence showed that *H. lunatus* venom was capable of binding to cardiomyocytes. Furthermore, mouse ventricular cardiomyocytes incubated with *H. lunatus* venom showed a significant decrease in calcium transient, confirming that *H. lunatus* venom exerts a toxic effect on heart.

**Conclusion:** Our results showed that *H. lunatus* venom is capable of inducing cardiorespiratory alterations, a typical systemic effect of scorpionism, stressing the importance of medical monitoring in envenomation cases.

**Keywords:** *Hadruidoidea lunatus* venom, Cardiorespiratory alterations, Electrocardiography, Immunofluorescence, Calcium transient

## Background

The genus *Hadruidoidea* comprises 22 species of scorpions, distributed throughout Ecuador, Peru, northern Chile and islands around Galapagos, occupying habitats predominantly of arid climate [1]. Scorpions from the species *Hadruidoidea lunatus* are abundant in Peruvian central coast, particularly around the city of Lima, in rocky areas with "lomas" formations. This species comprises small to medium-sized scorpions that have

brownish coloration, with dorsal lighter spots (Fig. 1). *H. lunatus* differs from other *Hadruidoidea* scorpions by the curved morphology of the pedipalp fixed finger, creating a gap when fingers are closed, and by the rectangular shape of the spots on the tergites [2].

*H. lunatus* is the most medically relevant species in Peru [3]. During 2009, the Health Ministry of Peru [4] reported 41 cases of human accidents caused by this scorpion in Lima. Although these stings are not considered lethal, intense pain, edema, ulceration and necrosis are among the reported symptoms and signs. *H. lunatus* venom has not been extensively studied and there are not sufficient case reports describing human envenomation by this species. However, considering our previous

\* Correspondence: olortegi@icb.ufmg.br

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte CP: 486 CEP: 31270-901, MG, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



works [5, 6], we hypothesize that this scorpion has potential to cause significant damage to their victims.

In a first attempt to characterize the effects of this venom, our group reported initial data of *H. lunatus* experimental envenomation in rodents [5, 6]. Although *H. lunatus* scorpion venom (*Hlsv*) was classified as moderately toxic when compared with *Tityus* spp. venoms, symptoms such as excitability, agitation, salivation, eye secretions, convulsions, leg paralysis, as well as serological, biochemical and enzymatic alterations were detected in envenomed animals. These symptoms closely resemble those produced by the venom of scorpions pertaining to the Buthidae family, which contains the most medically relevant species that possess, in some cases, neurotoxins in their venoms [7, 8]. These molecules are peptides that act on ion channels and result in great release of neurotransmitters, seriously affecting hemodynamic and cardiorespiratory systems [9, 10].

These previous works suggested *Hlsv* may have cardiotoxic effects, since its activity was associated with high serum levels of creatine kinase (CK) and its isoenzyme MB (CK-MB) [5]. The aim of this study was to confirm this possible cardiotoxic activity of *Hlsv*.

## Methods

### Animals and venom

Twelve male Wistar rats (weighing 100–150 g) and four male C57BL/6 (18–22 g) mice were maintained at the animal facility of the Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil, and received water and food under controlled environmental conditions. The experimental protocols were approved by the Ethics Committee on the Use of Laboratory Animals of UFMG (CETEA-UFMG protocol 092/11).

*H. lunatus* scorpions were collected in the region of Atocongo (Lima, Peru) and maintained in the National Institute of Health (INS), in Lima, Peru. Scorpions were kept in plastic boxes with water *ad libitum* and fed weekly with cockroaches. Venom was obtained by telson electrical stimulation (12 V) [11]. The venom was diluted in Milli-Q water and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Protein concentration was measured by the Lowry method [12].

### SDS-PAGE

Different amounts (5, 10 and 20  $\mu\text{g}$ ) of *Hlsv* were diluted in sample buffer under reducing conditions and separated in 15 % SDS-PAGE gel, according to Laemmli [13]. The gel ran at 200 V and was stained with silver.

### Electrocardiography (ECG)

Rats were anaesthetized using 2.5 % isoflurane with a Metalvet Plus anesthetic inhaler (Metalvet, Brazil) and placed in supine position. Pre-anesthetic medication (morphine 2.5 mg/kg and diazepam 2.5 mg/kg) was administered via intramuscular injections [14]. Electrodes were attached to forelimbs and hindlimbs. Control group ( $n = 6$ ) received 0.4 mL of Milli-Q water via subcutaneous (SC) injection, whilst *Hlsv* treated group ( $n = 6$ ) received Milli-Q water containing 750  $\mu\text{g}$  of *Hlsv*. This dose was chosen as the amount of venom corresponding to one third of the  $\text{LD}_{50}$  established for this venom [5]. Computer ECG (ECG-PC TEB, Brazil) tracings were taken prior to the experiment (T0) and variables were analyzed each 5 min throughout the examination, comprising seven time points (T0, T5, T10, T15, T20, T25, T30). Heart rate (HR), heart rhythm, wave measurement and intervals were evaluated. As the ECG software gives the RR interval in millisecond (ms), the heart rate (beats per minute) was calculated by dividing 60,000/RR interval (ms), as 1 min corresponds to 60,000 milliseconds. ECG was recorded at speed of 50 mm/s, sensitivity of 2 N and lead II was considered for analysis.

### Histopathological examination

Rats were euthanized by hypovolemia under anesthesia and submitted to necropsy. Lungs were removed, fixed

in 10 % buffered formalin and embedded in paraffin [15]. Histological sections (4 mm) were stained with hematoxylin and eosin, and analyzed in optical microscope.

#### Immunofluorescence and calcium transient measurements

Cardiac ventricular myocytes were isolated from C57BL/6 mice by standard enzymatic solution, as previously described [16]. Briefly, animals were euthanized; hearts quickly removed and perfused using a customized Langendorff apparatus with a solution containing type II collagenase (Worthington, USA). After isolation, cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM – Sigma, USA) containing 10 % of fetal bovine serum until use.

For immunofluorescence assay, 500  $\mu$ L of a solution containing freshly isolated cardiomyocytes (in DMEM containing 10 % fetal bovine serum) was incubated with 0.05 or 2  $\mu$ g/mL of *Hlsv* at room temperature under agitation for 30 min, followed by incubation with 200  $\mu$ g/mL of rabbit IgG anti-*Hlsv* for 30 min. Cells were centrifuged, the supernatant removed, and cell pellet was resuspended in medium containing anti-rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor 488 (Invitrogen, USA) for 30 min. After centrifugation, the supernatant was removed and 500  $\mu$ L of fresh medium was added. Images were acquired with a Zeiss LSM 510META confocal microscope (Zeiss Jena, Germany) and analyzed with ImageJ software (NIH, USA). Control cells were incubated only with anti-rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor 488 or with anti-*Hlsv* IgG plus IgG conjugated to Alexa Fluor 488.

To measure the intracellular calcium ( $Ca^{2+}$ ) transient, cardiomyocytes were incubated with a calcium sensitive fluorescent probe (fluo 4 AM – 5  $\mu$ mol/L) for 30 min, and then with 0.05  $\mu$ g/mL of *Hlsv* for 5–20 min. Calcium transient amplitude was examined in field-stimulated cells at 1 Hz, with a square pulse of 5 ms and 30 V. After application of eight electric pulses, a line-scan imaging was performed in the longitudinal axis of the cells with an acquisition frequency of 1.54 ms, using Zeiss 510 Meta confocal microscope. Thirty-four cells were analyzed in the control group and 32 in *Hlsv* group.

#### Statistical analysis

All variables were submitted to normality and homoscedasticity analyses and then analysis of variance (ANOVA). Parametric variables were studied by Student-Newman-Keuls (SNK) posttest and non-parametric variables were evaluated by either Kruskal-Wallis or Friedman posttests. Regression analysis was accessed for HR throughout all time points. Significance was considered for 5 % ( $p < 0.05$ ). Analyses were done in R (2.11 version) software program.

Student's *t*-test was used to access significance of variability among groups in calcium transient analysis.

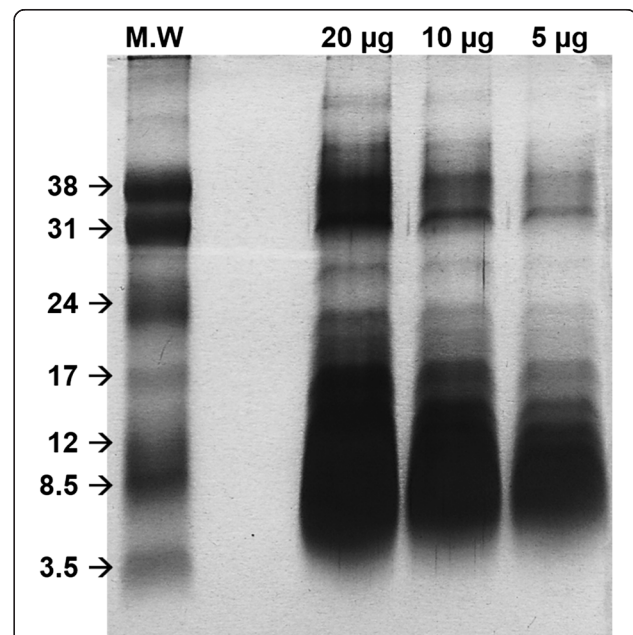
## Results

### SDS-PAGE

To evaluate venom content, electrophoresis of different amounts of *Hlsv* (5, 10 and 20  $\mu$ g) under reducing conditions was performed. The venom profile showed, in addition to a high content of low molecular weight compounds compatible with neurotoxins, a considerable amount of proteins in the range between 12 and 14 kDa. Another group of proteins were also visualized above 30 kDa (Fig. 2).

### Electrocardiographic analysis

At T0, all animals from both groups showed similar ECG tracings with no visible alterations. As usual, RR interval distance was considered to calculate the HR (Table 1). The mean HR on *Hlsv* group significantly increased from T0 to T5. The RR interval from an animal from *Hlsv* group went from 133 ms (HR of 451 bpm) at T0 to 97 ms (HR of 619 bpm) at T5. It means that after 5 min of envenomation, animals presented early signs of poisoning, demonstrated by the significant increase of HR (mean of 424 to 463 bpm), being detected a HR of 619 bpm in one of the animals. At this time (T5), no difference was observed on the control group. At T10, the HR of *Hlsv* group decreased to a value similar to T0, remaining normal up to T30. Within *Hlsv* group, HR values fitted cubic regression ( $R^2 = 74.36$  %;  $p = 0.0486$ )



**Fig. 2** SDS-PAGE 15 % of *Hlsv*. In lane 1, the low molecular weight marker. In the other lanes, 20, 10 and 5  $\mu$ g of *Hlsv* under reducing conditions. The gel was silver-stained



**Table 1** Heart rate and T wave amplitude alterations

Time (T) min	Heart rate (bpm)		T wave amplitude (mV)	
	Control	<i>Hlsv</i>	Control	<i>Hlsv</i>
T0	398.1 ± 25.1	420.04 ± 36.9	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.03
T5	<b>406.6 ± 22.1</b>	<b>463.37 ± 40.9<sup>ab</sup></b>	0.08 ± 0.04	0.09 ± 0.04
T10	420.1 ± 20.0	419.02 ± 29.3	<b>0.08 ± 0.04</b>	<b>0.14 ± 0.03<sup>cd</sup></b>
T15	426.6 ± 22.1	416.23 ± 24.0	<b>0.08 ± 0.03</b>	<b>0.15 ± 0.02<sup>cd</sup></b>
T20	443.3 ± 13.7	402.30 ± 17.4	<b>0.07 ± 0.03</b>	<b>0.17 ± 0.03<sup>cd</sup></b>
T25	450.0 ± 15.2	397.56 ± 20.8	<b>0.06 ± 0.03</b>	<b>0.19 ± 0.02<sup>cde</sup></b>
T30	446.6 ± 18.8	410.43 ± 37.5	<b>0.06 ± 0.02</b>	<b>0.19 ± 0.03<sup>cde</sup></b>

*Hlsv* group presented significant increase of heart rate at T5 (highlighted in bold). <sup>a</sup>vs. control group T5; T5 <sup>b</sup>vs. *Hlsv* in all other time points. *Hlsv* group presented increased T waves at all times after T10 (highlighted in bold). <sup>c</sup>vs. control group at the same time point; <sup>d</sup>T10 vs. venom group at T0 and T5; <sup>e</sup>T25 and T30 vs. venom group at T10 and T15

and T5 indicated the highest HR value ( $p = 0.0380$ ), being others similar to T0 (Table 1). Within control group, HR values fitted simple linear regression ( $R^2 = 93.04\%$ ;  $p = 0.0004$ ) and no differences were detected in all times.

Arrhythmias were detected only on *Hlsv* group at T15. Alterations such as atrial premature complex (APC) (Fig. 3a) and ventricular premature complex (VPC) (Fig. 3b) were detected in two different animals.

An individual from *Hlsv* group showed rS wave at T5 (Fig. 3c). None of these alterations were observed in control group. Other sign of envenomation observed on *Hlsv* group was increased T wave amplitude. As shown in Fig. 3d, T wave increased from 0.05 mV (T0) to 0.12 mV (T20) and reached 0.16 mV (T30) ( $p < 0.05$ ). There was no change on amplitude of T wave for control group. On the other hand, from 10 to 30 min after venom administration, T wave amplitude on *Hlsv* group was higher than control reaching the highest values at T25 and T30 (Table 1).

Alterations in QT interval (Fig. 3e) and in PR interval (Fig. 3f) in *Hlsv* group were observed. QT interval increased from 67 ms (T0) to 97 ms (T20) and 107 ms (T30) ( $p < 0.05$ ). PR interval also increased by showing 43 ms at T0, 50 ms at T10 and 63 ms at T30 ( $p < 0.05$ ).

#### Histopathological examination

Lungs of animals from control and *Hlsv* groups were removed and analyzed microscopically. Only lungs of *Hlsv* treated rats showed significant alterations. Those of control animals were morphologically normal (Fig. 4a), whilst lungs of envenomed rats showed diffuse hemorrhage (Fig. 4b).

#### Immunofluorescence and calcium transient

To investigate whether *Hlsv* could bind to mouse ventricular cardiomyocytes, suggesting a direct cardiotoxic effect (Fig. 5), freshly isolated ventricular myocytes were treated with *Hlsv* and then incubated with anti-*Hlsv* IgG for evaluation. Fluorescent labeling was detected only in

*Hlsv* treated cells (Fig. 5a). Results were analyzed using ImageJ software to quantify the fluorescence intensity (Fig. 5b). A concentration-dependent binding was observed.

At last, it was investigated whether *Hlsv* could cause alterations in the calcium transient in isolated cardiomyocytes. Calcium transient amplitude, given by the ratio between maximal fluorescence (F) and baseline fluorescence (F0), was significantly reduced in cardiac cells incubated with *Hlsv* compared to control cells (Fig. 6). Thirty-four cardiomyocytes were analyzed in control group and 32 in the *Hlsv* group (Fig. 6b).

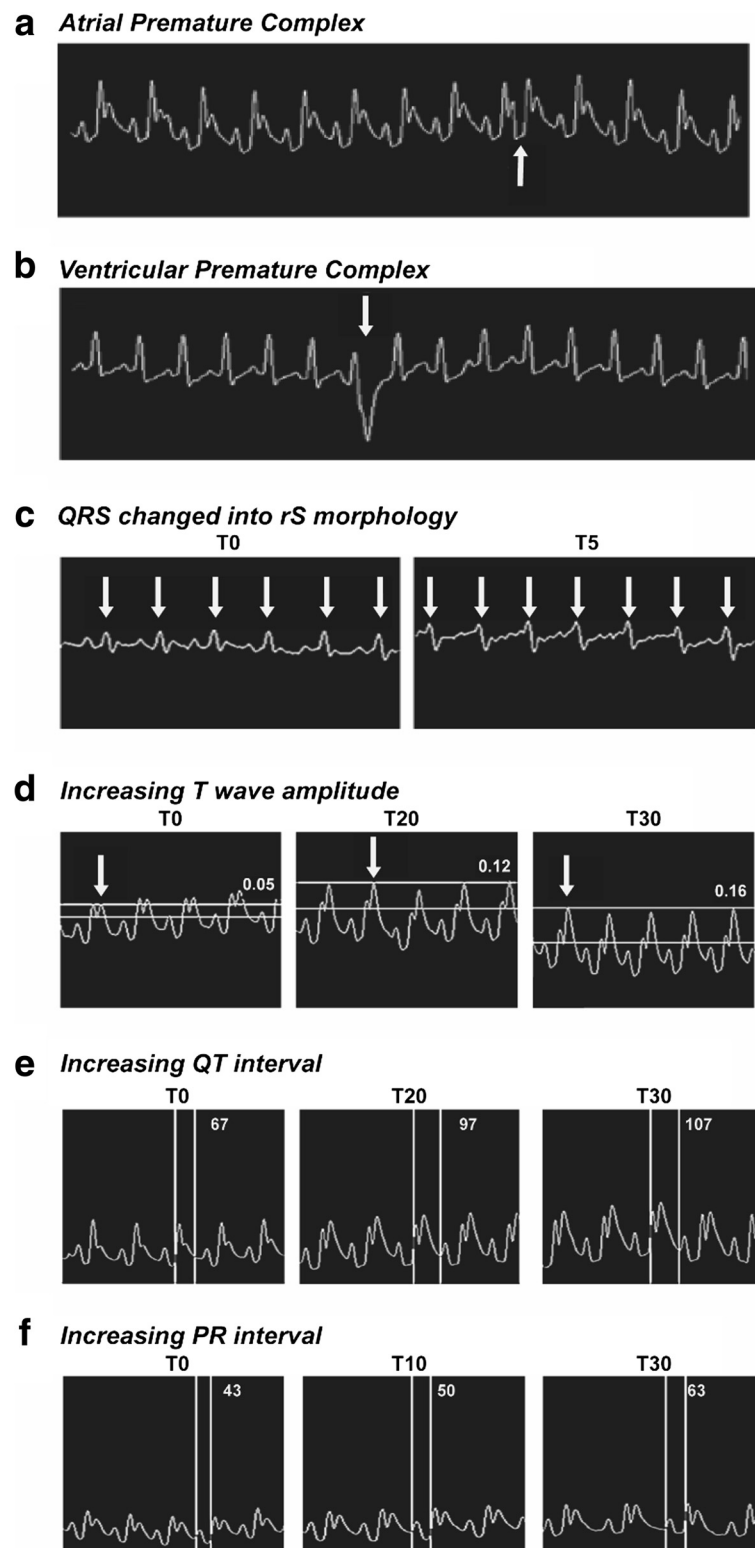
#### Discussion

It is known that scorpion envenomations associated with cardiorespiratory alterations may culminate in heart failure, pulmonary edema and even death [10, 17]. The present study is the first to evaluate the consequences of *H. lunatus* venom with special attention to the cardiorespiratory system. Other than some transcriptomic analysis, little is known about *H. lunatus* and other non-Buthidae scorpion venoms and the potential harm caused by accidents with these less medically relevant scorpion species [18–21].

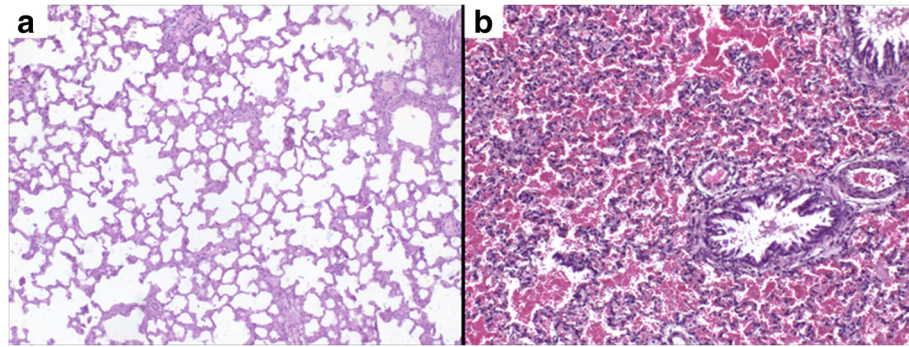
Since scorpion envenomation leads to adrenalin release, the increase in the heart rate detected by ECG might be a consequence of its positive chronotropic effect [22]. Venom interference on heart electric activity regulation results in ionic imbalance between intra and extracellular spaces. Consequently, the duration of cell depolarization phase is longer and leads to a hyperexcited status [23]. This explains the premature complexes of atrial or ventricular origin detected on envenomed rats.

Electrolytic imbalance has already been reported as a systemic effect of scorpion envenomation [10]. Such alteration may be diagnosed by ECG as the presence of increased T waves, which has been detected in victims of scorpionism [24]. T wave amplitude must be lower than a quarter of the R amplitude and higher values are a sensitivity parameter for electrolytic imbalance [23]. Therefore, increased T waves found in *Hlsv* group may be a consequence of electrolytic imbalance.

Moreover, rS wave detected on *Hlsv* group suggests overload of the right ventricle, due to pulmonary hemorrhage, which was confirmed by diffuse hemorrhage detected in lung histology. Occurrence of pulmonary alterations due scorpion envenomation is a common finding in the literature and pulmonary edema, hemorrhage and inflammation have already been described, but predominantly in victims of stings by Buthidae family scorpions [10, 22, 25, 26]. Describing such alterations as a result of envenomation by a species considered not very toxic is remarkable and draws attention to the fact that accidents with this scorpion should receive medical attention, since



**Fig. 3** Electrocardiogram alterations in animals treated with *Hlsv*. ECG from two animals of the treated group showing (a) atrial premature complex and (b) ventricular premature complex 15 min after the envenomation. (c) At T0, all QRS complexes were normal. At T5, all complexes changed the morphology to rS wave. Velocity 50 mm/s, sensibility 2 N, lead II. (d) At T0, T wave was 0.05 mV. At T20, T wave more than doubled its amplitude, reaching 0.12 mV. At T30 T wave was 0.16 mV. (e) Increase on QT interval from 67 ms at T0, to 97 ms at T20 and 107 ms at T30. (f) Increase on PR interval from 43 ms at T0, to 50 ms at T10 and, then, to 63 ms at T30. Velocity 50 mm/s, sensibility 2 N, lead II

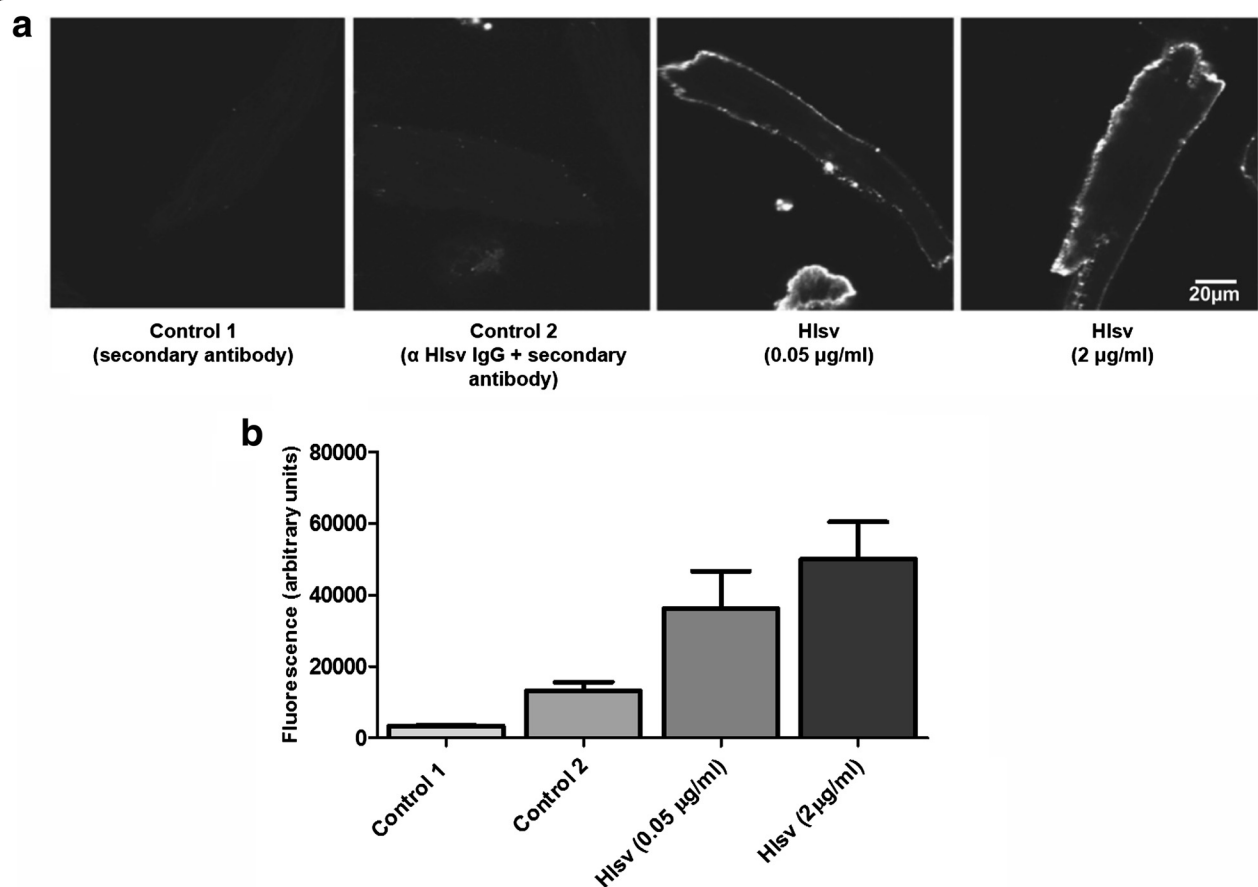


**Fig. 4** Histopathology of the lungs. **(a)** Lungs of control rats showing no alterations and **(b)** lungs with diffuse hemorrhage of animals injected with 750 µg of *H. lunatus* venom. Magnification: 40x

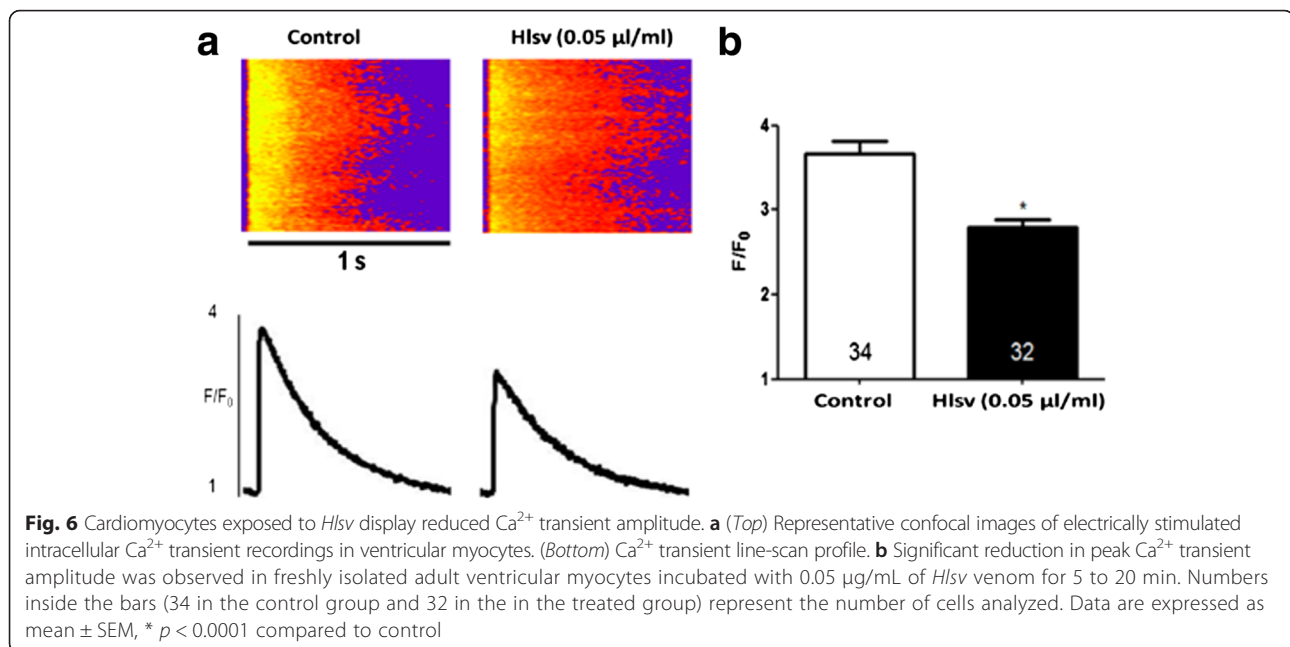
lung complications are considered the main cause of death in victims of scorpion stings [25–27].

Some of these ECG findings were also detected in a similar animal model using *Tityus fasciolatus* venom, a member of the Buthidae family, one of the most toxic scorpions species [10]. Indeed, several ECG alterations

are also reported in patients severely envenomed by buthid scorpions *Tityus* [27]. *H. lunatus* does not belong to this family and yet present similar alterations, which, once more, emphasizes the importance of studying the so-called less toxic venoms and providing careful medical support to *Hlsv* envenomed victims [28].



**Fig. 5** Immunolocalization of *Hlsv* in isolated mouse cardiomyocytes. **a** Localization of *Hlsv* detected with anti-*Hlsv* IgGs in ventricular myocytes. Cells were treated with *Hlsv*, incubated with anti-*Hlsv* IgGs antibodies, followed by anti-rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor 488 (Invitrogen, USA). As control, cardiomyocytes were treated only with secondary antibodies (control 1) or with IgG anti-*Hlsv* + secondary antibodies (control 2). Seven cells were analyzed in each group. **b** Bar graph shows the concentration-dependency of venom binding to cardiac cells



Since cardiac alterations were detected by ECG and corroborated by prior enzymatic tests, we decided to evaluate the direct venom effect in cardiomyocytes [5]. Although the so-called “adrenergic storm”, caused by venom neurotoxin-induced discharge of catecholamines, is widely accepted as the main reason for the cardiorespiratory impairment in scorpion envenomation, it is suggested that the release of cytokines and a direct effect of venom components on the heart can also account for this clinical condition [8, 29–31]. We have previously attested the presence of neurotoxins in *Hlsv* and the augment in inflammatory cytokines following *Hlsv* administration in mice [5, 6]. In the present work, it was shown that *Hlsv* is able to directly bind to mouse cardiomyocytes. Therefore, all the possible molecular mechanisms for the onset of cardiorespiratory syndrome following scorpion envenoming seems to be present in *Hlsv*.

The decrease in calcium transient amplitude observed in cells exposed to *Hlsv* might explain some of the ECG alterations detected on treated group. It was already reported that imperatoxin I (IpTxI), a 15 kDa phospholipase from *Pandinus imperator* scorpion, induces a fast and reversible blockade of ryanodine receptors (RyR) of skeletal and heart muscles. When injected into ventricular cells, IpTxI leads to decreased amplitude of contraction and intracellular calcium transient, which indicates a blockade of calcium release from the sarcoplasmic reticulum [32]. The lipolytic fraction M1 from *Buthus occitanus tunetanus* scorpion venom was also capable of decreasing calcium transient in isolated cardiomyocytes [33]. Although the specific toxin responsible for this

action was not identified, its lipolytic activity may suggest the presence of phospholipases in this fraction.

We have previously showed that *Hlsv* contains remarkable phospholipase activity [5]. The presence of a high content of proteins between 12 and 17 kDa, compatible with PLA<sub>2</sub> molecular weight, was also attested by SDS-PAGE in the present work. Therefore, it is possible to suggest that an enzyme similar to IpTxI can be present in *Hlsv* and be involved in the effects observed in the present study. It has been indicated that scorpion venom PLA<sub>2</sub> can also be involved in the induction of lung edema [34]. A component pertaining to this class of enzymes in *Hlsv* can be the responsible for many of the alterations described in this study. The isolation of *Hlsv* PLA<sub>2</sub> would help to elucidate its role in envenomation.

## Conclusion

*H. lunatus* scorpion venom (*Hlsv*) induced cardiorespiratory alterations in experimentally envenomed rodents. The study of the pathogenesis of systemic effects provoked by this venom, and the involvement of individual venom components in the complex alterations detected, will be useful for identifying suitable therapeutic agents for treating the clinical symptoms caused by *Hlsv*.

## Abbreviations

DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ECG, electrocardiography; *Hlsv*, *Hadruroides lunatus* scorpion venom; HR, heart rate

## Acknowledgements

We would like to thank Dra. Cleida Aparecida de Oliveira and Dr. Geovani Cassali for the histological analysis.

### Funding

This work was supported by the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES – project “Toxinologia” no. 23038000825/2011-63), by Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – “Chamada Bilateral” no. 17/2013, process: 490269/2013-3) and by funds of the INCTTOX Program of CNPq.

### Authors' contributions

FCO and CGD contributed equally to this work. They designed and developed the experiments, analyzed the results and prepared the manuscript for publication. MSO conducted the electrocardiogram experiments, analyzed the results and helped revising the manuscript for publication, under the supervision of MMM. MSO and MMM helped with organ collection, slides preparation and statistical analysis. KLPC assisted with the preparation of samples and animals, being responsible for their maintenance during all the work. AL and ERMG worked on the isolation of the cardiomyocytes and performed confocal microscopy and calcium transient experiments, under the supervision of SG, who was responsible also for manuscript drafting. LLS helped conducting the immunofluorescence assays. CB collected, maintained the scorpions and worked in the extraction of venom by the electrical stimulation method. CCO is the corresponding author and designer of the research. All authors read and approved the final manuscript.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Ethics approval and consent to participate

All experimental procedures performed were in accordance to the guidelines of the Institutional Committee for Animal Care and Use of UFMG, Brazil, and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH, 8<sup>th</sup> edition, 2011). The present study was approved by the Ethics Committee on the Use of Laboratory Animals of UFMG (092/11) (CETEA-UFMG).

### Author details

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte CP: 486 CEP: 31270-901, MG, Brazil. <sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. <sup>3</sup>Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. <sup>4</sup>Instituto Nacional de Salud, Universidad Nacional Mayor de San Marcos y Universidad Científica del Sur, Lima, Peru.

Received: 22 February 2016 Accepted: 6 July 2016

Published online: 15 July 2016

### References

- Brito G, Borges A. A Checklist of the scorpions of Ecuador (Arachnida : Scorpiones), with notes on the distribution and medical significance of some species. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2015;21:23. doi:10.1186/s40409-015-0023-x.
- Ochoa JA, Prendini L. The genus *Hadruroides* Pocock, 1893 (Scorpiones: Luridae), in Peru: new records and descriptions of six new species. *Am Mus Novit*. 2010;3687(3687):1–56.
- Zavaleta A, Navarro J, Castro De La Mata R. Pharmacological effects of a Peruvian scorpion (*Hadruroides lunatus*) venom. *Toxicon*. 1981;19(6):906–9.
- Andina. Reportan 41 casos de personas picadas por alacranes en Lima. 2010. <http://www.andina.com.pe/agencia/noticia-reportan-41-casos-personas-picadas-alacranes-lima-276761.aspx>. Accessed 14 July 2016.
- Costal-Oliveira F, Duarte CG, Machado de Ávila RA, Melo MM, Bordon KCF, Arantes EC, et al. General biochemical and immunological characteristics of the venom from Peruvian scorpion *Hadruroides lunatus*. *Toxicon*. 2012;60(5):934–42.
- Costal-Oliveira F, Guerra-Duarte C, Castro KLP, Tintaya B, Bonilla C, Silva W, et al. Serological, biochemical and enzymatic alterations in rodents after experimental envenomation with *Hadruroides lunatus* scorpion venom. *Toxicon*. 2015;103:129–34.
- Possani LD, Alagon AC, Fletcher Jr PL, Erickson BW. Purification and properties of mammalian toxins from the venom of the Brazilian Scorpion *Tityus serrulatus* Lutz & Mello. *Arch Biochem Biophys*. 1977;180(2):394–403.
- Isbister GK, Bawaskar HS. Scorpion Envenomation. *N Engl J Med*. 2014; 371(5):457–63. doi:10.1056/NEJMra1401108.
- Couraud F, Jover E. Mechanism of action of scorpion toxins. In: Tu AT editor. *Handbook of Natural Toxins, Insects Poisons, Allergens and Other Invertebrate Venoms*. New York: Marcel Dekker Inc. 1984; p. 659–78.
- Pinto MCL, Borboleta LR, Melo MB, Labarrère CR, Melo MM. *Tityus fasciolatus* envenomation induced cardio-respiratory alterations in rats. *Toxicon*. 2010; 55(6):1132–7.
- Oukkache N, Chgoury F, Lalaoui M, Cano AA, Ghalim N. Comparison between two methods of scorpion venom milking in Morocco. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2013;19(1):5. doi:10.1186/1678-9199-19-5.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265–75.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5.
- Flecknell P. *Laboratory Animal Anaesthesia*. San Diego: Academic; 1996.
- Prophet EB, Mills B, Arrington JB, et al. *Afip Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington: American Registry of Pathology; 1992.
- Guatimosim S, Sobie EA, dos Santos CJ, Martin LA, Lederer WJ. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca<sup>2+</sup> current. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280(5):C1327–39.
- Cupo P, Hering SE. Cardiac troponin I release after severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*. *Toxicon*. 2002;40(6):823–30.
- He Y, Zhao R, Di Z, Li Z, Xu X, Hong W, et al. Molecular diversity of Chaerilidae venom peptides reveals the dynamic evolution of scorpion venom components from Buthidae to non-Buthidae. *J Proteomics*. 2013;89: 1–14. doi:10.1016/j.jprot.2013.06.007.
- Ma Y, Zhao R, He Y, Songryong L, Liu J, Wu Y, et al. Transcriptome analysis of the venom gland of the scorpion *Scorpiops jendeki* : implication for the evolution of the scorpion venom arsenal. *BMC Genomics*. 2009;15:1–15. doi: 10.1186/1471-2164-10-290.
- Quintero-Hernández V, Ramírez-Carreto S, Romero-Gutiérrez MT, Valdez-Velázquez LL, Beceril B, Possani LD. Transcriptome analysis of scorpion species belonging to the *Vaejovis* genus. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117188.
- Schwartz EF, Diego-García E, Rodríguez de la Vega RC, Possani LD. Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). *BMC Genomics*. 2007;8:119. doi:10.1186/1471-2164-8-119.
- Paneque-Peres AC, Nonaka PN, de Carvalho PT, Toyama MH, Silva CAM, Vieira RP, et al. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on lung mechanics and inflammation in mice. *Toxicon*. 2009;53(7–8):779–85.
- Tilley LP. *Essentials of canine and feline electrocardiography interpretation and treatment*. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1992.
- Kumar CM, Naveen Prasad SV. Echocardiographic evaluation and follow - up of cardiovascular complications in children with scorpion sting in coastal South India. *Indian J Crit Care Med*. 2015;19(1):42–6. doi:10.4103/0972-5229.148645.
- Bahloul M, Chaari A, Dammak H, Samet M, Chtara K, Chelly H, et al. Pulmonary edema following scorpion envenomation: mechanisms, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Int J Cardiol*. 2011;162(2):86–91.
- Saidi H, Adi-Bessalem S, Hammoudi-Triki D, Laraba-Djebbari F. Effects of atropine and propranolol on lung inflammation in experimental envenomation: comparison of two buthidae venoms. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2013;19(1):8. doi:10.1186/1678-9199-19-8.
- Cupo P. Clinical update on scorpion envenoming. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(6):642–9.
- Agrawal A, Kumar A, Consul S, Yadav A. Scorpion Bite, a sting to the heart! *Indian J Crit Care Med*. 2015;19(4):233–6. doi:10.4103/0972-5229.154570.
- Andrade MV, Lisboa FA, Portugal AL, Arantes RM, Cunha-Melo JR. Scorpion venom increases mRNA expression of lung cytokines. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007;146(4):581–7. doi:10.1016/j.cbpa.2006.01.031.
- Teixeira Jr AL, Fontoura BF, Freire-Maia L, Machado CRS, Camargos ERS, Teixeira MM. Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle. *Toxicon*. 2001;39(5):703–9.
- Cupo P, Figueiredo AB, Filho AP, Pintya AO, Tavares Jr GA, Caligaris F, et al. Acute left ventricular dysfunction of severe scorpion envenomation is related to myocardial perfusion disturbance. *Int J Cardiol*. 2007;116(1):98–106. doi:10.1016/j.ijcard.2006.02.015.
- Valdivia HH, Kirby MS, Lederer WJ, Coronado R. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(24):12185–9.
- Cheikh A, Benkhalifa R, Bescond J, El Ayebe M, Raymond G, Cognard C, et al. Depression of cardiac L-type calcium current by a scorpion venom fraction

M1 following muscarinic receptors interaction involving adenylate cyclase pathway. *Toxicon*. 2006;48(4):373–87. doi:10.1016/j.toxicon.2006.06.016.

34. Kanoo S, Deshpande SB. Involvement of phospholipase A2 pathway for the Indian red scorpion venom-induced augmentation of cardiopulmonary reflexes elicited by phenylidguanide. *Neurosci Lett*. 2008;440(3):242–5. doi:10.1016/j.neulet.2008.05.088.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)

