

MESTRADO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE CITOTÓXICA DA
PEÇONHA DE *Caudisona durissa collilineata* EM CÉLULAS
MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO**

MARILISSA MACIEL MAINERI

**GOIÂNIA – GOIÁS
2012**





**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE CITOTÓXICA DA
PEÇONHA DE *Caudisona durissa collilineata* EM CÉLULAS
MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO**

MARILISSA MACIEL MAINERI

ORIENTADORA

Profa. Dra. IRMTRAUT A. HOFFMANN PFRIMER

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde.

**GOIÂNIA – GOIÁS
2012**





DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE
DEFENDIDA EM 22 DE MARÇO DE 2012 E CONSIDERADA
APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA:

1) Imtraut Araci H. Pfrimer

Profa. Dra. Imtraut Araci H. Pfrimer / PUC Goiás (Presidente/Orientadora)

2) Vera Aparecida Saddi

Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi / PUC Goiás (Membro)

3) Marize Campos Valadares Bozini

Profa. Dra. Marize Campos Valadares Bozini / UFG (Membro Externo)

4)

Prof. Dr. José Rodrigues do Carmo Filho / PUC Goiás (Suplente)

“Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”.

Isaac Newton

*Dedico este trabalho ao meu esposo **Leandro Dobrachinski!***

Reservo-lhes uma página inteira, em branco, para que possamos juntos continuar escrevendo nossas histórias com infinitas possibilidades.

Leandro, você participou intensamente desta pesquisa, sempre incentivando minhas conquistas para que sempre crescêssemos e caminhássemos juntos. Não me deixou desanimar nem desistir, mesmo nos “meus momentos” mais difíceis. Obrigada pela tolerância, compreensão e paciência. Muito mais do que um marido, você é um companheiro e amigo muito fiel.

*Eu tenho tanto pra lhe falar, mas com palavras não sei dizer
Como é grande o meu amor por você.
E não há nada pra comparar
Para poder lhe explicar [...] Nem mesmo o céu nem as estrelas
Nem mesmo o mar e o infinito, não é maior que o meu amor,
Nem mais bonito [...].*

*A **Deus**, por Sua presença constante em todos os dias de minha vida. Conduzindo-me, orientando-me e muitas vezes me carregando. Por me proteger nesta trajetória em que as longas viagens se fizeram necessárias na busca dos meus objetivos. Agradeço-Lhe, ainda, por colocar no meu caminho muitos anjos para segurarem minha mão todas as vezes que estremeci.*

*Aos meus pais, **Bruno e Maria Eni**, de vocês recebi o dom mais precioso do universo: a vida. Já por isso seria infinitamente grata. Mas vocês não se contentaram em presentear-me apenas com ela. Revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação. Cultivaram na criança todos os valores que a transformaram num adulto responsável, consciente. Abriram a porta do meu futuro, iluminando meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar: o estudo. Trabalharam dobrado, sacrificaram seus sonhos em favor dos meus, não foram*

apenas pais, mas amigos e companheiros, mesmo nas horas em que meus ideais pareciam distantes e inatingíveis e o estudo um fardo pesado demais. Tantas foram as vezes que o meu cansaço e preocupações foram sentidos e compartilhados por vocês, numa união que me incentivava a prosseguir. Por isso continuo até hoje buscando atingir meus objetivos.

Se um dia, já feito homem realizado, sentires que a terra cede a teus pés, que tuas obras desmoronam, que não há ninguém a tua volta para te estender a mão, esquece a tua maturidade, passa pela tua mocidade, volta a tua infância e balbucia entre lágrimas e esperanças, as últimas palavras que sempre te restarão na alma:

minha mãe, meu pai!

(Rui Barbosa)

*A toda **minha família**, irmãos, cunhados e sobrinhos, **sogro e sogra**... Amo cada um de vocês que, mesmo distantes, conseguimos manter esta união.*

O amor que nos une a cada dia, nos dando força para viver, nos dando força a cada caminhada, pois onde quer que vamos, sabemos que jamais estamos sozinhos. Os caminhos são diferentes, mas quando precisamos ali estamos nós em qualquer situação, acolhendo uns aos outros semeando o amor de Deus, e o amor de nossos pais.

“A grandeza de uma pessoa não se mede pelo espaço que ela ocupa em nosso coração, mas sim pelo vazio que deixa quando está distante.”

Agradecimentos Especiais

À Profa. Dra. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer

Pessoa sábia! Símbolo para muitos! Venerada por sua sabedoria! Com sua mão estendida para abraçar ou para punir, porém sempre para ensinar!

Muitos mestres passam por nossa vida, mediando o conhecimento, abrindo portas, mostrando o caminho. Os anos passam, o conhecimento é acumulado, algum conhecimento esquecido, outros ultrapassados, mas os valores são eternos e a lembrança de alguns permanece.

Professora Araci, sou eternamente grata por Deus ter conduzido minha vida da maneira que foi, pois assim tive a oportunidade de conhecê-la. Considero-me privilegiada por fazer parte de seu grupo de alunos, pois somos frutos de algum mestre, seja ele professor, pai ou mãe, pois todos são mediadores. Todo pai é um pouco professor e todo professor é um pouco pai.

Obrigada por não ter sido simplesmente nossa orientadora, nos transmitido seus conhecimentos e experiências; mas acima de tudo ter sido nossa amiga, nos compreendendo e nos incentivando a seguir nosso caminho! Expresso o meu maior agradecimento e o meu profundo respeito, que sempre serão pouco diante do muito que foi oferecido.

"Melhor professor nem sempre é o de mais saber e, sim, aquele que, modesto, tem a faculdade de manter o respeito e a disciplina da classe".

(Cora Coralina)

Aos amigos **Fernanda, Aislan e José Vitélio**,

Quando agradecemos alguém por alguma ajuda ou auxílio que recebemos, estamos trabalhando o desenvolvimento de nossas virtudes. Estamos trabalhando também um sentimento difícil de ser tirado do nosso coração, o egoísmo e desta forma podemos ver que não conseguimos tudo sozinho, precisamos uns dos outros para evoluir e desenvolvermos nossas capacidades.

Fernanda,

O reconhecimento é uma virtude sábia, porque nos coloca de frente com nossas conquistas e podemos perceber que só conquistamos porque tivemos alguém para nos auxiliar e nos mostrar o caminho.

“Amigos não são necessariamente aqueles que participam da nossa vida, mas sim os que estão ao nosso lado em momentos especiais”

*À **Profa. Martha Magalhães** do Centro de Pesquisa e Estudos Biológicos (CEPB) por ter cedido os venenos ofídicos, sem os quais a pesquisa seria impossível.*

*Ao **Jader e Luciano** pelo apoio recebido na secretaria e ao **Carlos** pelo apoio logístico no laboratório de pesquisa com venenos ofídios da PUC - Goiás do Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde.*

*Aos colegas do Núcleo de Estudo e Pesquisa Imunológica (NEPY) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO) pela amizade e pelo apoio constante nas distintas fases da pesquisa: **Camila, Jéssica, Alan e Eliabe**. Muito Obrigada!*

*À **Faculdade São Francisco de Barreiras (FASB)** pelo apoio financeiro e por ter contribuído com o meu crescimento profissional, pois foi através deste que conquistei esta vitória.*

*Ao apoio financeiro da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e do **Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq)**.*

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei. Elas foram adversárias dignas e tornaram minhas vitórias muito mais saborosas.

MAINERI, M. M. **Avaliação da potencial atividade citotóxica da peçonha de *Caudisona durissa collilineata* em células mononucleares do sangue periférico humano.** 2012. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC. Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde. Goiânia, 2012.

RESUMO

Serpentes peçonhentas produzem uma variedade de toxinas altamente citotóxicas. Possuem um verdadeiro coquetel de substâncias farmacológicas, tornando-se uma verdadeira “farmácia viva”, que atualmente vem sendo utilizados por inúmeros pesquisadores, para o desenvolvimento de novos fármacos com potente ação contra microorganismos. O presente estudo visou avaliar a potencial atividade citotóxica da peçonha de *Caudisona durissa collilineata* em células mononucleares (CMN) do sangue periférico humano, *in vitro*. Após a padronização da obtenção de CMN para cultivo celular, foi realizada a avaliação do efeito citotóxico de diferentes concentrações do veneno bruto. As CMN do sangue periférico foram separadas por meio gradiente de densidade e incubadas (2×10^5 células/poço) com diferentes concentrações do veneno (50, 5, 0,5, 0,05, 0,005 e 0,0005 $\mu\text{g/mL}$), em diferentes tempos (1, 3, 6, 24, 48 e 72h) e substratos (PHA, IL – 2). A avaliação da atividade citotóxica do veneno foi realizada, por meio da leitura das células em câmara de Neubauer, após 24, 48 e 72 horas. Em conclusão, foi possível identificar que a citotoxicidade do veneno bruto de *C. d. collilineata* varia de forma proporcional à concentração, ou seja, quanto maior a concentração do veneno, maior a sua citotoxicidade. Com isso, a concentração de 0,0005 $\mu\text{g/mL}$ do veneno bruto de *Caudisona durissa collilineata*, neste experimento, apresentou uma baixa atividade citotóxica em CMN de sangue periférico humano e que a fragmentação do DNA celular não foi visualizada neste estudo. Desta forma, sugere-se empregar dois ou mais ensaios distintos para confirmar se a indução da morte celular está ocorrendo por meio de apoptose.

Palavras-chave: Venenos ofídicos, *Caudisona durissa collilineata*, citotoxicidade, células mononucleares do sangue periférico.

MAINERI, M. M. **Evaluation of the potencial cytotoxic activity of *Caudisona durissa collilineata* venom in mononuclear cells of peripheral human blood.** 2012. 107 f. Master's Dissertation – Catholic University of Goiás – PUC. Master of Environmental Science and Health, Goiânia, 2012.

ABSTRACT

Venomous snakes have a real cocktail of pharmacological active substances and can be considered “living pharmacies”. They are currently used in research into new drugs that act powerfully against microorganisms. The objective of the present study was to evaluate *in vitro* the potential cytotoxic activity of *Caudisona durissa collilineata* venom in mononuclear cells (MNC) of peripheral human blood. After obtaining MNC for cell culture, the cytotoxic effect of different concentrations of crude venom was evaluated. The peripheral blood MNC were separated using a density gradient and were incubated (2×10^5 cells/well) with different venom concentrations (50, 5, 0,5, 0,05, 0,005 e 0,0005 $\mu\text{g/mL}$) for different times (1, 3, 6, 24, 48 e 72h) and in different substrates (PHA, IL – 2). The venom's cytotoxic activity was analyzed by visually examining the plates after 24, 48 and 72 hours. Was also observed with different concentrations of crude venom induced ADN fragmentation in MNC. We observed that the toxicity of crude *C. d. collilineata* venom varies proportionally with concentration, i.e., the higher the concentration, the higher its cytotoxicity. For this reason the 0.0005 $\mu\text{g/mL}$ concentration of crude *Caudisona durissa collilineata* venom presented the lowest cytotoxic activity in peripheral human blood MNC and that the fragmentation of cellular ADN was not seen in this study. Thus, it is suggested to employ two or more different assays to confirm the induction of cell death is occurring through apoptosis.

Key words: Ophidian venoms, *Caudisona durissa collilineata*, Cytotoxicity, Peripheral blood mononuclear cells.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
SUMÁRIO	X
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS SERPENTES	22
1.1.1. Glândula do Veneno.....	25
1.2. VENENOS OFÍDICOS	26
1.2.1. Peçonha Crotálica	29
1.2.2. Citotoxicidade e Testes de Avaliação <i>in vitro</i>.....	33
1.2.3 Morte Celular	35
1.2.3.1 Necrose	37
1.2.3.2 Apoptose	37
1.2.4. Ação dos Venenos de Serpentes e o seu Uso na Terapêutica.....	39
1.2.4.1. Ação Bactericida	40
1.2.2.2. Ação Antiparasitária	41
1.2.2.3. Ação Antiviral	43
1.2.2.4. Ação Antitumoral	45
1.2.2.5. Outros.....	46
2. OBJETIVOS.....	49
2.1 GERAL	49
2.2 ESPECÍFICOS	49
3. METODOLOGIA	50
3.1 CASUÍSTICA.....	50
3.2 EXTRAÇÃO DO VENENO.....	52
3.3 OBTENÇÃO DE CMN DE SANGUE PERIFÉRICO HUMANO.....	53
3.3.1 Grau de Recuperação	54

3.3.2 Teste de Viabilidade Celular (VC)	54
3.3.3 Grau de Pureza	55
3.4 CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES	55
3.4.1 Ensaio de Citotoxicidade	56
3.4.2 Extração do DNA de CMN	56
3.4.3 Avaliação da potencial indução de apoptose do veneno em CMN, <i>in vitro</i>.	57
3.5 ANÁLISE DOS DADOS	58
4. RESULTADOS	59
4.1 PADRONIZAÇÃO DA CONTAGEM DE LEUCÓCITOS TOTAIS	59
4.2 AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO DE CMN.....	61
4.3 AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE CITOTÓXICA DO VENENO DA <i>CAUDISONA DURISSA COLLILINEATA</i> EM CMN DO SANGUE PERIFÉRICO.	63
4.4 AVALIAÇÃO DA POTENCIAL INDUÇÃO DE APOPTOSE DO VENENO EM CMN, <i>IN VITRO</i>	64
5 DISCUSSÃO	69
6 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICES	104

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - *Caudisona durissa collilineata*.....21
- Figura 2** - Fluxograma das atividades realizadas para obtenção de células mononucleares (CMN) do sangue periférico para cultivo celular.....51
- Figura 3** - Fluxograma do ensaio de citotoxicidade do veneno bruto de *Caudisona durissa collilineata* em CMN do sangue periférico humano para avaliação da concentração mínima não citotóxica.....52
- Figura 4** - Contagem de leucócitos realizada em duplicata em câmara de Neubauer de uma mesma amostra por um único observador – Associação intra-observador.....59
- Figura 5** - Contagem de leucócitos realizada em duplicata em câmara de Neubauer de uma mesma amostra por observadores diferentes – Associação inter-observador.....60
- Figura 6** – Avaliação da viabilidade celular por exclusão com azul de tripano após 0, 24, 48 e 72 horas de cultivo de CMN sem e com diferentes concentrações do veneno bruto de *Caudisona durissa collilineata*.....63
- Figura 7.** Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após tratamento *in vitro* com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. d. collilineata*. A. 1h após tratamento com 50µg/mL; B. 1h após tratamento com 5µg/mL; C. 1h após tratamento com 0,5µg/mL; D. 1h após tratamento com 0,05µg/mL; E. 1h após tratamento com 0,005µg/mL; F. 1h após tratamento com 0,0005µg/mL. C. controle.....65
- Figura 8** - Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após tratamento *in vitro* com 6 diferentes

concentrações de veneno bruto de *C. d. collilineata*. **1.** 3h após tratamento com 50µg/mL; **2.** 3h após tratamento com 5µg/mL; **3.** 3h após tratamento com 0,5µg/mL; **4.** 3h após tratamento com 0,05µg/mL; **5.** 3h após tratamento com 0,005µg/mL; **6.** 3h após tratamento com 0,0005µg/mL. **C.** controle.....66

Figura 9 - Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após tratamento *in vitro* com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. d. collilineata*. **1.** 6h após tratamento com 50µg/mL; **2.** 6h após tratamento com 5µg/mL; **3.** 6h após tratamento com 0,5µg/mL; **4.** 6h após tratamento com 0,05µg/mL; **5.** 6h após tratamento com 0,005µg/mL; **6.** 6h após tratamento com 0,0005µg/mL. **C.** controle.....66

Figura 10 - Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após tratamento *in vitro* com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. d. collilineata*. **1.** 24h após tratamento com 50µg/mL; **2.** 24h após tratamento com 5µg/mL; **3.** 24h após tratamento com 0,5µg/mL; **4.** 24h após tratamento com 0,05µg/mL; **5.** 24h após tratamento com 0,005µg/mL; **6.** 24h após tratamento com 0,0005µg/mL. **C.** controle.....67

Figura 11 - Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após tratamento *in vitro* com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. d. collilineata*. **1.** 48h após tratamento com 50µg/mL; **2.** 48h após tratamento com 5µg/mL; **3.** 48h após tratamento com 0,5µg/mL; **4.** 48h após tratamento com 0,05µg/mL; **5.** 48h após tratamento com 0,005µg/mL; **6.** 48h após tratamento com 0,0005µg/mL. **C.** controle.....67

Figura 12 - Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após tratamento com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. d. collilineata*. **1.** 72h após tratamento com 50µg/mL; **2.** 72h após tratamento com 5µg/mL; **3.** 72h após tratamento com 0,5µg/mL; **4.** 72h após

tratamento com 0,05 μ g/mL; **5.** 72h após tratamento com 0,005 μ g/mL; **6.** 72h após tratamento com 0,0005 μ g/mL. **C.** controle.....68

LISTA DE ABREVIATURAS

Anti-HBc	Anticorpos contra o antígeno “core” da Hepatite B
Anti-HCV	Anticorpos contra o vírus da hepatite C
Anti-HIV	Anticorpo contra o HIV
Anti-HTLV	Anticorpos contra o vírus linfotrópico humano
Bp-LAAO	Enzima L-aminoácido oxidase <i>de Bothrops pauloensis</i>
<i>C. d. cascavella</i>	<i>Caudisona durissa cascavella</i>
<i>C. d. collilineata</i>	<i>Caudisona durissa collilineata</i>
<i>C. d. terrificus</i>	<i>Caudisona durissa terrificus</i>
CA	Crotoxina ácida
CB	Crotoxina básica
CEPB	Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas
CMN	Células Mononucleares
CHO – K1	Células de ovário de rato
CXCR4	Co-receptores celulares para ligação do HIV
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GH3	Adenoma Benigno de Pituitária
HBs-Ag	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B (<i>Hepatitis B surface antigen</i>)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HL – 60	Leucemia Pró-mielocítica
IL- 6	Interleucina 6

JURKAT	Leucemia de células T
KDa	Kilodaltons
K562	Leucemia Mielóide Crônica Humana
LAAO	Enzima L-aminoácido oxidase
MTT	2,5 – difenil – 2H tetrazolium
PBS	Solução Salina Tamponada
PHA	Fitohemaglutinina
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PLA₂ – Cdt	Fosfolipase A ₂ de <i>Caudisona durissa terrificus</i>
PUC Goiás	Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Rtnf	Receptor de Fator de Necrose Tumoral
RT2	Célula de Glioma de Rato
RPMI	Meio de Cultura Celular que leva as iniciais do instituto onde foi desenvolvido <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Reptidase Time
SBH	Sociedade Brasileira de Herpetologia
SFB	Soro fetal bovino
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UNIFESP	Universidade Federal do Estado de São Paulo
VC	Viabilidade Celular
VDRL	Teste não treponêmico de diagnóstico da sífilis <i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
VERO	Células de rim de macaco

1. INTRODUÇÃO

Na década de 80, cientistas inquietos com a ação do homem sobre os organismos vivos, na intenção de agregar a terminologia diversidade biológica, introduziram o termo “biodiversidade” (LÉVÊQUE, 1999). Para Wilson (1988), todo produto de evolução orgânica, toda vida biológica no planeta em seus diferentes níveis, bem como sua capacidade de reprodução estão incluídos no conceito de biodiversidade. Segundo Ianni (2005), a biodiversidade expõe não somente a variedade da vida, mas também fundamenta a importância dessa variedade. Envolve os seres vivos, a genética existente e as suas relações.

Nesta perspectiva, o Brasil é alvo de cobiça e discussões sobre a forma de sua utilização econômica por se destacar como uma importante fonte de riqueza devido a sua vasta biodiversidade (GOTTLIEB *et al.*, 1998; SANTOS, 2010). Segundo Silva (2008), mais de 13% das espécies já descritas pela ciência encontram-se no Brasil, além de aproximadamente 40% das florestas tropicais, que desempenham um importante papel na regulação do clima do planeta. Por isso se justifica a necessidade de conhecer, conservar e promover o uso sustentável desse imenso patrimônio, em prol da humanidade.

Historicamente, o Brasil está relacionado ao comércio de produtos naturais (especiarias). A natureza sempre despertou no homem um fascínio por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. Por esta razão, a busca pela compreensão das leis naturais, como o clima e as doenças, levaram o homem ao atual estágio de desenvolvimento científico e avanço tecnológico observado nos dias de hoje (VIEGAS *et al.*, 2006).

Desta forma, neste momento de extrema importância relacionado com a evolução científica, os estudos que envolvem recursos naturais, sejam eles constituintes da fauna ou flora têm ganhado destaque tanto na busca e identificação de moléculas bioativas, bem como no entendimento de seus mecanismos de ação (VIEGAS *et al.*, 2006). Esta perspectiva corrobora com o estudo de Simões e Schenkel (2002) em que os autores afirmam a utilização dos recursos biotecnológicos como fonte do desenvolvimento humano, já que os recursos naturais sempre estiveram presentes para beneficiar a humanidade.

Porém, a utilização de tais recursos para o benefício social depende do compromisso sustentável (GOTTLIEB *et al.*, 1998), o que para Garcia (1995) torna-se o maior desafio, pois é necessário o desenvolvimento de estratégias que possibilitem a relação sustentável entre biodiversidade e o avanço biotecnológico.

A crescente demanda por produtos biologicamente ativos aumentou o interesse sobre a biodiversidade existente nas áreas pouco ou ainda não exploradas (SANTOS, 2010), como é o caso das regiões brasileiras sob influência da vegetação do cerrado (NOGUEIRA, 2001). Nesta perspectiva, Myers *et al.* (2000) e Nogueira (2001) afirmam que a vegetação do cerrado é considerada mundialmente uma das 25 regiões prioritárias para o estudo e conservação. A indústria farmacêutica recentemente retomou o entendimento de que a cura de milhares de enfermidades humanas pode estar nos produtos extraídos dos recursos naturais biológicos, o que está fazendo com que suas atenções voltem então para o território nacional (SANTOS, 2010).

Segundo a Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH) (2011), no território brasileiro são conhecidas 721 espécies de répteis. O país é o segundo colocado,

ficando atrás apenas da Austrália que registra o total de 864 espécies. Além da enorme riqueza de espécies de répteis que caracteriza nosso país, mais de um terço da nossa fauna de répteis é autóctone, ou seja, só ocorre em território brasileiro (MARTINS & MOLINA, 2008).

O Brasil ainda se destaca por apresentar um elevado número de serpentes (371) (SBH, 2011), dentre as quais se destacam os gêneros *Bothrops*, *Caudisona*, que antigamente era conhecida como *Crotalus* e *Lachesis* como sendo as principais serpentes de interesse médico (BARRAVIERA, 1995) ora pelo alto índice de acidentes descritos (SILVA *et al.*, 2009) ora pela importância que os estudos com as peçonhas destas serpentes tem despertado no meio científico (CHIPPAUX & GOIFFON, 1998).

Entre as famílias de serpentes de importância médica catalogadas no Brasil, os viperídeos são sem dúvida o mais importante grupo para a saúde pública, devido a sua alta frequência de acidentes, bem como pela sua gravidade (MELGAREJO, 2009). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, a maioria dos acidentes seguidos de óbitos são causados por serpentes do gênero *Bothrops* e *Caudisona* (BRASIL, 1991).

As serpentes do grupo *Bothrops* atualmente são responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos registrados, contudo são as do gênero *Caudisona* as responsáveis pela maior gravidade, devido ação da peçonha, com elevado índice de mortalidade, chegando a 11% mesmo quando o paciente é tratado (BARRAVIEIRA & FERREIRA, 2005).

Segundo Vital Brazil (1982) os estudos com venenos de animais e de suas toxinas apresentam grande relevância, pois através destes é possível entender o

seu mecanismo de ação possibilitando a compreensão da fisiopatologia dos envenenamentos e as medidas eficazes no tratamento. Da mesma forma tem sido importante para revelar substâncias com potencial promissor para o uso em terapêuticas, através do estudo de seus constituintes químicos e suas possíveis ações farmacológicas.

Além da importância ecológica, as serpentes peçonhentas possuem também importância socioeconômica, cujo veneno é uma fonte natural de muitas substâncias biologicamente ativas, incluindo aquelas com propriedades terapêuticas que dão origem a medicamentos utilizados amplamente no Brasil e ao redor do mundo, tendo como exemplos medicamentos analgésicos e anti-hipertensivos (MARTINS & MOLINA, 2008; CALKOSINSKI *et al.*, 2010).

As serpentes do gênero *Caudisona* estão representadas no Brasil por uma única espécie, *Caudisona durissa*. As subespécies conhecidas são *Caudisona durissa terrificus*, *Caudisona durissa cascavella*, *Caudisona durissa ruruima*, *Caudisona durissa marajoensis*, *Caudisona durissa trigonicus* e *Caudisona durissa collilineata*. A *Caudisona durissa collilineata* (Fig. 1), cujo veneno é objeto deste estudo, está relacionada a um grande número de acidentes no Sudeste e Centro-Oeste do país, mas poucos estudos sobre a composição do veneno foram realizados até o momento (FRANÇA, 2008; FRANÇA *et al.*, 2009). Sendo assim, avaliar o potencial citotóxico da peçonha de *Caudisona durissa collilineata* sobre células mononucleares de sangue periférico humano, *in vitro*, tornou-se o principal desafio deste estudo. O conhecimento desta atividade citotóxica servirá de subsídios para futuras pesquisas a fim de determinar a sua potencial ação contra microorganismos, podendo servir para a produção de fármacos contra diferentes

microorganismos, uma vez que estudos da ação antimicrobiana com peçonhas de serpentes típicas do cerrado são pouco exploradas.



Figura 1. *Caudisona durissa collilineata*.
Fonte: Sacramento, M.

1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS SERPENTES

Serpentes são animais vertebrados, membros da Classe *Reptilia*, pertencentes à Ordem *Squamata* e Subordem *Ophidia*. Estão organizadas em três superfamílias, a *Scolecophidia* (*Typhlopoidea*), a *Henophidia* (*Boidea*) e a *Caenophidia* (*Xenophidia*). Existem aproximadamente 2.930 espécies de serpentes no mundo, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias. No Brasil, tem-se cerca de 10% do total de espécies (GRAHAM *et al.*, 2007; MELGAREJO, 2009).

São características de identificação das serpentes possuírem o corpo extremamente alongado, cobertos por escamas epidérmicas, sem apêndices locomotores e cintura escapular (FRANCO, 2009). Entre tantas características presentes, a pele é uma delas, pois possui elasticidade e dilatação, o que facilita o ato respiratório e a deglutição, podendo ingerir presas até quatro a cinco vezes maiores do que seu ventre em estado de vacuidade (GUIMARÃES, 1979). A córnea das serpentes encontra-se protegida por um escama transparente, o que lhes proporciona um olhar fixo e frio. Não possuem ouvido externo ou membrana timpânica e são também bastante sensíveis às vibrações transmitidas pelo solo (HICKMAN *et al.*, 2004).

Uma interessante adaptação que permite uma maior facilidade na detecção, aproximação e captura do alimento é a chamada termorrecepção, ou seja, capta sua presa pelo calor através da emissão de radiação infravermelha (MELGAREJO, 2009). Outra característica dos ofídios é possuir uma língua alongada e bífida, que ao ser projetada para fora, recolhe partículas que são levadas a um órgão sensorial (órgão de Jacobson) situado na região anterior do céu da boca, cuja informação é

transmitida ao encéfalo, onde os odores são identificados (GUIMARÃES, 1979; HICKMAN *et al.*, 2004).

Do ponto de vista sensorial, algumas serpentes possuem um sistema termorreceptor bem desenvolvido. Faz parte deste sistema um órgão denominado fosseta loreal, que são pequenos orifícios situados entre os olhos e as narinas. Ele permite que os ofídios peçonhentos percebam a aproximação dos animais, especialmente de sangue quente. Desse modo, pode-se dizer que é praticamente a fosseta loreal que orienta as atitudes de defesa ou ataque das serpentes, quando estão em busca de alimentos ou diante de um predador (GUIMARÃES, 1979; AUTO, 2005; MELGAREJO, 2009).

Algumas serpentes apresentam estruturas como glândulas produtoras de toxinas e aparelhos apropriados para inoculá-las, sendo desta forma conhecidas como serpentes peçonhentas (MELGAREJO, 2009). As mais desenvolvidas e especializadas são as representadas pela superfamília *Caenophidia*, as quais incluem dentre outras, as famílias *Atractaspididae*, *Colubridae*, *Elapidae* e *Viperidae*, sendo estas últimas de maior importância epidemiológica em território nacional (GRAHAM *et al.*, 2007; SBH, 2011). A esse último grupo pertence a espécie objeto deste estudo e, portanto será detalhada abaixo.

A família *Viperidae* é formada por cerca de 250 espécies distribuídas pelo mundo com características físicas similares, ou seja, cabeça triangular recoberta por pequenas escamas e presença de uma dentição considerada a mais especializada do tipo solenóglifa (MELGAREJO, 2009). Esse tipo de dentição é constituído de um par de dentes ou presas anteriores, bem desenvolvidos, com canal central e maxilar móvel. É o tipo mais perfeito de aparelho venenífero que se conhece, uma vez que

um único dente funcional em cada maxila é extremamente grande, agudo e oco, funcionando como agulhas hipodérmicas que permitem a inoculação do veneno até mesmo em tecidos espessos (JUNQUEIRA, 2005; BARRAVIERA & FERREIRA, 2005; MELGAREJO, 2009). A família *Viperidae* divide-se em duas subfamílias: *Viperinae* e *Crotalinae* (FRANCO, 2009).

A subfamília *Viperinae* é representada por serpentes conhecidas como víboras verdadeiras estando presentes no continente africano, asiático e europeu, porém ausentes nos continentes americanos, totalizando 13 gêneros e 83 espécies (ZUG *et al.*, 2000; FRANCO, 2009). A subfamília *Crotalinae* é formada por 21 gêneros e 172 espécies, dos quais 4 gêneros representam esta subfamília na fauna brasileira: *Bothrocophias*, *Bothrops*, *Caudisona* e *Lachesis* (FRANCO, 2009). Os gêneros *Bothrops*, *Caudisona* e *Lachesis* são considerados os de maior interesse médico no Brasil (DA SILVA *et al.*, 2003). E entre estes, o gênero *Caudisona*, cuja peçonha é objeto central deste estudo, vem se destacando nas pesquisas uma vez que o seu veneno apresenta o maior índice de letalidade (FRANCISCHETTI *et al.*, 2000; CARDOSO *et al.*, 2009).

As serpentes do gênero *Caudisona* são mais conhecidas como cascavel, boicininga, maracambóia e outras denominações populares. Atingem aproximadamente de um metro e vinte a um metro e quarenta, são terrestres e pouco ágeis, mas quando excitadas, denunciam sua presença pelo ruído característico do guizo ou chocalho no extremo caudal. Possuem vértebras bem pronunciadas, apresentam um colorido de fundo castanho-claro, de tonalidades variáveis, pelo qual se destaca uma fileira de manchas dorsais losangulares

marrons, mais ou menos escuras, marginadas de branco ou amarelo (AUTO, 2005; MELGAREJO, 2009).

1.1.1. Glândula do Veneno

As glândulas do veneno são tecidos altamente especializados que possuem uma grande capacidade de produção, armazenamento e secreção desta substância (JUNQUEIRA & HO, 2002). São duas e estão localizadas abaixo dos olhos e acima do maxilar superior, provocando duas saliências laterais, dando a forma triangular a cabeça das serpentes venenosas, com exceção da coral verdadeira, que tem a cabeça mais ovalada, acompanhando o corpo (GUIMARÃES, 1979). A glândula está fixada ao crânio através de ligamento e músculos, dentre os que se destaca o músculo compressor glandulae. Esse músculo detém o principal papel no processo de inoculação do veneno durante o ataque (MELGAREJO, 2009).

A morfologia da glândula foi estudada em inúmeras espécies e aparece dividida em quatro regiões: a glândula principal é formada por túbulos ramificados, compostos pelo epitélio que produz o veneno e constitui a parte secretora ocupando toda a porção posterior; o ducto primário, que continua para a porção anterior, formando uma alça na região suborbital, e que se abre na glândula acessória. Essa última é uma estrutura oval, formada por duas porções que contribuem com secreções durante a passagem do veneno. E o ducto secundário se abre por dois poros na bainha, na base da presa (MELGAREJO, 2009).

Esta complexa estrutura teve origem durante o processo evolutivo das serpentes onde parte do aparelho digestivo formado pelas glândulas salivares e o

sistema pancreático deu origem ao mais especializado dos tecidos, cuja diferenciação possibilitou a produção de venenos tendo como base para sua formação a saliva e outras secreções oriundas da estrutura gástrica (BOISBOUVIER *et al.*, 1998).

Quanto à presença de veneno, as serpentes são classificadas em dois grupos: as peçonhentas, com aparato inoculador de veneno, e as não peçonhentas ou constritoras. No Brasil há cerca de 70 espécies peçonhentas (PINHO & PEREIRA, 2001).

1.2. VENENOS OFÍDICOS

Os venenos de serpentes são constituídos de vários componentes bioativos e apresentam uma ampla variedade de atividades fisiológicas nas suas presas e em vítimas humanas, independente da via de administração (ingerido, injetado, ou inoculado), podendo levar a morte (NOVAES, 2004; SAMPAIO *et al.*, 2005; FOX & SERRANO, 2005).

Peçonha é o veneno que sofre especialização nas glândulas salivares das serpentes, onde adquirem atividades enzimáticas, podendo destruir as proteínas e desencadear diversas reações nos seres vivos, funcionando para a serpente como um suco digestivo para o seu sustento (NOVAES, 2004). Desta forma, para adquirir o seu alimento a serpente recorre ao veneno que pode apresentar ações específicas sobre a presa, como proteolítica, coagulante, neurotóxica e hemolítica (DE BEM NETO, 2001).

Os venenos são verdadeiras misturas complexas formadas de substâncias orgânicas e inorgânicas. A composição orgânica apresenta carboidratos, aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos, proteínas e aminas bioativas. Já a composição inorgânica é composta por cálcio, ferro, cobre, magnésio, potássio, manganês, sódio, cobalto, fósforo, zinco e níquel (CALVETTE *et al.*, 2007). A característica das substâncias presentes, bem como o grau de citotoxicidade pode variar conforme a espécie, uma vez que, fatores como distribuição geográfica, sazonalidade, *habitat*, dieta, idade, gênero e dimorfismo sexual interferem na composição química (CHIPPAUX *et al.*, 1991; CARDOSO *et al.*, 2003). Para Calkosinski *et al.* (2010), as variações químicas da peçonha existem dentro da própria subespécie. A tabela abaixo apresenta algumas das principais substâncias encontradas em peçonhas de viperídeos.

Quadro 1. Substâncias encontradas em peçonhas de viperídeos.

	ENZIMAS	NÃO ENZIMÁTICOS	PEPTÍDEOS
PROTÉICAS	Metaloproteases	Ativadores de Proteína C	Cardiotóxicos
	Serino Proteases	Fatores de crescimento de	Citotóxicos
	Catalases	vasos endoteliais	Desintegrinas
	Fosfodiesterases	Fatores de crescimento de	Natriuréticos
	Fosfolipases	nervos	Neurotóxicos
	Fosfatase Alcalina	Inibidores de protrombinase	Potenciadores
	Fosfatase Ácida	Lectinas	de Bradicinina
	Hialuronidases	Lectinas <i>like</i>	
	Desoxirribonucleases	Precursores de peptídeos	
	Ribonucleases	bioativos	
	Adenosinatrifosfatases	Proteína de ligação	
	NAD-nucleotidases	plaquetária	
	Amilases		
	Ativadores de fator X		
	Fibrinogenases		
	Ativadores de		
	Protrombina		
	Heparinases		
	Oxidoredutases		
	Transferases		
	Acetilcolinesterases		
	Colagenases		
	Elastases		
	Quininogenases		
	Argininaesterase		
NÃO PROTÉICAS	Aminas, Aminoácidos, Carboidratos, Citrato, Nucleosídeos, Cálcio, Cobalto, Cobre, Ferro, Fósforo, Potássio, Magnésio, Manganês, Sódio, Zinco.		

Fonte: (Adaptado de SIERRA & PÉREZ, 2001)

Segundo Novaes (2004) a peçonha de serpentes é um coquetel de moléculas que tornam as glândulas de serpentes uma verdadeira “farmácia viva”. Possuem substâncias farmacológicas e bioquimicamente ativas que atualmente estão sendo utilizadas por inúmeros pesquisadores para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas como, por exemplo: drogas trombolíticas, drogas analgésicas e drogas contra o câncer.

Esta situação fica evidente quando se demonstrou o uso de componentes do veneno do *Bothrops jararaca* como agente anti-hipertensivo revelando, portanto, a potencialidade de tais compostos para o uso terapêutico (KARALLIEDDE, 1995; CHEN *et al.*, 2002; GARCIA, 2003; WEBER *et al.*, 2006).

1.2.1. Peçonha Crotálica

A peçonha crotálica é uma mistura complexa de proteínas e polipeptídeos que interferem em vários processos fisiológicos, determinando efeitos variáveis nas diferentes espécies animais (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 2009). A combinação de polipeptídeos e proteínas, presentes em 90% do peso seco da peçonha conferem um arranjo eficiente de propriedades tóxicas ao veneno capaz de desencadear desordens metabólicas na presa. Dentre os inúmeros efeitos que pode causar, destaca-se: neurotoxicidade, cardiotoxicidade, edematogenicidade, miotoxidade, ações coagulantes, hemostáticas, hemorrágicas, nefróticas e hepatotóxicas (MARKLAND, 1998; DE BEM NETO, 2001; PINHO *et al.*, 2004).

O alto grau de letalidade (72%) em casos não tratados permite que a peçonha crotálica seja considerada a peçonha mais tóxica entre as serpentes brasileiras

(PINHO & BURDMANN *et al.*, 2000). Bioquimicamente o veneno do gênero *Caudisona* apresenta uma composição formada por compostos inorgânicos (10% do peso seco total) e orgânicos, como enzimas hidrolíticas, proteolíticas e não proteolíticas, além de toxinas responsáveis em grande parte pela toxicidade do veneno (BARRAVIERA, 1993; BEGHINI, 2001). Dentre as toxinas que compõe o veneno de *Caudisona durissa* destacam-se como principais a crotamina, convulxina, giroxina e crotoxina, sendo a crotoxina a representante de 65% do total do veneno (BERCOVICI, 1987; ALEXANDER *et al.*, 1988; SOARES, 2007).

a) Crotamina: é uma miotoxina polipeptídica, composta de 42 aminoácidos e massa molecular de 4,8 KDa, identificada pela primeira vez por Gonçalves e Vieira em 1950, cuja ação induz paralisia espasmódica em músculos esqueléticos de origem periférica. É uma molécula resistente ao calor, suportando uma temperatura de 70°C por 18 horas sem perder sua propriedade tóxica (SILVA, 2001). Mancin *et al.* (1998) demonstraram que a crotamina injetada em camundongos, induziu um efeito analgésico dependente do tempo e da dose. Quando compararam com a morfina, a crotamina foi aproximadamente 30 vezes mais potente, até mesmo em doses extremamente baixas. Além disso, estudos farmacológicos evidenciaram que esta toxina é capaz de induzir a despolarização do potencial da membrana das células musculares, aumento da liberação basal de acetilcolina e dopamina no tecido estriado de ratos, e o aumento de secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas (GOPALAKRSHNAKONE *et al.*, 1984; TOYAMA *et al.*, 2000; SALVINI *et al.*, 2001; CAMILLO *et al.*, 2001; AIRD, 2002).

b) Convulxina: é uma metaloprotease descrita por Prado-Franceschi em 1970 que representa cerca de 5% do peso do veneno, com massa molecular em

torno de 68 kDa (BERCOVICI, 1987). Apresenta ação extremamente tóxica, principalmente quando injetada por via intravenosa. É uma neurotoxina responsável por apresentar um quadro clínico de perda de equilíbrio, alterações gastrintestinais, convulsões e alterações visuais. Atua em plaquetas, induzindo sua agregação, com subsequente isquemia cerebral (PRADO-FRANCESCHI & VITAL-BRAZIL, 1981).

c) Giroxina: isolada por Barrio em 1961, é uma glicoproteína tóxica não letal, com massa molecular de 35 kDa, que quando injetada por via intravenosa ou intracerebroventricular, é capaz de provocar episódios temporários de rotação do animal ao redor do seu próprio eixo longitudinal, causando a síndrome da lesão labiríntica caracterizada por períodos de hipoatividade alternados com hiperexcitação (ALEXANDER *et al.*, 1988). Possui ação coagulante sobre o fibrinogênio em plasma de mamíferos e exerce atividade do tipo-trombina (SEKI *et al.*, 1980). Em tecido cerebral de camundongos a giroxina não alterou a liberação basal e estimulada de neurotransmissores (dopamina e acetilcolina), sugerindo ausência de efeito neurotóxico direto (CAMILLO *et al.*, 2001).

d) Crotoxina: é o componente majoritário do veneno de *Crotalus durissus*, foi isolada em 1938 por Slota e Fraenkel-Conrat (BON *et al.*, 1988). Possui atividades fosfolipásica, neurotóxica e miotóxica e sua dose letal em camundongos é 0,13mg/Kg e é responsável pelo efeito nefrotóxico e parada respiratória de origem periférica nas presas acometidas (HAWGOOD, 1990; SANTOS *et al.*, 1992; AMORA *et al.*, 2006; NOVAIS *et al.*, 2006). É formada por um complexo não covalente de duas diferentes subunidades: uma composta por fosfolipase A₂ alcalina, com forte ação enzimática e pouco tóxica, denominada crotoxina básica (CB) de peso molecular ~14,5 kDa e a outra subunidade, por um polipeptídeo de caráter ácido que

não possui atividade enzimática, conhecido como crotoxina ácida (CA) de peso molecular ~ 9,5 kDa. É desprovida de atividade catalítica e não é tóxica, sendo sua dose letal em camundongos > 20 mg/mL (BON *et al.*, 1988). As duas subunidades formam espontaneamente um complexo 1:1, com elevado poder letal (HABERMANN & BREITHAUPT, 1978). Quando a CB encontra-se associada a CA, a sua atividade hidrolítica é reduzida, porém, as atividades neurotóxicas e miotóxicas são potencializadas (BON *et al.*, 1989).

A literatura mostra que o complexo crotoxina é uma neurotoxina de ação pré-sináptica, que inibe a liberação de acetilcolina em junções neuromusculares (BON *et al.*, 1989). A subunidade CB, quando isolada, tem ação pré-sináptica na junção neuromuscular e provoca efeito semelhante ao da crotoxina, embora requeira uma maior concentração para produzir o mesmo efeito (HABERMANN & BREITHAUPT, 1978). Além destas atividades, a fração CB ainda exerce efeitos anticoagulantes, bactericidas e edematogênicos (KOUYOUMDJIAN *et al.*, 1986). Estudo desenvolvido por Santos *et al.* (2004) sobre a atividade tóxica das crotoxinas e frações isoladas de venenos das subespécies *C.d. terrificus*, *C. d. cascavella* e *C. d. collilineata* demonstrou que as frações CB apresentam atividade neurotóxica, miotóxica e edematogênica menor que as crotoxinas correspondentes. Desta forma, observaram ao término do estudo, que a interação entre as subunidades CA e CB é fundamental para a alta toxicidade desta proteína.

1.2.2. Citotoxicidade e Testes de Avaliação *in vitro*

A citotoxicidade é definida como a ação que um determinado componente exerce sobre as células, com propriedade de causar a sua morte. É um termo abrangente que significa, em linhas gerais, morte celular induzida. Está presente em todos os organismos multicelulares e unicelulares, e em mamíferos a citotoxicidade pode ser causada pela atividade lítica direta de uma célula citotóxica (atividade fagocítica e receptores de morte, por exemplo) ou pela secreção de moléculas líticas solúveis (defensinas, componentes do sistema complemento, TNF, perforina/granzimas, por exemplo) (NOVAES, 2004; PONS & PINTO, 2011).

Como a variedade de produtos a serem avaliados tem crescido e muito, há necessidade de se estudar novas metodologias e escolher entre elas a que possa responder melhor quanto à presença de possíveis elementos tóxicos (ROGERO *et al.*, 2003).

A utilização de testes *in vitro* proporciona uma avaliação segura dos componentes utilizados, e garante vantagens econômicas sobre os testes *in vivo*. Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos, principalmente aqueles de aplicação clínica, e que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo do paciente (ROGERO *et al.*, 2003).

Estes estudos representam os primeiros testes sobre a toxicidade de um material e contribuem para tornar as pesquisas, utilizando modelos animais, mais

seguras, o que parece ser de grande utilidade, considerando os aspectos éticos da pesquisa (FIDALGO *et al.*, 2009).

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos, e depois de comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade, realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório.

Os testes de citotoxicidade possibilitam identificar os componentes ativos; os mecanismos pelos quais o componente exerce seu efeito tóxico; descrever e identificar a taxa de atividade de um componente; bem como, o alvo potencial na população celular estudada, e determinar a taxa de concentração tóxica e a relação da concentração do agente tóxico com o tempo de exposição (NOVAES, 2004).

Ressalta-se que as limitações destes testes devem ser consideradas no momento da interpretação dos resultados, e os experimentos desenvolvidos em cultura celular não substituem aqueles desenvolvidos com outros modelos experimentais. *In vivo*, as células fagocíticas, vasos sanguíneos e linfáticos diluem as substâncias e possibilitam sua eliminação, o que não ocorre nos testes de citotoxicidade *in vitro* (WALL *et al.*, 1972).

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto. Estudos com estes métodos demonstraram que os testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente

acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro* (ROGERO *et al.*, 2003).

Diversas são as metodologias para testes de citotoxicidade, como, redução do tetrazólio (MTT), incorporação do vermelho neutro, incorporação da timidina tritiada, método de difusão em ágar, método de extração e o método de *Azul de tripano*, dentre outras (LONNROTH & DAHL, 2003; SUSINI *et al.*, 2006).

O teste de exclusão de células mortas com Azul de Tripano, constitui uma técnica rápida e de fácil execução. Células viáveis são impermeáveis a este corante, uma vez que sua penetração na célula indica a perda da integridade de sua membrana (KALDAHL *et al.*, 1996). Esta metodologia tem sido empregada para avaliação do efeito tóxico de inúmeras substâncias com potencial aplicação clínica. Portanto, é possível distinguir células vivas, danificadas ou mortas, pela contagem de células viáveis por meio da microscopia óptica (CIAPETTI *et al.*, 1996).

1.2.3 Morte Celular

A lesão celular ocorre quando as células são submetidas a estímulos intracelulares ou extracelulares, diminuindo assim a capacidade de adaptação. A extensão na qual qualquer agente nocivo pode causar lesão celular e morte depende em grande parte, da intensidade e duração da lesão bem como do tipo de célula envolvida (HENGARTNER, 2000; KUMAR *et al.*, 2005).

A lesão celular e a morte celular são processos contínuos, e na condição de saúde, são balanceadas pela renovação celular. Em cada linhagem celular, o controle do número de células é regulado por um balanço entre a proliferação celular

e a morte celular, sendo os processos de morte celular classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em: apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica, e senescência (CASTEDO *et al.*, 2004; OKADA & MAK, 2004; PORTH, 2004).

A autofagia caracteriza-se como um processo adaptativo conservado evolutivamente e controlado geneticamente, na qual a degradação de componentes celulares ocorre em resposta a um estresse metabólico. As porções citoplasmáticas são encapsuladas por membranas, formando estruturas denominadas autofagossomos, aonde os mesmos irão se fundir com os lisossomos, e posteriormente o conteúdo dos autofagossomos será degradado pelas enzimas hidrolases lisossomais (DANIAL & KORSMEYER, 2004; KELEKAR, 2005; LUM *et al.*, 2005).

A mitose catastrófica é um processo passivo, porém considerado por muitos estudos um mecanismo regulado geneticamente. Desta forma, caracteriza-se como uma mitose aberrante, resultando em uma segregação cromossômica errônea, determinando assim uma sinalização irreversível para a morte (CASTEDO *et al.*, 2004; WEAVER & CLEVELAND, 2005).

A morte celular por senescência é um processo metabólico ativo que ocorre por meio de uma programação genética levando a deterioração dos telômeros e ativação dos genes supressores tumorais. Desta forma, as células que entram em senescência, perdem a capacidade proliferativa após um determinado número de divisões celulares (MOOI & PEEPER, 2006).

1.2.3.1 Necrose

A necrose se refere ao espectro de alterações morfológicas que ocorrem após a morte celular em um tecido vivo, resultando, em grande parte, da ação progressiva de enzimas nas células que sofreram uma lesão letal. Sendo assim, a necrose é o correspondente macroscópico e histológico da morte celular que ocorre devido a uma lesão exógena irreversível (*ROBBINS & COTRAN, 2005*).

As células necróticas são incapazes de manter a integridade das membranas, acarretando um influxo de água e íons extracelulares, levando a turgidez da célula inteira, com conseqüente ruptura da mesma, ocorrendo o extravasamento do seu conteúdo (*ALBERTS et al., 1997; APOPTOSIS, 2002*).

A aparência morfológica da necrose resulta da desnaturação das proteínas intracelulares e da digestão enzimática da célula. A necrose difere da apoptose, por envolver a digestão enzimática desregulada dos componentes celulares, perda da integridade da membrana celular, com liberação descontrolada dos produtos da morte celular no espaço intracelular e início da resposta inflamatória (*PORTH, 2004; ZIEGLER & GROSCURTH, 2004*).

1.2.3.2 Apoptose

A partir de 1964, foi criado o termo “morte celular programada” para designar assim, um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental. Em 1972, Kerr, Wyllie e Currie, substituíram esse termo por “apoptose”, para indicar este tipo de

morte celular. Apoptose é a via de morte celular induzida por um programa intracelular altamente regulado, no qual as células destinadas a morrer, ativam enzimas que degradam seu DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas (ROBBINS & COTRAN, 2005).

As características morfológicas da apoptose, demonstram uma retração celular, levando a perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. Ocorre a manutenção morfológica das organelas celulares, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar a ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação, concentrando-se junto à membrana nuclear, mantendo-se intacta. Além disso, a membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Ocorre o aumento, tanto em número, quanto em tamanho dos prolongamentos da membrana, com posterior ruptura, originando assim estruturas com conteúdos celulares denominados de corpos apoptóticos. Como característica marcante da apoptose, evidencia-se a fragmentação internucleossômica do DNA, onde uma endonuclease é ativada produzindo fragmentos de DNA de tamanhos variáveis (SARASTE & PULKKI, 2000; ZIEGLER & GROSCURTH, 2004).

A ativação dos mecanismos apoptóticos pode ser iniciada de duas maneiras distintas: via extrínseca (citoplasmática) ou via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca é ativada por meio da ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana, sendo este denominado de super família de Receptores de Fatores de Necrose Tumoral (*Tumor Necrosis Factor Receptor*, rTNF), que por meio desta ligação, ativa a cascata das caspases. Já, a ativação da via intrínseca ocorre por meio de estresse intra ou extracelular, como a deprivação de fatores de

crescimento, danos no DNA, hipóxia, ou ativação de oncogenes. Os sinais decorrentes de tais fatores são convergidos principalmente para a mitocôndria, sendo desta forma, a mitocôndria caracterizada como o principal mediador desse tipo de morte. Essa organela recebe os estímulos sinalizadores de morte celular, induzindo a permeabilização da membrana mitocondrial e conseqüentemente ocorre a liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (BUDIARDJO *et al.*, 1999; HENGARTNER, 2000; DESAGHER & MARTINOU, 2000).

Uma vez que, a apoptose ocorre por meio de uma cascata muito bem regulada, há muitas possibilidades para medir a atividade desses reguladores ou as conseqüências funcionais da sua ação. Um grande número de ensaios para a avaliação das características da apoptose e contagem de células apoptóticas tem sido utilizados em ensaios *in vitro*, levando-se em consideração as vantagens e desvantagens pertinentes a cada teste. As principais características do mecanismo apoptótico verificados por meio dos diferentes ensaios incluem: a ativação da caspase, a fragmentação de DNA, bem como alterações da membrana plasmática e mitocondrial (SCHULZE-OSTHOFF, 2008).

1.2.4. Ação dos Venenos de Serpentes e o seu Uso na Terapêutica

Componentes do veneno de serpentes são de grande interesse e valor comercial, o que justifica inúmeros estudos envolvendo suas atividades funcionais e farmacológicas para aplicações clínicas, uma vez que suas funções biológicas servem como ferramentas bioquímicas em biotecnologia e pesquisas biomédicas (LIS & SHARON, 1998). Um exemplo clássico foi o estudo do veneno de *Bothrops*

jararaca, que permitiu o descobrimento do captopril, uma enzima inibidora da conversão da angiotensina, amplamente utilizada no tratamento da hipertensão arterial, na insuficiência cardíaca congestiva e na doença arterial coronária (CAMARGO, 1999).

Com isso, a utilização do veneno ofídico na saúde e o interesse médico científico na compreensão estrutural e funcional dessas moléculas trazem contribuições significativas para a descoberta de novas drogas, bem como para o desenvolvimento de técnicas eficientes na sua aplicação (OLIVEIRA, 2006).

1.2.4.1. Ação Bactericida

A busca por agentes bactericidas tem despertado interesse em pesquisadores na área da saúde sobre a ação do veneno de serpentes. Estudo realizado por Marcussi *et al.* (2004) utilizando uma enzima glicoprotéica que catalisa a desaminação oxidativa de L-aminoácidos, chamada L-aminoácido oxidase (LAAO) foi isolada do veneno de *Bothrops moojeni* e testado sua atividade bactericida sobre *Escherichia coli* DH5. Ao término do estudo concluíram que a LAAO apresenta atividade bactericida, mostrando-se uma enzima de grande interesse médico-científico e podendo ser utilizada como modelo para desenho de novos fármacos de aplicação na clínica médica.

O efeito antibacteriano dessa mesma enzima, LAAO, foi isolado da serpente *Ophiophagus hannah* por Lee *et al.* (2011) e testado contra várias cepas incluindo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* usando ensaio de microdiluição em caldo.

Para comparação, os efeitos antibacterianos de vários antibióticos (cefotaxima, canamicina, tetraciclina, vancomicina e penicilina) também foram examinados usando as mesmas condições. Os resultados foram eficientes em inibir duas bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*), porém a LAAO foi moderadamente eficaz contra três bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli*). Em outro estudo, a ação sobre as bactérias *E. coli* e *S. aureus* testadas por Ticli (2006) demonstraram que a LAAO isolada da serpente *Bothrops jararacussu* tem ação bactericida diminuindo significativamente o número de colônias quando incubada junto com as bactérias pelo tempo de 1h. Torres *et al.* (2010) identificaram atividade inibitória dose dependente no crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, e *Staphylococcus aureus* e das formas promastigotas da *Leishmania chagasi* e *amazonensis* ocasionada pela ação da LAAO da *Bothrops marajoensis*. Outro estudo realizado com a fração Bp-LAAO da *Bothrops pauloensis* também demonstrou atividade de supressão do crescimento dose dependente sobre bactérias gram-negativas e gram-positivas (RODRIGUES *et al.*, 2008).

1.2.2.2. Ação Antiparasitária

Estudo desenvolvido com o veneno da serpente *Bothrops jararaca* por Gonçalves *et al.* (2002) demonstrou que a peçonha pode afetar o crescimento do *Trypanossoma cruzi* e de *Leishmania major*. Acreditam ser, provavelmente por desagregar o aparelho mitocondrial do parasito bloqueando sua capacidade de produzir energia. Já Deolindo *et al.* (2005) em estudo desenvolvido com o veneno da

mesma serpente, concluíram que o estresse induzido no epimastigoto do *T. cruzi*, ativa um processo programado de morte celular, similar à apoptose dos metazoários, conduzindo a morte do parasito. Os pesquisadores observaram que após aplicação do veneno houve aumento do volume da mitocôndria, fragmentação do DNA nuclear e exposição de fosfatidilserina na superfície da célula.

Outro estudo desenvolvido com o objetivo de avaliar o crescimento de parasito foi realizado por Shinohara *et al.* (2006). Foram avaliados os efeitos *in vitro* do veneno de *Crotalaria durissima terrificus* e *Bothrops jararaca* no crescimento e aderência de trofozoítos de *Giardia duodenalis*. Perceberam ao término do estudo que ambos os venenos inibiram o crescimento dos trofozoítos, e que o nível da inibição variou de acordo com as concentrações e o tempo de incubação, porém nenhum efeito foi observado na aderência do parasito. Tempone *et al.* (2001) também demonstrou que a L-aminoxidase extraído do veneno de *Bothrops moojeni*, provoca morte de diferentes espécies de *Leishmania* podendo desta forma agir como agente terapêutico contra a Leishmaniose.

Ticli (2006) testou a atividade antiparasitária da L-aminoácido oxidase isolada do veneno da *Bothrops jararacussu*. Utilizou os parasitas *T. cruzi*, *L. donovani*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*. A atividade tripanocida apresentou ótimos resultados, ultrapassando 60% de lise na forma tripomastigota do parasita *T. cruzi*. Da mesma forma foram os resultados encontrados para atividade leishmanicida, em que a enzima atuou sobre todas as espécies de Leishmanias avaliadas. Enfatiza que sobre a *L. braziliensis* obteve excelentes resultados onde na menor concentração a enzima apresentou ação sobre 77% dos parasitas.

Bastos (2008) demonstrou através de sua pesquisa a ação antiparasitária de uma metaloprotease denominada neuwiedase, obtida do veneno de *Bothrops pauloensis*. A mesma apresentou capacidade de impedir a adesão do *Toxoplasma gondii* à célula alvo. Segundo o pesquisador, este processo ocorreu pela degradação de proteínas expressas pelos fibroblastos que formam a laminina, potencializando a fixação do *T. gondii* nas células alvo diminuindo a infecção parasitária.

1.2.2.3. Ação Antiviral

Estudos publicados recentemente mostram a atividade antiviral de algumas frações de venenos ofídicos. Borkow & Ovadia (1999) testaram a ação antiviral de frações extraídas do veneno das serpentes *Naja atra* e *Naja nigricollis* sobre células infectadas com o vírus Sendai. O efeito do veneno em causar hemólise em eritrócitos humanos foi avaliado em três diferentes configurações: na primeira, o vírus Sendai foi pré-tratado com o veneno antes da adição aos eritrócitos humanos; na segunda fase, o vírus não tratado foi adicionado aos eritrócitos que foram pré-incubados com os venenos, e na terceira etapa, foi adicionado veneno nos eritrócitos pré-infectados com o vírus Sendai. Ao término do estudo, perceberam que os eritrócitos que foram pré-infectados com o vírus Sendai na terceira etapa, foram 10 vezes mais suscetíveis a hemólise pela ação do veneno das duas cobras, se comparados às outras fases do experimento.

Atividade antiviral, utilizando vírus do sarampo, foi encontrada em frações não citotóxicas do veneno da *Caudisona durissa terrificus*. A inibição da replicação viral

em células de rim de macaco (VERO) foi observada quando o veneno foi adicionado antes ou durante a infecção de células com vírus (PETRICEVICH & MENDONÇA, 2003). Da mesma forma, estudo desenvolvido por Muller *et al.* (2011) mostrou a ação antiviral do veneno bruto e de toxinas isoladas utilizando a mesma subespécie de serpente. Foi descoberto que a PLA₂ possui alta inibição do vírus da febre amarela e da dengue em células VERO E6. Referem que esta inibição ocorreu nas etapas iniciais do ciclo de replicação e que a maior atividade antiviral da PLA₂ se deu no ensaio virucida, agindo diretamente sobre a partícula do vírus.

Em estudo de Villarrubia *et al.* (2004) a PLA₂, também isolada de *Caudisona durissa terrificus* (PLA₂ – Cdt) , demonstrou possuir atividade contra o HIV *in vitro*. O efeito parece ser devido ao fato da PLA₂ com atividade anti-HIV utilizar receptores específicos do tipo N para realizar os seus efeitos. Estes receptores se expressam em numerosos tecidos, incluindo células do sistema imunitário. Outro exemplo da atividade anti-HIV da PLA₂ foi observado por Fernard *et al.* (2001) em pesquisa desenvolvida com 12 peptídeos sintéticos derivados da PLA₂, contida em venenos. O peptídeo p3bv bloqueia a ligação do HIV-1 às células T, pois se liga ao receptor CXCR4. Desta forma, as partículas virais não são capazes de se ligarem às células, e transcorrido um determinado período de tempo tornam-se inviáveis ao não conseguirem se multiplicar. A *imunocina* derivada do veneno da cobra *Naja naja siamensis* demonstrou ação inibitória da infecção de linfócitos pelo HIV e pelo vírus da imunodeficiência felina (MEENAKSHISUNDARAM *et al.*, 2009).

1.2.2.4. Ação Antitumoral

A utilização de venenos ofídicos como agentes antitumorais vem sendo pesquisada desde o século passado. Recentemente estudos com veneno de *Bothrops jararaca* mostrou a redução no crescimento de um tumor ascítico, induzido em murinos, através da inibição na síntese de interleucina 6 (IL-6). Também foi observado aumento na sobrevivência dos camundongos após o tratamento com o veneno total de serpentes de outro gênero (SILVA *et al.*, 2002; ABU-SINNA *et al.*, 2003). Estudo utilizando a peçonha da *Lachesis muta muta*, parcialmente purificado, revelou que um micrograma do veneno conseguiu reduzir em 50% o tamanho do tumor em ratos. Explicam que o veneno atua sobre o sistema circulatório, inibindo a agregação plaquetária e angiogênese, o que conseqüentemente reduz o tamanho do tumor (FREITAS, 2006).

Hernandez *et al.* (1993) encontraram excelentes resultados em pesquisa realizada com frações do veneno de *Caudisona durissus terrificus* no tratamento de células do sarcoma de ratas, relacionados à regressão e ao tempo de sobrevivência dos animais. O mesmo efeito foi pesquisado por Lipps (1994) com a peçonha de *Caudisona atrox* e *Naja naja kaouthia*. Foi avaliado o efeito antitumor através de frações de cada veneno e sua atividade biológica em células do mieloma de rato. As frações foram purificadas e testadas, separadamente e combinadas, mostrando os efeitos na morte de vários tipos de células de câncer humano e animal. Também foi avaliado o efeito citotóxico das frações *in vitro* e as propriedades de impedir o crescimento do tumor ou de causar regressão, *in vivo*. Ao término do estudo foi observado que a combinação das frações exibiu uma atividade antitumoral mais

elevada do que cada fração separada, além disso, as frações não mostraram efeito citotóxico nas células normais usadas no experimento.

Pesquisas revelam que uma proteína, a desintegrina, presente no veneno de algumas serpentes pode deter metástases. Motta (2009) observaram em pesquisas com animais, que diferentes desintegrinas purificadas do veneno de serpentes como a *Bothrops jararaca* e as espécies asiáticas *Agkistrodon rhodostoma* e a *Trimeresurus flavoviridis* são capazes de reduzir a capacidade de ativação e a migração de células de um tipo de melanoma com grande capacidade de formar metástase, especialmente nos pulmões. Os pesquisadores constataram que as desintegrinas têm a capacidade de bloquear ou alterar a função de outra família de proteínas, as integrinas, presentes na membrana celular que são utilizadas pelas células cancerosas para se multiplicar.

1.2.2.5. Outros

Ação do veneno de *Calloselasma rhodostoma*, serpente encontrada na Ásia, vem sendo estudado por pesquisadores do Health Science Center da Universidade do Texas em Sant Antonio. Estes referem que o veneno é capaz de diminuir a agregação das células do sangue, tornando-o menos viscoso, e podendo ser eficaz no tratamento de pacientes com acidentes vasculares cerebrais (SHERMAN *et al.*, 2000).

A aplicabilidade dos venenos ofídicos também vem sendo utilizada no desenvolvimento de materiais para uso diagnóstico. Um exemplo são os *kits* utilizados para analisar as doenças que afetam os fatores de coagulação (GAWADE,

2007), como por exemplo, o teste do Reptilase Time (RT) utilizado na detecção de anormalidades que afetam o fibrinogênio (FUNK *et al.*, 1971).

Outro destaque da utilização dos venenos ofídicos é o seu uso na clínica, como é o caso da trombina-*like* obtida da peçonha de *Bothrops atrox* utilizada em doenças cardiovasculares e outras coagulopatias (MARSH & WILLIAMS, 2005), bem como uma proteína fibrinolítica com atividades fibrino e fibrinogenolíticas extraída da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus* que tem demonstrado um alto valor terapêutico na utilização contra trombose (RAMOS, 2001).

A aplicação de compostos obtidos de peçonhas ofídicas tem possibilitado o desenvolvimento de produtos denominados por alguns pesquisadores como “cola biológica”, como é o caso de Stolf (1998), que através de seu estudo demonstrou que a fração trombina-*like* obtida do veneno de serpente, utilizada na forma de adesivo proporcionou a união de bordas de feridas em pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico. Da mesma forma, Oliveira (2001) avaliou a utilização de adesivo contendo trombina-*like* em enxertos gengivais, observou melhores resultados quando comparados com método de sutura convencional. Já Gatti (2009) avaliou a utilização destes adesivos em pacientes com úlceras venosas, percebeu que com este tratamento, os mesmos evoluíram mais rapidamente para cicatrização reduzindo a dor, os custos com o tratamento e conseqüentemente o tempo de internação. Considera-se oportuno referenciar que as serpentes utilizadas nestes estudos não foram citadas por nenhum dos pesquisadores, acredita-se que isto se deva provavelmente pelo interesse em patentear um novo produto.

Amaral *et al.* (2004) utilizando cola de fibrina derivada do veneno de *Caudisona durissa terrificus* puderam observar que a mesma proporcionou a fixação

de enxertos de pele favorecendo a integração cutânea e avanços no processo de recuperação.

Nota-se que inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos com toxinas e enzimas ofídicas isoladas de serpentes do mundo todo. O interesse em conhecer sua ação antimicrobiana e o seu uso potencial para aplicações na saúde vem ganhando destaque em pesquisas científicas, contudo, peçonhas de serpentes típicas do cerrado brasileiro são pouco exploradas. Para tanto, conhecer o potencial citotóxico do veneno bruto de *Caudisona durissa collilineata* e suas frações poderá contribuir para a descoberta de novos fármacos, bem como substâncias que ajudarão no tratamento e prevenção de inúmeras doenças.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o potencial citotóxico da peçonha de *Caudisona durissa collilineata* em CMN do sangue periférico humano, utilizando testes *in vitro* de viabilidade celular e fragmentação de DNA.

2.2 ESPECÍFICOS

- Padronizar a obtenção de CMN do sangue periférico para utilizar em cultivo celular.
- Determinar a concentração inibitória do veneno por meio de ensaios *in vitro*.
- Avaliar a potencial indução de apoptose do veneno em CMN, *in vitro*.
- Identificar as concentrações citotóxicas do veneno da *Caudisona durissa collilineata* sobre as CMN do sangue periférico humano, *in vitro*.

3. METODOLOGIA

3.1 CASUÍSTICA

O grupo amostra valeu-se de 18 indivíduos saudáveis de ambos os sexos, com faixa etária entre 20 e 35 anos. Para tanto, os indivíduos foram abordados nas dependências do Campus V da PUC – GO, e após o esclarecimento dos objetivos do estudo, os mesmos foram convidados a participar, e os que concordaram voluntariamente assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A). Foram excluídos, indivíduos com idade inferior a 18 anos e que não concordaram em participar da pesquisa. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sob parecer 0308/10 (Apêndice B). As atividades desenvolvidas para a realização do estudo encontram-se apresentadas a seguir, por meio da Figura 2 e 3.

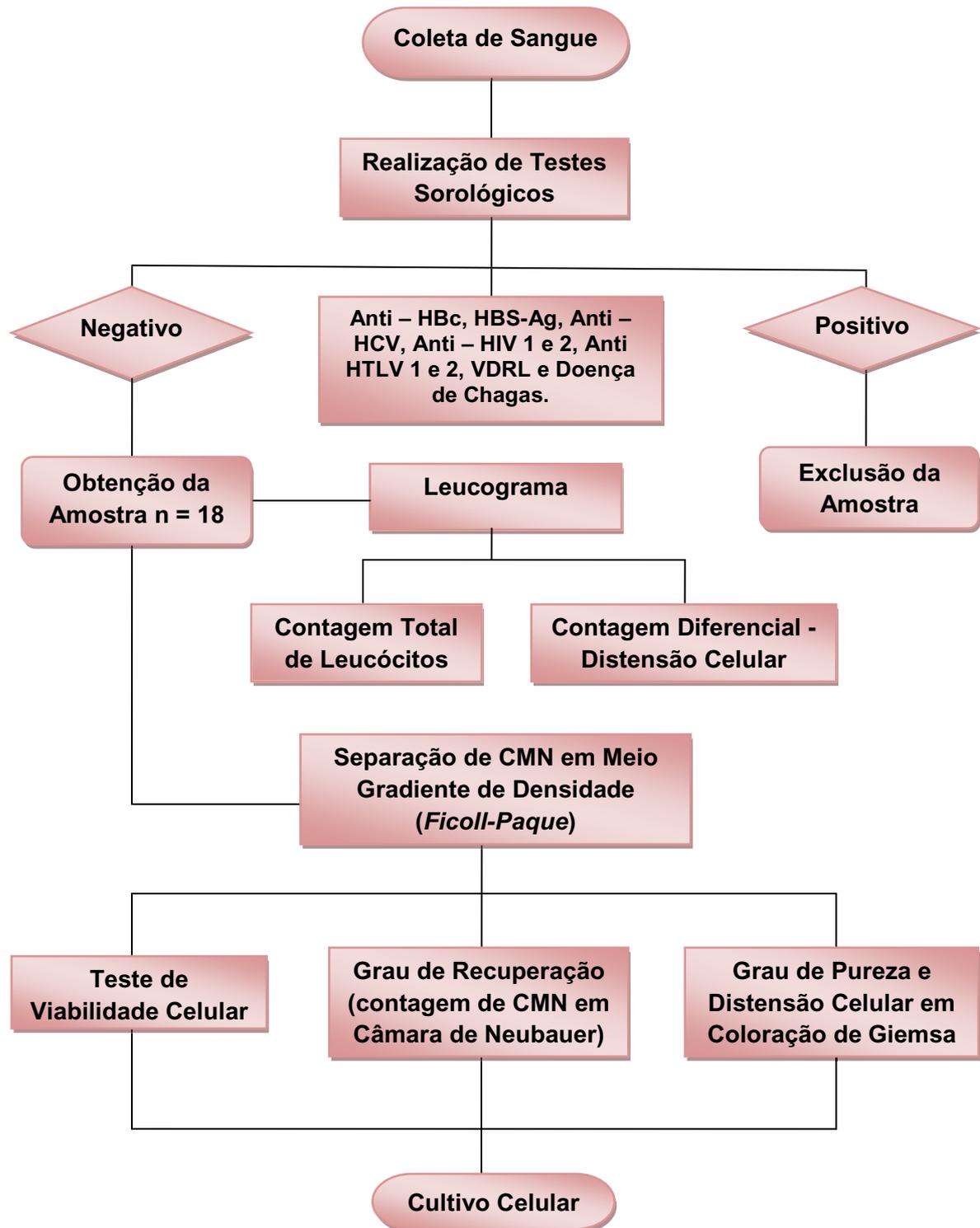


Figura 2. Fluxograma das atividades realizadas para obtenção de células mononucleares (CMN) do sangue periférico para cultivo celular.

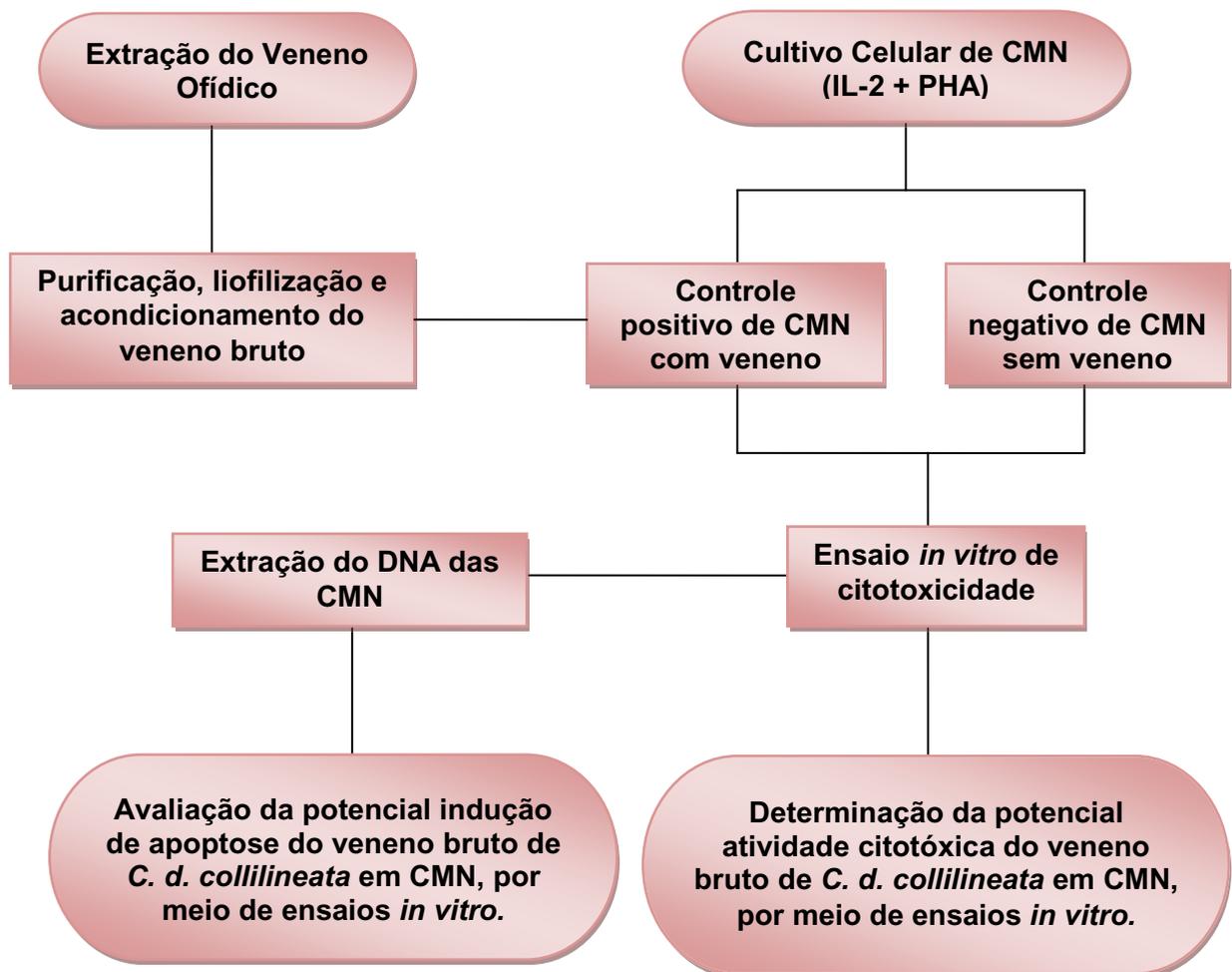


Figura 3 – Fluxograma do ensaio da potencial atividade citotóxica e indução de apoptose *in vitro*, do veneno bruto de *Caudisona durissa collilineata* em células mononucleares do sangue periférico humano.

3.2 EXTRAÇÃO DO VENENO

O veneno da serpente *Caudisona durissa collilineata*, mantida no serpentário do Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas (CEPB) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO), foi extraído por massagem manual da glândula de veneno. Logo após, foram clarificados por centrifugação a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, e em seguida, liofilizados e acondicionados a -86°C.

3.3 OBTENÇÃO DE CMN DE SANGUE PERIFÉRICO HUMANO

A obtenção de CMN se deu através da coleta de 10 mL de sangue venoso de 18 indivíduos com sorologia negativa para Anti-HBc, HBs-Ag, Anti-HCV, Anti-HIV 1 e 2, Anti-HTLV 1 e 2, VDRL e Doença de Chagas. Após a coleta do sangue em tubos Vacutainer heparinizados, realizou-se a diluição de 20 μ L de sangue em 400 μ L de líquido de Turck para a contagem de leucócitos totais. Foi realizada distensão celular a partir do sangue total para contagem do diferencial de leucócitos.

O sangue total heparinado foi centrifugado durante 20 minutos a 2000 rpm sob temperatura de 18°C para obtenção do anel leucocitário. O anel leucocitário foi extraído, transferido para um tubo Falcon e adicionada Solução Salina Tamponada (PBS) a fim de completar 10 mL. Posteriormente, para obtenção das CMN, o homogeneizado foi aplicado sobre o meio de gradiente de densidade (Ficoll-paque, densidade = 1,077 g/L, Amersham). Esta solução foi centrifugada por 20 minutos a 3000 rpm sob temperatura de 18°C para obtenção da nuvem leucocitária. As células da interfase foram extraídas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e lavadas por 3 vezes em PBS (10 minutos, 2000 rpm, 18°C). Após a última lavagem, as células foram mantidas em meio RPMI 1640 com 20 mM de HEPES (Gibco-BRL™, Grand Island, NY, EUA) acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 2mM de L-glutamina (Gibco-BRL™).

3.3.1 Grau de Recuperação

A avaliação do grau de recuperação ocorreu através da correlação entre o número de CMN presentes na distensão celular realizada com o sangue total, com o número de CMN presentes após a separação celular contadas na câmara de Neubauer. O grau de recuperação foi determinado pela relação entre a porcentagem de CMN antes e após a separação.

3.3.2 Teste de Viabilidade Celular (VC)

Para realização do teste de viabilidade foi utilizado o corante de exclusão azul de tripano que apresenta afinidade maior por proteínas do soro do que por proteínas celulares, onde as células não viáveis ficam coradas de azul. Para tanto foram utilizados 10 μ L da suspensão de CMN acrescidos de 10 μ L do corante sendo a leitura realizada em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi calculada pela seguinte fórmula:

$$VC (\%) = \frac{\text{Total de células viáveis}}{\text{Total de células viáveis + não viáveis}} \times 100$$

Foram utilizadas no experimento as suspensões celulares que apresentaram o grau de viabilidade $\geq 95\%$.

3.3.3 Grau de Pureza

O grau de pureza foi determinado a partir da porcentagem de CMN da suspensão após a separação em relação à presença de polimorfonucleares. Para tanto, foi realizada uma distensão celular corada pelo Giemsa e realizada leitura em microscopia ótica comum. Foram contadas 100 células para quantificação percentual de CMN. A porcentagem aceitável para a realização do experimento foi $\geq 90\%$.

3.4 CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

A partir da padronização do cultivo celular, um total de 2×10^5 células/mL, foram distribuídas em cada poço da placa de cultivo e ativadas com 20 UI/mL de Fitohemaglutinina (PHA) (Pharmacia) e 1 μ g/mL de Interleucina - 2 (IL - 2) (Amersham) mantidas em meio RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB, durante 72 horas a uma temperatura entre 35 - 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. A ativação utilizando a dose sub-ótima de PHA e IL - 2 foi padronizada em estudo realizado por Rivero (2010), Stival (2011) e Castro (2011). O cultivo foi realizado em triplicata com e sem a utilização do veneno bruto. As placas foram monitoradas diariamente quanto à contaminação com agentes microbianos tais como bactérias, fungos filamentosos e leveduras em microscopia ótica.

3.4.1 Ensaios de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método de exclusão de azul de tripano nas soluções, contendo diferentes concentrações do veneno bruto de *Caudisona durissa collilineata*. Após pesagem do veneno, o mesmo foi diluído em 1mL de RPMI 1640 com 10% de SFB. A concentração celular utilizada foi 2×10^5 células/mL em cada poço da placa de cultivo celular, juntamente com 20µl das diferentes concentrações do veneno: 50µg/mL, 5µg/mL, 0,5µg/mL, 0,05µg/mL, 0,005µg/mL e 0,0005µg/mL. As CMN expostas ou não ao veneno foram incubadas e visualizadas em diferentes períodos. Realizou-se a homogeneização das células de cada poço (10µL) antes da retirada de uma alíquota de 10µL, sendo esta posteriormente homogeneizada com 10µL de Azul de tripano para contagem em câmara de Neubauer após 24, 48 e 72 horas de cultivo. A visualização da viabilidade celular foi determinada uma vez que as CMN vivas possuem a membrana celular intacta, não permitindo que as mesmas sejam coradas. Assim, as células coradas indicaram morte celular.

3.4.2 Extração do DNA de CMN

As CMN submetidas ao tratamento ou não com diferentes concentrações do veneno bruto de *C. d. collilineata* após 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas de incubação foram lisadas com tampão de lise (AL- Lysis buffer) (QIAGEN®). Para tanto, foram transferidos 100µL da amostra para um tubo *ependorf* e adicionados 200µL de AL e 20µL de proteinase K (pK). Após homogeneização no vortex por 15 segundos cada

tubo, os mesmos foram incubados durante 10 minutos a 56°C. Foram adicionados 200µL de etanol absoluto, homogeneizado no vortex novamente por 15 segundos e o volume da mistura de cada tubo foi transferido para uma coluna e centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. Deram-se início as lavagens, primeiro adicionando 500µL de AW1(*Wash Buffer*) (QIAGEN®) centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto e posteriormente adicionando 500µL de AW2 (*Wash Buffer*) (QIAGEN®) e centrifugado a 14.000 rpm durante 3 minutos. Após as lavagens a parte superior de cada coluna foi transferida para um micro tubo *ependorf* definitivo e adicionados 50µL de AE (*Elution Buffer*). Após 3 minutos de incubação em temperatura ambiente, o mesmo foi centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto e o DNA das CMN foi extraído.

3.4.3 Avaliação da potencial indução de apoptose do veneno em CMN, *in vitro*.

O DNA obtido foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%. Para tanto foi colocado 1 g de agarose juntamente com 100 mL de TBE 0,5 X novo em um becker, sendo aquecido no microondas até a total solubilização da agarose. A solução foi transferida para o aparelho de eletroforese durante 30 minutos até a polimerização do gel. Em seguida o gel foi coberto por 300 mL de solução TBE 0,5 X, até atingir os eletrodos do equipamento. Foi adicionado no primeiro slot do gel 5 µl de padrão de peso molecular, 1 µL de *loading buffer* e 2 µL brometo de etídeo. O procedimento foi repetido nos outros slots utilizando seis amostras de DNA, em vez do padrão de peso molecular. Em seguida, a cuba foi conectada a fonte a 100 V por cerca de 1 hora, até o *loading buffer* ter chegado a 1 ou 2 cms do fim do gel.

Posteriormente, as bandas foram observadas sob a luz ultra-violeta (UV) e fotografadas para a análise.

3.5 ANÁLISE DOS DADOS

A associação intra e inter – observador foi determinada através do coeficiente de correlação de Spearman, sendo significativo quando $p \leq 0,05$. A análise de recuperação, viabilidade, contagem diferencial e grau de pureza das CMN foi feita através de uma análise descritiva dos dados. Os resultados encontram-se apresentados em tabela com frequência simples e média. A extração do DNA das CMN, bem como a verificação da indução ou não da apoptose por diferentes concentrações do veneno bruto foram apresentados e analisados por meio da eletroforese em gel de agarose. E os resultados referentes às análises das concentrações do veneno bruto encontram-se apresentados em um gráfico de linha para melhor visualização do resultado.

4. RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO DA CONTAGEM DE LEUCÓCITOS TOTAIS

A realização do cultivo celular é um procedimento que requer a padronização do processo de obtenção de CMN. Para tanto foram realizadas 18 contagens de uma mesma diluição de leucócitos totais na câmara de Neubauer, proporcionando assim a avaliação intra e inter-observador como forma de tornar o experimento o mais fidedigno em todo o seu processo.

Os resultados obtidos pelos dois observadores foram comparados por meio de correlação de Spearman, a fim de verificar o grau de concordância entre as contagens. Os resultados obtidos encontram-se apresentados nas Figuras 4 e 5.

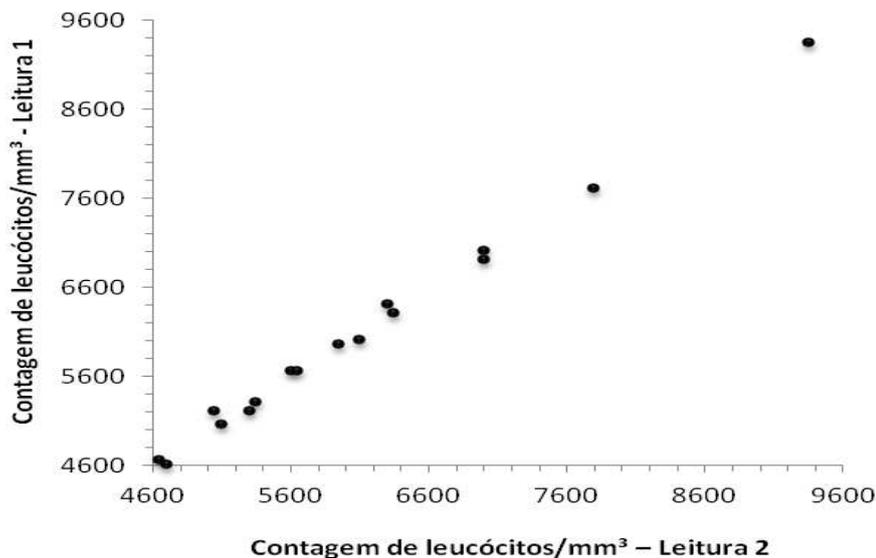


Figura 4. Contagem de leucócitos realizada em duplicata em câmara de Neubauer de uma mesma amostra por um único observador – Associação intra-observador ($r = 0,998$; $p < 0,001$, correlação de Spearman).

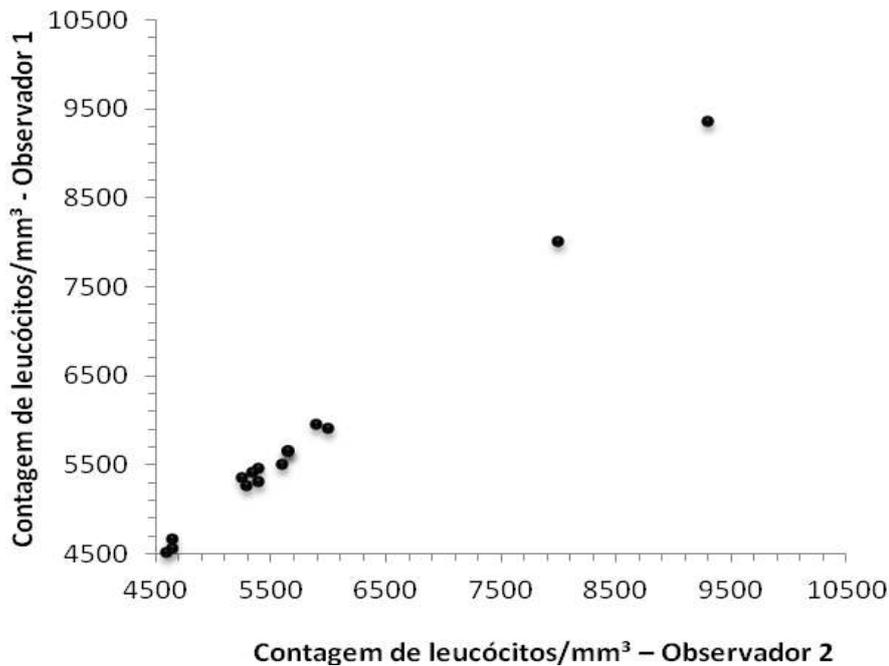


Figura 5. Contagem de leucócitos realizada em câmara de Neubauer de uma mesma amostra por observadores diferentes – Associação inter-observador ($r = 0,993$; $p < 0,001$, correlação de Spearman).

Ao analisarmos a figura 4, notamos que a leitura referente à contagem de leucócitos de uma mesma diluição realizada por um único observador, apresentou associação forte e altamente significativa, ou seja, como a correlação de Spearman (r) foi alta ($r = 0,998$) e significativa ($p < 0,001$) houve associação entre as variáveis indicando que não ocorreu diferença significativa entre as leituras.

Da mesma forma, uma associação forte e altamente significativa foi observada quando as duas leituras de um mesmo experimento foram realizadas por observadores diferentes ($r = 0,993$; $p < 0,001$, correlação de Spearman) indicando que houve associação estatística entre as leituras efetuadas por diferentes observadores.

Sabe-se que a contagem celular na câmara de Neubauer exige capacidade técnica do observador, caso contrário pode levar ao aparecimento de variações nos resultados encontrados. Contudo, verificamos com a análise de dados que as leituras intra e inter-observador (Figura 4 e 5) não apresentaram variações significativas, o que poderia de certa forma interferir nos resultados e na quantidade real de CMN recuperadas após separação e mantidas em cultivo.

4.2 AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO DE CMN

Após a separação das CMN das amostras de sangue heparinizados de 18 doadores sadios por centrifugação em meio gradiente de densidade (Ficoll-paque), foi avaliado o grau de pureza, recuperação e viabilidade celular. Nota-se que o grau de recuperação de células foi aumentando gradativamente durante o experimento apresentando uma variação entre 45 e 88% (média de 75,3 e desvio padrão de 14) (Tabela 2). Dado este que comprova que a habilidade técnica dos pesquisadores em extrair o anel leucocitário do sangue total, bem como as CMN da interfase após centrifugação em meio de gradiente de densidade foi aumentando.

Tabela 2. Análise segundo grau de recuperação, viabilidade, contagem diferencial e grau de pureza, após separação de CMN do sangue venoso de doadores sadios.

Amostra	%	%	%			Grau de Pureza
			Composição Celular por amostra			
	Recuperação de CMN	Viabilidade das CMN	Linfócitos	Monócitos	Polimorfos nucleares	
1	45	>95	61	34	5	95
2	47	>95	60	37	3	97
3	54	>95	65	32	3	97
4	68	>95	67	33	1	99
5	69	>95	74	24	2	98
6	71	>95	68	28	4	96
7	74	>95	67	31	2	98
8	76	>95	88	10	2	98
9	81	>95	66	32	2	98
10	83	>95	75	24	1	99
11	84	>95	82	15	3	97
12	84	>95	73	24	3	97
13	85	>95	77	20	3	97
14	86	>95	73	24	3	97
15	87	>95	71	26	3	97
16	87	>95	72	25	3	97
17	88	>95	66	32	2	98
18	88	>95	66	33	1	99
Média	75,3	-	70,6	26,8	2,5	97,4

Fonte – Pesquisa de Campo - 2011.

Conforme pode ser observado na Tabela 2, obtivemos um percentual de viabilidade celular superior a 95%. A avaliação da viabilidade celular foi realizada por meio do corante azul de tripano, que é muito utilizado para esta finalidade.

A contaminação da amostra por polimorfonucleares foi mínima, pois o grau de pureza obtido após a separação das CMN foi de 95 – 99%, com média de 97.4% (Tabela 2).

4.3 AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE CITOTÓXICA DO VENENO DA *Caudisona durissa collilineata* EM CMN DO SANGUE PERIFÉRICO.

Foi utilizado o veneno liofilizado da espécie de serpente *Caudisona durissa collilineata* com diluição nas concentrações 50µg/mL, 5µg/mL, 0,5µg/mL, 0,05µg/mL, 0,005µg/mL e 0,0005µg/mL para avaliação da citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico. Os testes de cada concentração foram realizados em triplicata. A avaliação da viabilidade celular por exclusão, utilizando o azul de tripano, após 24, 48 e 72 horas de cultivo de CMN com e sem o veneno bruto (Figura 6).

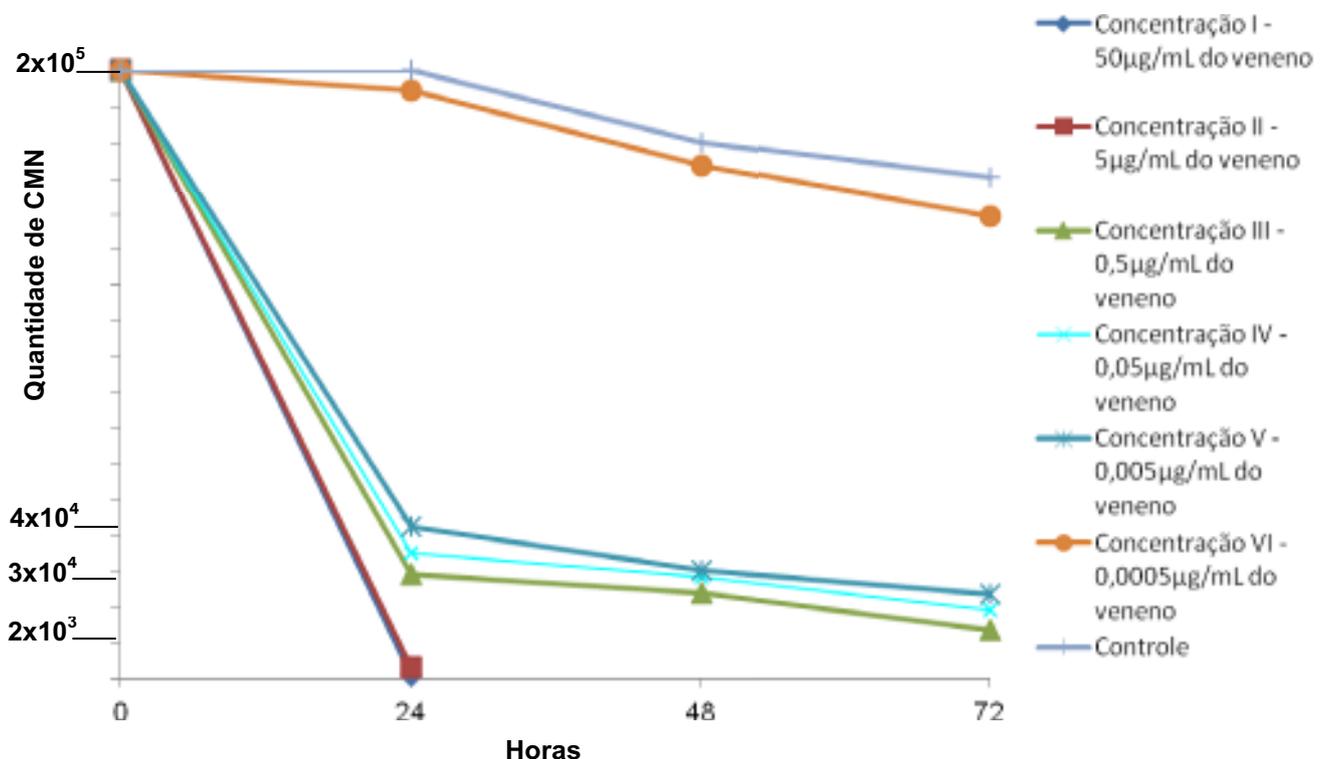


Figura 6 – Avaliação da viabilidade celular por exclusão com azul de tripano após 0, 24, 48 e 72 horas de cultivo de CMN sem e com diferentes concentrações do veneno bruto de *Caudisona durissa collilineata*.

Ao analisar a Figura 6, nota-se que as maiores concentrações (I - 50 μ g/mL e II - 5 μ g/mL) do veneno bruto de *Caudisona durissa collilineata* apresentaram elevada citotoxicidade celular em um período de 24h, com queda rápida da quantidade de CMN (2×10^3). As concentrações III, IV e V, (0,5 μ g/mL, 0,05 μ g/mL, 0,005 μ g/mL) respectivamente, apresentaram citotoxicidade menor, comparadas com as concentrações I e II no mesmo período de tempo. Após 48h e 72h de interação das CMN com o veneno, a contagem celular (concentrações IV e V) revelou concomitantemente a presença de 3×10^4 e 4×10^4 CMN, valor inferior ao inicial, demonstrando desta forma, a atividade citotóxica do veneno, tornando as células totalmente inviáveis. Entretanto, ao analisar a concentração VI do veneno bruto (0,0005 μ g/mL) nota-se que a diminuição de CMN no decorrer do período de 24, 48 e 72h foi significativamente menor se comparada com as demais. Ao término do período (72h), a contagem em câmara de Neubauer das CMN viáveis apresentou pouca variação em detrimento ao valor inicial e ao controle (2×10^5). Assim, pode-se dizer que a concentração de 0,0005 μ g/mL do veneno bruto de *Caudisona durissa collilineata*, neste experimento, apresentou uma baixa atividade citotóxica em CMN de sangue periférico humano.

4.4 AVALIAÇÃO DA POTENCIAL INDUÇÃO DE APOPTOSE DO VENENO EM CMN, *in vitro*.

A análise do DNA de CMN submetidas ao tratamento ou não com diferentes concentrações do veneno bruto de *C. d. collilineata* (50, 5, 0,5, 0,05, 0,005 e 0,0005 μ g/mL) após 1, 3, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação foram realizadas por

meio de eletroforese em gel de agarose. As bandas visualizadas indicaram que não houve fragmentação do DNA das CMN de sangue periférico humano após o tratamento com o veneno em nenhuma das concentrações (Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10, Fig. 11 e Fig. 12).

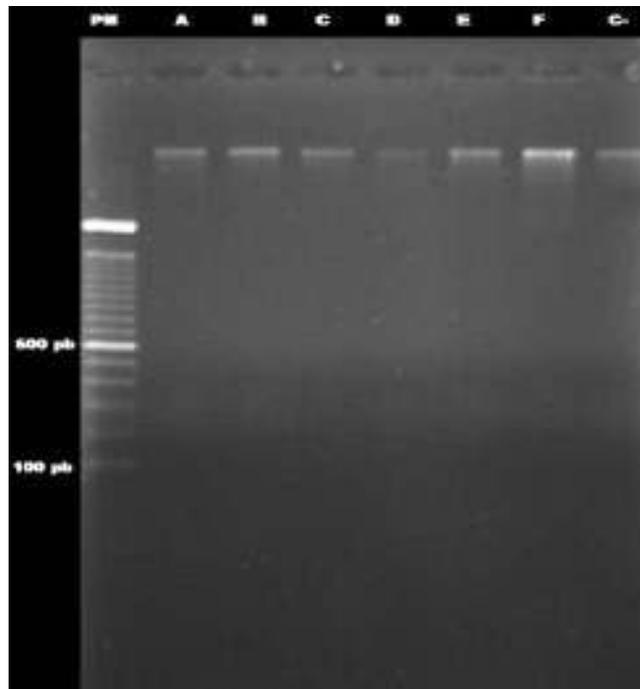


Figura 7. Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após tratamento *in vitro* com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. d. collilineata*. **A.** 1h após tratamento com 50 μ g/mL; **B.** 1h após tratamento com 5 μ g/mL; **C.** 1h após tratamento com 0,5 μ g/mL; **D.** 1h após tratamento com 0,05 μ g/mL; **E.** 1h após tratamento com 0,005 μ g/mL; **F.** 1h após tratamento com 0,0005 μ g/mL. **C.** controle.

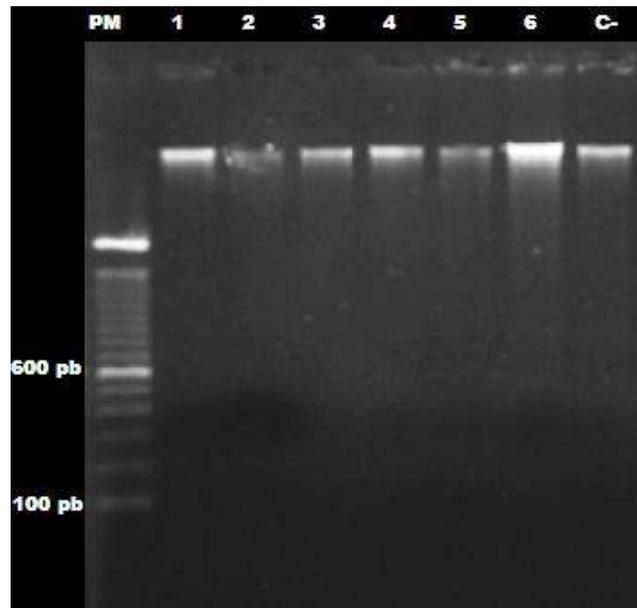


Figura 8. Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após tratamento *in vitro* com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. d. collilineata*. **1.** 3h após tratamento com 50 μ g/mL; **2.** 3h após tratamento com 5 μ g/mL; **3.** 3h após tratamento com 0,5 μ g/mL; **4.** 3h após tratamento com 0,05 μ g/mL; **5.** 3h após tratamento com 0,005 μ g/mL; **6.** 3h após tratamento com 0,0005 μ g/mL. **C.** controle.

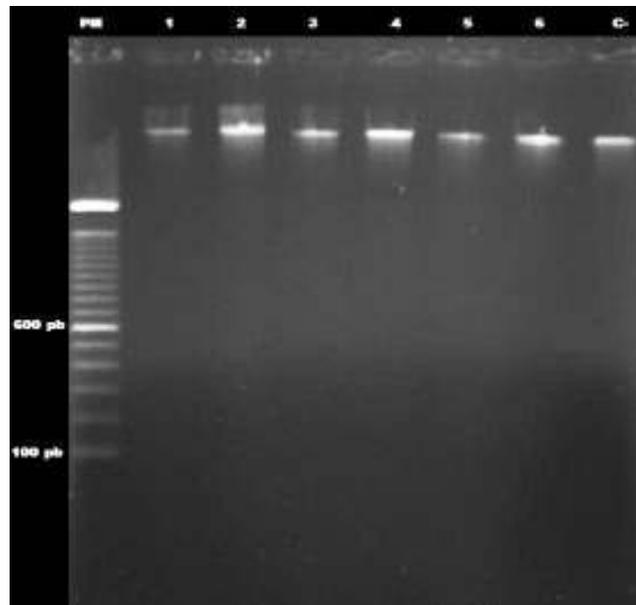


Figura 9. Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após tratamento *in vitro* com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. d. collilineata*. **1.** 6h após tratamento com 50 μ g/mL; **2.** 6h após tratamento com 5 μ g/mL; **3.** 6h após tratamento com 0,5 μ g/mL; **4.** 6h após tratamento com 0,05 μ g/mL; **5.** 6h após tratamento com 0,005 μ g/mL; **6.** 6h após tratamento com 0,0005 μ g/mL. **C.** controle.

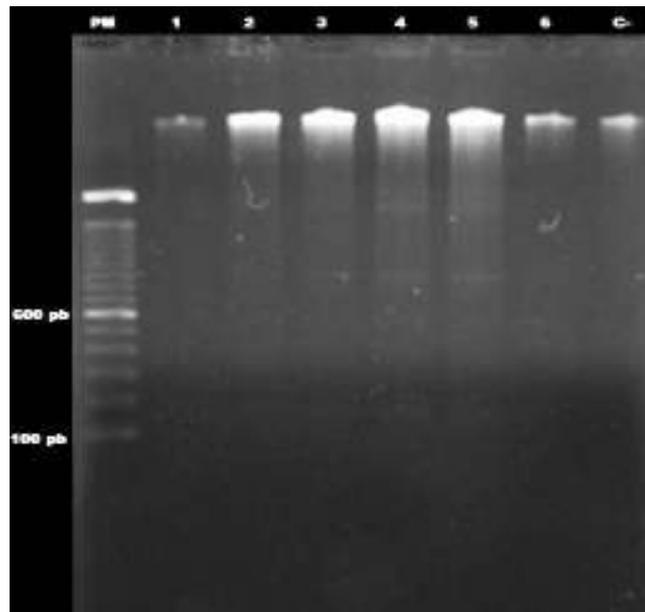


Figura 10. Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após tratamento *in vitro* com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. d. collilineata*. **1.** 24h após tratamento com 50µg/mL; **2.** 24h após tratamento com 5µg/mL; **3.** 24h após tratamento com 0,5µg/mL; **4.** 24h após tratamento com 0,05µg/mL; **5.** 24h após tratamento com 0,005µg/mL; **6.** 24h após tratamento com 0,0005µg/mL. **C.** controle.

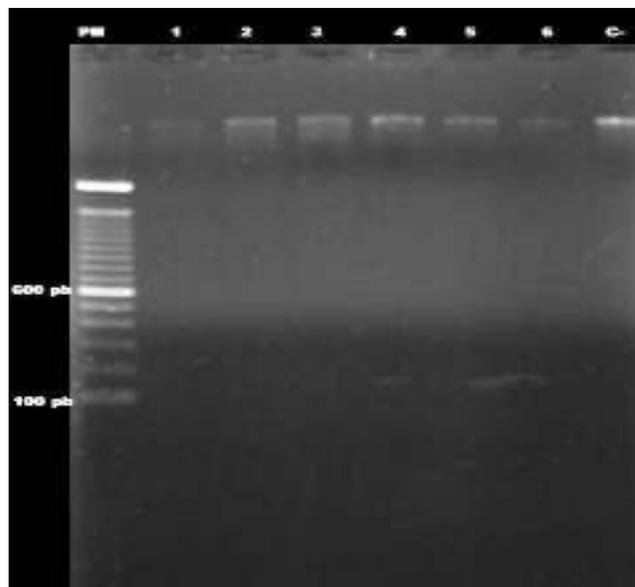


Figura 11. Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após tratamento *in vitro* com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. d. collilineata*. **1.** 48h após tratamento com 50µg/mL; **2.** 48h após tratamento com 5µg/mL; **3.** 48h após tratamento com 0,5µg/mL; **4.** 48h após tratamento com 0,05µg/mL; **5.** 48h após tratamento com 0,005µg/mL; **6.** 48h após tratamento com 0,0005µg/mL. **C.** controle.

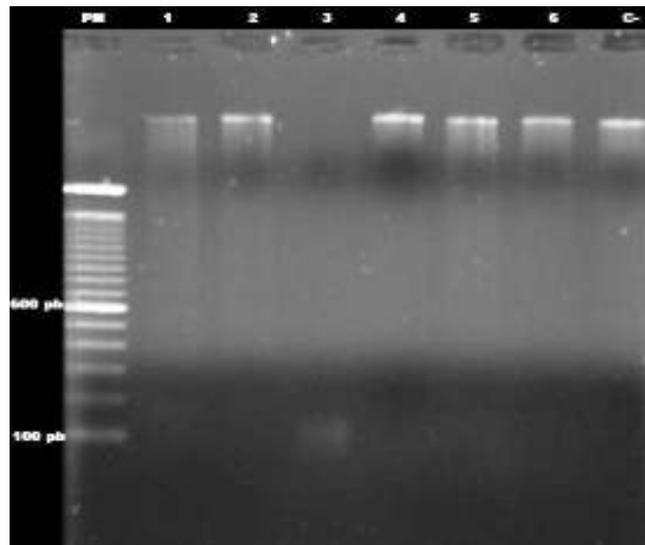


Figura 12. Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após tratamento com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. d. collilineata*. **1.** 72h após tratamento com 50µg/mL; **2.** 72h após tratamento com 5µg/mL; **3.** 72h após tratamento com 0,5µg/mL; **4.** 72h após tratamento com 0,05µg/mL; **5.** 72h após tratamento com 0,005µg/mL; **6.** 72h após tratamento com 0,0005µg/mL. **C.** controle.

5 DISCUSSÃO

Estudos envolvendo proteínas de veneno de serpentes têm sido utilizados como modelos na elaboração de novos fármacos. A atividade biológica do veneno da serpente *Caudisona durissa collilineata* desencadeia uma série de efeitos biológicos que envolvem diretamente componentes do sistema circulatório (MATSUBARA, 2009). Este fato se deve à alta citotoxicidade apresentada pela peçonha, sendo esta definida como a ação capaz de causar a morte celular (NOVAES, 2004).

A análise da citotoxicidade celular constitui-se como um dos melhores métodos para estabelecer a toxicidade de uma determinada substância sobre diferentes tipos de células. Desta forma, recomenda-se primeiramente a realização de testes *in vitro*, para compreensão dos mecanismos envolvidos sobre os tecidos (PURCHASE *et al.*, 1998).

No entanto, poucos estudos na literatura especializada envolvendo a ação da peçonha sobre células mononucleares têm sido realizados. Desta forma, existe a necessidade de determinar o potencial citotóxico do veneno por meio de ensaios *in vitro*, bem como avaliar a potencial indução da fragmentação do DNA celular pelo veneno, em CMN, *in vitro*, para posteriormente realizar testes sobre células infectadas com algum tipo de microorganismo. Essa possibilidade é evidenciada por estudos já realizados onde a peçonha ofídica demonstrou atividade sobre diferentes microorganismos (MAGALDI *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003; PETRICEVICH & MENDONÇA, 2003; VILARRUBIA, 2004; SHINOHARA *et al.*, 2006; RADIS-BAPTISTA *et al.*, 2006; PASSERO *et al.*, 2007; PASSERO *et al.*, 2008; QUEIROZ, 2010; MARCUSSI *et al.*, 2011; MULLER *et al.*, 2011; OGUIURA *et al.*, 2011).

Neste estudo observou-se o fenômeno de citotoxicidade do veneno da serpente *Caudisona durissa collilineata* sobre as CMN de sangue periférico humano *in vitro*. Para a realização do cultivo celular, definiu-se inicialmente a concentração de 2×10^5 células/mL/poço. Esta mesma concentração foi utilizada em estudo realizado por Muller *et al.* (2011), em células VERO, a fim de determinar a atividade antiviral do veneno bruto e toxinas isoladas de *Caudisona durissa terrificus* contra o vírus da dengue e febra amarela; e por Garcia (2003), ao investigar em linfócitos T, o efeito da Crotopotina isolada de *Caudisona durissa terrificus* sobre a evolução clínica da Encefalomielite autoimune.

A influência do veneno sobre a viabilidade celular foi avaliada por contagem das células em câmara de Neubauer, por meio do corante de exclusão *Azul de tripano*. Esta mesma técnica foi utilizada em estudo realizado por Marcussi *et al.* (2011), na avaliação do potencial de efeitos mutagênicos e genotóxicos do veneno de *Caudisona durissa terrificus* e suas toxinas isoladas sobre linfócitos humanos. A citotoxicidade da peçonha desta mesma serpente também foi avaliada utilizando o método de exclusão pelo *Azul de tripano* por Tamietti *et al.* (2007) em linhagem de células derivadas de ovário de hamster chinês (CHO-K1) e na pesquisa de Petricevich & Mendonça (2003) para análise da viabilidade celular de células VERO. Favoretto *et al.* (2011) em sua pesquisa para avaliar os efeitos imunomoduladores do principal componente do veneno de *Caudisona durissa terrificus*, a crotoxina (CTX), sobre a resposta imune de ratos utilizou a mesma coloração para determinação da viabilidade das células. A metodologia e os padrões de viabilidade utilizadas, superiores a 95%, foram semelhantes aos desta pesquisa.

Inúmeros pesquisadores ao trabalhar com cultivo celular utilizam antibióticos, como gentamicina, penicilina e estreptomicina para evitar o crescimento de contaminantes (PONTES, 2006; SOARES, 2007; MARCUSSI *et al.*, 2011). No entanto, nessa pesquisa conseguimos realizar o cultivo celular sem a presença de antibiótico e livre de contaminação. Fato este que torna a utilização de antibióticos dispensável no cultivo celular, reduzindo as chances de ocorrer viés nos resultados. Para Exon *et al.* (1989) a utilização de antibióticos pode interferir na ação dos venenos ofídicos, reduzindo a atividade citotóxica natural.

A citotoxicidade do veneno de *C. d. collilineata*, no presente estudo, foi avaliada em diferentes concentrações e tempos de exposição, por meio de medida da taxa de viabilidade das células expostas. As concentrações I (50µg/mL) e II (5µg/mL) reduziram consideravelmente o número de células viáveis, já nas primeiras 24h de tratamento (Figura 6). Esta queda brusca pode ser justificada pela ação de diferentes toxinas que compõe o veneno bruto, como a crotoxina, crotamina, giroxina, convulxina, serinoproteases e fosfolipases A2 fazendo da peçonha deste gênero a responsável pela maior taxa de letalidade no país entre os acidentes ofídicos, onde a ele atribuí-se 1,8% dos casos, enquanto que todos os outros gêneros somados causam apenas 1,6% (BERCOVICI *et al.*, 1987; OSHIMA-FRANCO *et al.*, 1999; PINHO & BURDMANN *et al.*, 2000). Entre as alterações induzidas pelo veneno de *Caudisona* destacam-se as hematológicas, de coagulação e imunológicas. Algumas frações do veneno de *C. d. terrificus* apresentam efeito estimulatório ou inibitório sobre o sistema imune e respostas inflamatórias (SAMPAIO *et al.*, 2005).

A concentração que apresentou pouca variação na quantidade de CMN quando comparada ao controle nas contagens de 24, 48 e 72h, foi a VI (0,0005 μ g/mL), apresentando assim baixa atividade citotóxica (Figura 6).

A composição química e atividade biológica dos venenos pode variar consideravelmente entre as famílias e gêneros de serpentes. Em um mesmo tipo de veneno, componentes diversos são encontrados de acordo com os fatores ontogenético, sazonal, interpopulacional, intrapopulacional e, ainda, fatores individuais (CHIPPAUX et al., 1991). Estudo realizado por Santoro *et al.*, (1999) demonstrou variabilidade interespecífica sobre *Caudisona durissa terrificus*, *Caudisona durissus cascavella* e *Caudisona durissa collilineata*, o que confirma a existência de variações entre venenos de serpentes da mesma espécie. Rádiz-Baptista *et al.* (2003), confirmam em seu estudo a diferença no gene crotamina nos dois homólogos do cromossomos e que isso possa refletir uma diferença, no número de cópias dos genes entre os cromossomos, uma possível explicação para a variação existente na composição do veneno.

Este fator pode ser observado pelos resultados dos estudos realizados por Riveiro (2010) e Castro (2011), utilizando diferentes concentrações do veneno bruto de serpentes do gênero *Bothrops*, quando comparados aos da presente pesquisa. Ao término dos estudos, identificaram a concentração de 0,05 μ g/mL como sendo a menos citotóxica para as CMN, quando comparada ao controle. Já Stival (2011), identificou além da concentração 0,05 μ g/mL, a concentração 0,5 μ g/mL como sendo a menos citotóxica para as CMN. Diferentemente do presente estudo em que a concentração com menor citotoxicidade foi de 0,0005 μ g/mL. Resultado do estudo realizado por Dobrachinski (2011) utilizando o veneno da *C. d. terrificus*, corroboram

com os achados na presente pesquisa, uma vez que a concentração do veneno utilizada de 0,0005µg/mL sobre CMN foi a que apresentou baixa citotoxicidade.

Essa diferença observada entre espécies e gêneros quanto a toxicidade do veneno, pode estar relacionada com a variação da composição química. Tais variações tem sido demonstradas em diferentes estudos. Furtado *et al.* (2003), referem existir diferença significativa quanto a presença de elementos inorgânicos no veneno de *C.d. cascavella*, uma vez que diferentes amostras do veneno continham variações na concentração de Br, Cl, Mg²⁺ e Zn.

Fagundes *et al.* (2010), ao realizar a purificação da PLA2 do veneno de *C. d. collilineata* a fim de comparar sua estrutura molecular e atividade neurotóxica com os perfis cromatográficos de outros venenos crotálicos, observou que o veneno de *C. d. collilineata* não tem a fração correspondente a crotamina. Referem que a ausência desta toxina se torna interessante pelo fato de ser normalmente encontrada no veneno de *C. d. terrificus*, já que essa toxina é responsável pelas atividades miotóxicas e neurotóxicas (*C. d. terrificus*) e ser responsável por 20% do veneno seco. Os autores sugerem com estes achados que a crotoxina homóloga na *C. d. collilineata*, provavelmente, desempenha um papel importante na neurotoxicidade do veneno.

Estudos experimentais utilizando peçonhas de diferentes espécies de serpentes para o tratamento de tumores têm sido feitos e resultados promissores têm sido encontrados (SOARES, 2007). A citotoxicidade do veneno bruto de *C. d. terrificus* e suas frações sobre células de Carcinoma Epidermóide de Laringe foi avaliada por Novaes (2004). Para tanto, utilizou-se diferentes concentrações do veneno em diferentes períodos de tempo. O veneno bruto foi testado nas

concentrações de 1, 5, 10 e 50µg/mL em um período de 1, 4, 8 e 24h e para suas frações foi testada a concentração de 1µg/mL em 1, 4, 8 e 24h. Em outro experimento, seguindo o mesmo protocolo, só que em concentrações diferentes, utilizou para o veneno bruto as concentrações de 0,5, 1 e 5µg/mL em 24, 48 e 72h. O autor, ainda utilizou as frações com as mesmas concentrações do veneno bruto, porém apenas em 24 e 48h. Desta forma, identificou que o veneno bruto da serpente causou danos celulares irreversíveis em torno de 10% a 20% nas células submetidas ao tratamento, e com as frações do veneno, em aproximadamente 30% a 70% dessas células foi observada morte celular.

Da mesma forma, Soares (2007) pesquisou o efeito antitumoral da peçonha de *C. d. terrificus* e suas frações. Procurou identificar o efeito antitumoral da peçonha sobre linhagens de tumores cerebrais (adenoma de hipófise e glioblastoma em murinos), avaliando a citotoxicidade e inibição da capacidade proliferativa. Ao mesmo tempo procurou avaliar o potencial radiosensibilizador e sua aplicabilidade para detecção de tumor *in vivo*. Identificou que o veneno possui efeito antitumoral para as células estudadas, sendo que as células do adenoma de hipófise (benigno) são mais sensíveis ao efeito antitumoral da peçonha do que as células do glioblastoma (maligno). Observou também, que a crotoxina e a crotamina desempenham papel importante na atividade antitumoral da peçonha, porém não devem atuar isoladamente. Conclui que os resultados indicaram o potencial biotecnológico da peçonha como fonte de moléculas moldes para o desenvolvimento de fármacos e radiofármacos para terapia e/ou diagnóstico do câncer.

Alves (2007) avaliou o efeito de diferentes concentrações da LAAO (5, 10, 25 e 50µg/mL) obtida da peçonha de *Bothrops atrox* sobre diferentes linhagens de

células tumorais (JURKAT - leucemia de células T) e sobre as CMN do sangue periférico humano. Ao término do estudo observou que ao incubar 10µg/mL da *LAAOBatrox* com CMN do sangue periférico humano, obteve uma insignificante atividade citotóxica. Nota-se que a concentração do veneno utilizada no estudo sobre as CMN (10µg/mL) é superior à concentração utilizada neste trabalho o que confirma a variabilidade do veneno entre espécies diferentes.

Estudos utilizando o veneno de serpentes do gênero *Caudisona* sobre diferentes tipos de células, não tumorais, também vem ganhando destaque na literatura científica. Lima (2010) testou três picos do veneno de *C. d. terrificus* obtidos durante a purificação da CTX (pico I; pico II, que corresponde a CTX, e pico III), sobre a atividade fagocítica de neutrófilos. A incubação dos neutrófilos tratados com a CTX ou os picos I ou III em concentrações diferentes (0,02; 0,04; 0,08; 0,16 ou 0,32µg/mL) determinaram que somente o pico II inibiu a fagocitose pelos neutrófilos, determinando assim, que a CTX é o componente do veneno responsável por este efeito. Matsubara (2009) testou o efeito do veneno bruto de *C. d. terrificus* e suas frações (CTX – CA e CB) em células endoteliais. Incubou as células tratando com diferentes concentrações do veneno bruto ou CTX (1, 10 e 100µg/mL) por períodos de 1, 3, 6, 12 e 24h. Identificou que apenas a maior concentração do veneno bruto e a subunidade CB afetaram a viabilidade celular, o metabolismo e a integridade das células. Nas concentrações não citotóxicas, o veneno bruto, a CTX e as subunidades CA e CB não alteram a proliferação das células endoteliais.

Marcussi *et al.*, (2011) avaliaram o potencial efeito mutagênico e genotóxico de *Caudisona durissa terrificus* e suas toxinas isoladas sobre linfócitos humanos. Ao término do estudo confirmaram a importância da crotoxina e da crotopotina como

sendo as principais indutoras de toxicidade e efeitos farmacológicos *in vitro* e *in vivo*, sugerindo que elas sejam os principais componentes genotóxicos no veneno.

Estudo da ação do veneno de *C. d. terrificus* sobre CMN também foi realizado por Bastos (2007). O autor buscou avaliar a capacidade imunomoduladora e a citotoxicidade da Crotapotina. Para tanto, avaliou a citotoxicidade por meio do método de exclusão determinado pelo *Azul de tripano* e como padrão experimental determinou a viabilidade $\geq 90\%$, corroborando com a padronização utilizada nesse estudo. Tratou as CMN com diferentes concentrações das frações Crotapotina e PLA2 (2, 1, 0,5, 0,2 e 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), incubando em 37°C sob atmosfera úmida com 5% de CO₂ por um período de 96h. A inibição da proliferação linfocitária pela ação da crotapotina ocorreu nas concentrações 0,2 e 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, já a PLA2 não demonstrou efeito sobre a proliferação. Não constatou diferenças significativas em relação ao controle de células, determinando que nenhuma das frações provocou morte celular.

O veneno de serpentes é um potente promotor de apoptose (ZINSZNER *et al.*, 1998). O processo de morte celular apoptótico tem sido descrito por vários autores após o tratamento com venenos ofídicos (ALI *et al.*, 2000). Da mesma forma, Samel *et al.* (2006) afirmam que o tratamento de culturas celulares com venenos ofídicos pode causar apoptose ou necrose, dependendo da dose e da duração da exposição.

No presente estudo, foi observado que algumas concentrações utilizadas ocasionaram a morte celular devido à redução do número de células quando comparadas ao controle. A morte celular ocorrida durante o período de incubação nas concentrações citotóxicas não indica um mecanismo de morte celular específica.

Para tanto, a avaliação da potencial indução de apoptose do veneno em CMN, *in vitro*, por diferentes concentrações do veneno bruto de *C. d. collilineata* (50, 5, 0,5, 0,05, 0,005 e 0,0005 μ g/mL) foi verificada. Assim, foi possível perceber que não houve dano ao DNA nuclear decorrente da incubação com o veneno bruto de *C. d. collilineata* em diferentes concentrações e tempos. Este mesmo fenômeno foi observado nos estudos de Rivero (2010), Castro (2011) e Stival (2011), em que os autores, utilizando método semelhante ao utilizado neste estudo, não observaram apoptose no cultivo de CMN em diferentes concentrações do veneno bruto em três diferentes subespécies de *Bothrops*.

Estudo realizado por Alves (2007) mostrou que a LAAO obtida da *Bothrops atrox* também não ocasionou apoptose quando adicionada às CMN, mesmo quando tratada com 50 μ g/mL da enzima. Diferente dos achados no presente estudo, Reis *et al.* (2006) observaram fragmentação do DNA induzida pela ação do veneno bruto de *C. d. terrificus* sobre cultura de células CHO – K1 após 6 horas de incubação. A análise se deu nos períodos de 1, 6 e 12h após tratamento com concentrações variadas (10, 50 e 100 μ g/mL). É importante referenciar que a concentração do veneno utilizada pelos pesquisadores foi significativamente maior se comparada com nosso. Corroborando com os achados de Reis *et al.* (2006), Tamietti *et al.* (2007) observou fragmentação do DNA a partir de 6h decorrentes da ação da peçonha de *C. d. terrificus* sobre linhagens de células CHO – K1 com as mesmas concentrações (10, 50 e 100 μ g/mL). Soares *et al.* (2010) analisaram a ação do veneno da mesma subespécie sobre células de Glioma de ratos (RT2) e adenoma benigno de pituitária (GH3). Após 48h, de incubação, perceberam um aumento significativo do número de células GH3 e RT2 apoptóticas quando tratadas com 5 e

10µg/mL do veneno (± 17 vezes e 3,5 vezes mais do que as células controle, respectivamente).

Já Samel *et al.* (2006) observaram que a LAAO obtida de *Vipera berus berus* não induziu apoptose em células K562 (Leucemia Mielóide Crônica Humana), quando incubadas com baixas concentrações da enzima em um curto período de tempo. Contudo, após 24 horas de incubação com a mesma concentração inicial, pode-se observar a indução de apoptose. A mesma enzima, porém, obtida da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*, na concentração de 25µg/mL, foi incubada com células HL-60 (Células derivadas de leucemia pró-mielocítica) e após 24 horas de incubação foi observada a fragmentação do DNA sugerindo a indução de apoptose por essa enzima (SOUZA *et al.*, 1999). Burin (2011) avaliou o efeito do veneno bruto da peçonha de *Bothrops pirajai* em diferentes concentrações (0,05 - 0,1 - 0,5 - 1 - 5 - 7,5 - 10 - 25 - 50 e 100µg/mL) também sobre células HL-60. As células foram cultivadas por períodos de 12 e 18 horas na ausência e na presença do veneno bruto. Observou que o veneno bruto foi capaz de induzir a apoptose em células HL-60 a partir da concentração de 0,1µg/mL, porém, somente nas concentrações de 7,5 - 10 - 25 - 50 - 100µg/mL que se pode observar um perfil dose dependente do veneno quanto a indução da apoptose. Levando em consideração o tempo de incubação, a morte celular foi maior nas concentrações de 10 a 100µg/mL do veneno por 18 horas. Vale ressaltar, que as células utilizadas no cultivo celular, bem como o método utilizado pelos autores na avaliação de apoptose, diferem dos utilizados neste estudo.

Segundo Walker & Gaastra (1983) e Platel (1994), uma das características bioquímicas da apoptose é a clivagem internucleossômica do genoma, que pode ser

reconhecida pelo clássico "padrão em arraste", por meio da eletroforese em gel de agarose, o que não estiveram presentes na eletroforese realizada nesse estudo, onde foram testadas seis concentrações do veneno bruto de *C. d. collilineata*.

No entanto, vale ressaltar, ser crucial empregar dois ou mais ensaios distintos para confirmar que a morte celular está ocorrendo por meio de apoptose. Além disso, certos ensaios podem ser adequados para células de cultura, mas inadequado para investigar a apoptose em secções de tecidos. Portanto, ao escolher os métodos de detecção de apoptose em células, tecidos ou órgãos, devemos entender os prós e contras de cada ensaio (SCHULZE-OSTHOFF, 2008).

6 CONCLUSÕES

- ❖ A avaliação da associação inter e intra-observador apresentaram associações fortes e altamente significativas, ou seja, houve associação entre as variáveis indicando que não ocorreu diferença significativa entre as leituras.
- ❖ Os testes de viabilidade celular *in vitro* desenvolvido neste estudo demonstram que o veneno bruto de *C. d. collilineata* apresentou alta toxicidade sobre as CMN.
- ❖ A citotoxicidade do veneno bruto de *C. d. collilineata* varia de forma proporcional à concentração, ou seja, quanto maior a concentração do veneno, maior a sua citotoxicidade.
- ❖ A concentração de 0,0005µg/mL do veneno bruto de *Caudisona durissa collilineata*, neste experimento, apresentou uma baixa atividade citotóxica em CMN de sangue periférico humano.
- ❖ A fragmentação do DNA celular induzida pelo veneno bruto não foi visualizado neste estudo. Sugere-se empregar dois ou mais ensaios distintos para confirmar se a indução da morte celular está ocorrendo por meio de apoptose ou necrose.

REFERÊNCIAS

ABU-SINNA, G.; ESMAT, A. Y., AL-ZAHABY, A. S.; SOLIMAN, N. A., IBRAHIM, T. M. Fractionation and characterization of *Cerastes cerastes cerastes* snake venom and antitumor action of its lethal and non-lethal fractions. **Toxicon**. (42): 207-215, 2003.

AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**. (40): 335 – 393, 2002.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 1997.

ALEXANDER, G; GROTHUSEN, J; ZEPEDA, H; SCHWARTZMAN, R. J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**. (26): 953 – 960, 1988.

ALI, S.; STOEVA, S.; ABBASI, A., ALAM, J. M., KAYED, R.; FAIGLE, M.; NEUMEISTER, B., VOELTER, W. Isolation, structural Biophys and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. **Arch Biochem Biophys**. 384(2): 216 – 26, 2000.

ALVES, R. M de. **Isolamento e Caracterização Bioquímica e Funcional de L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops atrox***. 2007. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Universidade de São Paulo - RIBEIRÃO PRETO, SP, 2007.

AMARAL, M. S. P.; RAHAL, S. C.; DAL-PAI, V.; BARRAVIERA, S. R. C. S.; LIMA, A. F. M.; CROCCI, A. J. Fixation of full-thickness mesh skin using suture or fibrin glue. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. 56 (3): 312 – 319, 2004.

AMORA, D. N., SOUSA, T. M., MARTINS, A. M. C., BARBOSA, P. S. F.; MAGALHÃES, M. R., TOYAMA M. H.; FONTELES, M. C.; MENEZES, D. B. DE, MONTEIRO, H. S. A. Effects of *Crotalus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon**. (47): 260 – 264, 2006.

APOPTOSIS AND CELL PROLIFERATION. 2 ed. Mannheim: Boehringer. p.125, 2007. Disponível em:
(http://biochem.roche.com/prod_inf/manuals/cell_man/cell_toc.html).

AUTO, H. J. F. **Animais Peçonhentos**. 2ª ed. revisada e ampliada. Maceió: EDUFAL, 2005.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. In: CARDOSO J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F.; MÁLAQUE, S.; HADDAD JUNIOR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil, Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2ª ed. São Paulo: Sarvier, 2009.

BARRAVIERA, B. Estudos Clínicos de Acidentes Ofídicos. Revisão. **Jornal Brasileiro de Medicina**. 65 (4): 209 – 250, 1993.

BARRAVIERA, B. Animais peçonhentos de importância médica no Brasil/ Venomous animals with medical importance in Brasil. **J. Bras. Med**; 68(1/2): 121-126, Jan/Fev. 1995.

BARRAVIERA, B; FERREIRA, R. S. J. **Acidentes ofídicos**. In: FOCACCIA, R. V: **Tratado de Infectologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu. 2005. Cap. 126, p. 1929 – 47. v. 2.

BASTOS, M. L. **Ação in vitro da Neuwiedase sobre a infecção por T. gondii em fibroblastos humanos e na produção de mediadores inflamatórios por células mononucleares do sangue periférico humano**. 2008, f. 116. Dissertação

(Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia – MG.

BEGHINI, D. G. **Isolamento e purificação de uma neurotoxina crotoxina do veneno de *Crotalus durissus cascavella*: caracterização bioquímica e biológica.** 2001. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Unicamp, Campinas – SP. 2001.

BERCOVICI, D. A. Systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mem. Inst. Butantam**, 49 (3): 69-78, 1987.

BOISBOUVIER, J.; ALBRAND, J. P.; BLACKLEDGE, M.; JAQUINOD, M.; SCHWEITZ, H.; LAZDUNSKI, M.; MARION, D. A structural homologue of colipase in black mamba venom revealed by NMR floating disulphide bridge analysis. **J Mol Biol**; 283 (1): 205 – 19, 1998.

BON, C., BOUCHIER, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M.S.; LAMBEZAT, M. P.; RADVANYI, F.; SALIOU, B. Crotoxin, half-century of investigation on a phospholipase A₂ neurotoxin. **Acta Phys. Pharm. Lat.** (39): 439 – 448, 1989.

BON, C., BOUCHIER, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M.S.; LAMBEZAT, M. P.; RADVANYI, F.; SALIOU, B. Biochemical analysis of the mechanism of action of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from snake venom. In: DOLLY, O. J. (Ed.). **Neurotoxins in Neurochemistry.** Chichester: Ellis Horwood, 1988. P. 52 – 63.

BORCOW, G.; OVADIA, M. Selective Lysis of Virus-Infected Cells by Cobra Snake Cytotoxins: A Sendai Virus, Human Erythrocytes, and Cytotoxin model. **Biochem and Biophys Res Commun**; (264): 63 – 8, 1999.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Diagnóstico e tratamento d acidentes ofídicos. Edição Revisada, 1ª Reimpressão. Normas e manuais técnicos, Brasília,

1991. Model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 264:63-68.

BUDIHARDJO, I; OLIVER, H; LUTTER, M; LUO, X; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol**. 1999; 15: 269-90.

BURIN, S. M. **Efeito do veneno bruto e da L-aminoácido oxidase de Bothrops pirajai em células Bcr-Abl positivas**. 2011. 71 f. DISSERTAÇÃO (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto, 2011.

CALKOSINSKI, I., SEWERYN, E.; ZASADOWSKI, A., MAŁOLEPSZA-JARMOŁOWSKA, K., DZIERZBA, K., BRONOWICKA-SZYDEŁKO, A., MIERZCHAŁA, M., CEREMUGA, I., ROSIŃCZUK-TONDERYS, J., DOBRZYŃSKI, M., GAMIAN, A. The composition, biochemical properties and toxicity of snake venoms. **Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej**. 28 (64): 262 – 72. May, 2010.

CALVETE, J.J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **J. Mass Spectrom**, (42): 1405-14, 2007.

CAMARGO, A. C. R. S. The snake venom and the 50th anniversary of bradykinin discovery. **Ciência e Cultura**, 51(5/6): 429 – 435, 1999.

CAMILLO, M. A. P.; PAES, P. C. A.; TRONCONE, L. R. P.; ROGERO, J. R.. Gyroxin fails to modify in vitro release of labeled dopamine and acetylcholine from rat and mouse striatal tissue. **Toxicon**. (39): 843-853, 2001.

CARDOSO J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F.; MÁLAQUE, S.; HADDAD JUNIOR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil, Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2ª ed. São Paulo: Sarvier, 2009.

CARDOSO J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F.; MÁLAQUE, S.; HADDAD JUNIOR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil, Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: Sarvier, p. 6 – 12, 2003.

CASTEDO, M; PERFETTINI, J.L, ROUMIER, T; ANDREAU, K; MEDEMA, R; KROEMER, G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**. 2004; 23:2825-837.

CASTRO, F. O. F. de. **Avaliação da atividade não citotóxica do veneno da Cobra *Bothrops pauloensis* em células Mononucleares do sangue periférico humano**. 2011. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) Pontifícia Universidade Católica de Goiás, GO, 2011.

CHEN, T.; BJOURSON, A. J.; ORR, D. F.; KWOK, H.; RAO, P.; IVANYI, C.; SHAW, C. Unmasking venom gland transcriptomes in reptile venoms. **Anal. Biochem.** (311): 152-156, 2002.

CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenos and immunotherapy. **Toxicon**, 36 (6): 823 – 843, 1998. Review.

CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**. 29 (11): 1279-1303, 1991.

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D.; PIZZOFERRATO, A. **Biomaterials**, v. 17, p. 1259-64, 1996.

DANIAL NN, KORSMEYER SJ. Cell death: critical control points. **Cell**. 2004; 116: 205-19.

DA SILVA, C. J.; JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. **Toxicon**. 41 (2): 251 – 255, 2003.

DE BEM NETO, G. SERPENTES. Agudos (SP): [s.n], 2001. [Apostila].

DEOLINDO, P. TEIXEIRA-FERREIRA, A. S.; MELO, E. J. T.; ARNHOLDT, A. C. V.; SOUZA, W. DE; ALVES, E. W.; DAMATTA, R. A. Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, 100 (1): 2005.

DESAGHER, S; MARTINOU, J.C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol.** 2000;10:369-76.

DOBRACHINSKI, L. **Avaliação da potencial atividade citotóxica da peçonha de *Caudisona durissa terrificus* em células mononucleares do sangue periférico humano.** 2011, 114f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia, 2011.

EXON; J.H.; STEVENS, M. G.; KOLLER, L. D.; MATHER, G. G. Immunotoxicity assessment of gentamycin and liquamycin. **Vet Hum Toxicol.** 31(5): 427 – 30, 1989.

FAGUNDES, F. H. R.; OLIVEIRA, M.; HUANCAHUIRE-VEJA, S.; ROMERO-VARGAS, F. F.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S. DNA and deduced primary structure of basic phospholipase A2 with neurotoxic activity from the venom secretion of the *Crotalus durissus collilineatus* rattlesnake. **Braz J Med Biol Res.** 43 (3): 262 - 270, March, 2010.

FAVORETTO, B. C., RICARDI, R., SILVA, S. R., JACYSYN, J. F., FERNANDES, I., TAKEHARA, H. A., FAQUIM-MAURO, E. L. Immunomodulatory effects of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice immunised with human serum albumin. **Toxicon**, 57 (2011) 600–607.

FENARD, D.; LAMBEAU, G.; MAURIN, T.; LEFEBVRE, J.C & DOGLIO, A. A Peptide Derived from Venom-Secreted Phospholipase A2 Inhibits Replication of T-cell Tropic

HIV-1 Strains via Interaction with the CXCR4 Chemokine Receptor. **Mol Pharmacol.** 60 (2): 341 – 347, 2001.

FIDALGO, T. K. S.; BARCELOS, R. PETRÓPOLIS, D. B.; ZEVEDO, B. R.; PRIMO, L. G.; SILVA FILHO, F. C. Citotoxicidade de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio sobre osteoblastos humanos. **RGO**, Porto Alegre, v. 57, n.3, p. 317-321, jul./set. 2009.

FOX, J.W & SERRANO, S.M Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon.** (45): 969 – 985, 2005.

FRANÇA, B., J. **Transcriptoma da glândula de peçonha de *Crotalus durissus collilineatus***: análise do perfil de expressão gênica. 2008, 66 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia. MG, 2008.

FRANÇA, J. B.; RODRIGUES, R. S.; FONSECA, F. P. P.; MENALDO, D. L., FERREIRA, F. B., HENRIQUE-SILVA, F., SOARES, A. M., HAMAGUCHI, A, RODRIGUES, V. M., OTAVIANO, A. R., HOMSI-BRANDEBURGO, M. *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: Analysis of gene expression profile. **Biochimie.** (91): 586 – 595, 2009.

FRANCISCHETTI, I.M.B., GOMBAROVITS, M.E, VALENZUELA, J.G, CARLINI, C. R, GUIMARÃES, J. A. Intraspecific variation in the vnomes of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** 127 (1): 23 – 36, 2000.

FRANCO, F. L. Origem e Diversidade das Serpentes. In: CARDOSO J. L. C. *et al.* **Animais Peçonhentos no Brasil, Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes.** 2ª ed. Ed. São Paulo: Sarvier, 2009.

FREITAS, T. V. Veneno de cobra contra o câncer. Bem Estar & Saúde. **Jornal de Brasília**. 2006. Disponível em: <http://www.saude.df.gov.br/003/00301009.asp?ttCD>. Acessado em 04/07/2011.

FUNK, C.; GMUR, J.; HEROLD, R. & STRAUB, P. W. Reptilase – R a new reagent in blood coagulation. **British Journal of Haematology**. (21): 43 – 52, 1971.

FURTADO, M. F. D.; SANTOS, M. C.; KAMIGUTI, A. S. Age-related biological activity of South american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis**. 9 (2): 1 – 9, 2003.

GARCIA, E. S. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. **Cad. Saúde Públ.** 11(3): 495 – 500, Jul/Set, RJ, 1995.

GARCIA, F. **Efeito de uma fração derivada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* na evolução clínica da encefalomielite experimental auto-imune e na ativação dos linfócitos T**. 2003, 54 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de Campinas – UNICAMP, Campinas – SP, 2003.

GATTI, M., A., N. **Tratamento de úlceras venosas com adesivo cirúrgico derivado do veneno da serpente**. 2009, 109 f. Tese (Doutorado em doenças tropicais) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista. SP, 2009.

GAWADE, P.S. Therapeutic alternatives from venoms and toxins. **Indian Journal of Pharmacology**. (39): 260 – 264, 2007.

GONÇALVES, A. R. SOARES, M. J., SOUZA, W., DAMATTA, R. A.; ALVES, E. W. Ultrastructural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Parasitology Research**, Berlin. 88 (7) Jul, 2002.

GOPALAKRISHNAKONE, P. Anais da Academia Brasileira de Ciências. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon**, Elmsford, (22): 85-98, 1984.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B.; PAGOTTO, C. L. A. C., ZOCHER, D. H. T. Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro, 3 (2): 1998.

GRAHAM, R. L. J.; GRAHAM, C., THEAKSTON, D., MCMULLAN, G., SHAW, C. Elucidation of trends within venom components from the snake families Elapidae and Viperidae using gel filtration chromatography. **Toxicon**. (51): 121 – 129, 2007.

GUIMARÃES, Benemar. **Serpentes: Escorpiões e Aranhas**. Ed. ESPE-Estudo e Pesquisa Editora Limitada: São Paulo, 1979.

HABERMANN E.; BREITHAUPT, H. The crotoxin complex- an example of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon**. (16): 19-30, 1978.

HAWGOOD, B. J. Crotoxin, the phospholipase A₂ neurotoxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Mem. Inst. Butantan**. (52): 21-22. 1990.

HERNANDEZ, P. G., REY L., HERNADEZ H., VALERO N., CENDALI G., AÑEZ M. F., ALVARADO M. **Contribucion al estudio sobre los efectos antineoplasicos del complejo crotoxina A-B y cobramina (CFA) en sarcomas de rata**. Congresso latino americano de herpetologia, 3, 1993, São Paulo. Anais ... Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1993.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**. 2000; 407:770-76.

HICKMAN, Jr., ROBERTS, C. P., LARSON, I.S., Allan. **Princípios Integrados de Zoologia**. 11ª ed. Ed. Guanabara – Koogan: Rio de Janeiro, 2004.

IANNI, A. M. Z. Biodiversidade e Saúde Pública: questões para uma nova abordagem. **Saúde e Sociedade**. 14 (2): 77 – 88, maio-ago, 2005.

INTERNATIONAL STANDARD: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods. ISO 10993-5, 1992.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. & HO, P. L. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequences tags (ESTs). **Gene**. 299(1-2): 279-91, 2002.

JUNQUEIRA, M. R., **Aplicação de técnicas proteômicas na caracterização do veneno da serpente *Bothrops insularis* (Viperidae)**. 2005, 73 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz. RJ, 2005.

KARALLIEDDE, L. Animal toxins. **Brit. Jour. of Anaest.** (74): 319-327, 1995.

KALDAHL WB, JOHNSON GK, PATIL KD, KALKWARF KL. Levels of cigarette consumption and response to periodontal therapy. **J Periodontol**. 1996; 67 (7): 675-81.

KELEKAR A. Autophagy. **Ann NY Acad Sci**. 2005; 1066: 259-71.

KOUYOUMDJIAN J. A.; HARRIS, J. B.; JOHNSON, M. A. Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxina. **Toxicon**. (24): 575-581, 1986.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Bases Patológicas das Doenças**. Ed. 7, Editora Elsevier, Rio de Janeiro: 2005.

LEE, M. L.; TAN, N. H.; FUNG, S. Y., SEKARAN, S. D. Antibacterial action of a heat-stable form of L-amino acid oxidase isolated from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.** (153): 237-242, 2011.

LÈVÊQUE, C. **A biodiversidade.** Bauru: EDUSC, 1999.

LIMA, T. S. **Caracterização das ações do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre funções de neutrófilos.** Apostila. s/n. São Paulo, 2010.

LIPPS, B. V. **Selective cytotoxic activity of snake venom proteins, atropin and kaotree on various types of cancer cells.** World congress on animal, plant and microbial toxins, 11, Tel Aviv, 1994. **Abstracts...** Tel Aviv: International Society on Toxinology, 1994.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews,** Washington, (98): 637-674, 1998.

LONNROTH, E. C; DAHL, J. E. Cytotoxicity of liquids and powders of chemically different dental materials evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. **Acta Odontol Scand.** 2003; 61(1): 52-6.

LUM, J.J.; DEBERARDINIS, R.J.; THOMPSON, C. B.; Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2005; 6: 439-48.

MAGALDI, S.; GIRÓN, M.; AGUILAR, E.I.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A. Antifungal activity of *Crotalus durissus cumanensis* venom. **Mycoses.** 45 (1-2): 19-21, 2002.

MANCIN, A. C. The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. **Toxicon.** (36): 1921-1937, 1998.

MARCUSSI, S., et al. Isolamento e Caracterização Funcional de uma L-Aminoácido Oxidase do veneno de *Bothrops moojeni* com atividades bactericida. **BioVenom**, 2004.

MARCUSSI, S., SANTOS, P. R. S., MENALDO, D. L., SILVEIRA, L. B., SANTOS-FILHO, N. A., MAZZI, M. V., SILVA, S. L., STÁBELI, R. G., GREGGI ANTUNES, L. M., SOARES, A. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. **Mutation Research**. (724): 59– 63, 2011.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, 36(12): 1749-1800, 1998.

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, (45):1171-1181, 2005.

MARTINS M & MOLINA B. F. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção** Volume II. Ministério do Meio Ambiente – MMA. Biodiversidade 19. Brasília, DF - 2008 p. 327-373.

MATSUBARA, M. H. M. **Efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, da crotoxina e de suas subunidades fosfolipases A2 e crotapotina em monocamadas de células endoteliais em cultura**. 2009, 106f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Butantan, São Paulo, 2009.

MEENAKSHISUNDARAM, R.; SWENI, S. & THIRUMALAIKOLUNDUSUBRAMANIAN, P. Hypothesis of snake and insect venoms against Human Immunodeficiency Virus: a review. **Aids Research and Therapy** 6:25-29. 2009.

MELGAREJO, A. R. **Serpentes Peçonhentas do Brasil**. In: CARDOSO J. L. C. *et al.* Animais Peçonhentos no Brasil, Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. 2ª ed. Ed. Sarvier: São Paulo, 2009.

MOOI, W. J, PEEPER, D. S. Oncogene-induced cell senescence - halting on the road to cancer. **N Engl J Med**. 2006; 355: 1037-46.

MOTTA, D. **Veneno de serpentes tem substância ativa contra o câncer**. 2009. Disponível em: <http://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=veneno-de-serpentes-tem-substancia-ativa-contr-o-cancer&id=3939>. Acessado em 05/07/2011.

MULLER, V.D.M., RUSSO, R. R.; CINTRA, A. C. O., SARTIM, M. A., ALVES-PAIVA, R. M., FIGUEIREDO, L. T. M., SAMPAIO, S. V., AQUINO, V. H. Crotoxin and phospholipases A2 from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. doi:10.1016/j. **Toxicon**. 1 – 9, 2011.

MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., FONSECA, G. A. B. DA; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403:853-858, 2000.

NOGUEIRA, C. New records of squamate reptiles in Central Brazilian Cerrado II: Braspília region. **Herp. Rev.** 32: 285-287, 2001.

NOVAES, M. F. **A ação do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em cultura de células neoplásicas**. 2004, 83 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Pesquisa e desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba: UNIVAP, São José dos Campos. 2004.

NOVAIS, C. M. PUJATTI, P.B., CASTRO, M.A.S., SOARES, M.A., DE LIMA, M.E., SIMAL, C., GOUVÊA DOS SANTOS, R. 99 mTc radiolabeling of crotoxin as a tool for biodistribution studies. **J. Radio. Nucl. Chem.** (269): 591-595, 2006.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M., AFFONSO, R.; GUOLONG, Z. Atividades antibacterianas e hemolíticas in vitro da crotamina, uma pequena miotoxina básica de cascavel *Crotalus durissus*. **Jornal de antibióticos** (64): 327-331, Abril. 2011.

OKADA H, MAK TW. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**. 2004; 4: 592-603.

OLIVEIRA, D., G., L. **Purificação e caracterização de proteínas que interferem na cascata de coagulação sangüínea**. 2006. 74f. Dissertação (Mestrado em biofísica molecular) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto, 2006.

OLIVEIRA, M. D. B. **Aplicação do adesivo de fibrina derivado de veneno de serpente para imobilização de enxertos gengivais livres: estudo clínico e histológico**. 2001. 172p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo – USP, Bauru – SP.

OLIVEIRA, D.G, TOYAMA, M. H., MARTINS, A. M. C., HAVT, A., NOBRE, A. C. L., MARANGONI, S., CAMARA, P. R., ANTUNES, E., NUCCI, G.; BELIAM, L. O. S., FONTELES, M. C., MONTEIRO, H. S. A. Structural and biological characterization of a crotapotin isoform isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**. (42): 53–62, 2003.

OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G.B.; SILVA, G.H.; CARDOSO, D.F.; HYSLOP, S.; GIGLIO, J.R.; DA CRUZ-HOFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South-American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxin. **Toxicon**. (37): 1341-57, 1999.

PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M.D.; TOMOKANE, T.Y.; CORBETT, C.E.; TOYAMA, M.H. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. Venoms. **Parasitology Research**. 101 (5): 1365-1371. 2007.

PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M.D.; TOMOKANE, T.Y.; CORBETT, C.E.; TOYAMA, M.H. The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania amazonensis* infection. **Parasitology Research**. (102): 1025 – 1033, 2008.

PETRICEVICH, V. L.; MENDONÇA, R. Z. (2003). Inhibitory potential of *Crotalus durissus terrificus* venom on measles virus growth. **Toxicon**. 42(2):143-53.

PINHO, F. M.; PEREIRA, I. D. Snake Bites. **Rev Assos Med Bras**. 47(1): p. 24-9. 2001.

PINHO, F. M. O.; OLIVEIRA, E.S.; FALEIROS, F. Acidente ofídico no estado de Goiás. **Rev. Assoc. Med. Bras**. 50 (1): 1-10. 2004.

PINHO, F. M. O.; BURDMANN, E. A. Atualização em insuficiência renal aguda: Insuficiência renal aguda após acidente crotálico. **Jornal Brasileiro de Nefrologia-artigo de atualização**, 22 (3): 162 – 168, 2000.

PLATEL, D. **Gel electrophoresis**; essential data. Chichester: John Wiley & Sons; 136p. 1994.

PRADO-FRANCESCHI, J.; VITAL-BRAZIL, O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, (19): 875 – 887, 1981.

PONTES, C. L. S. **Otimização da purificação e caracterização adicional de uma desintegrina – RGD recombinante de *Bothrops alternatus* e seu efeito em células endoteliais humanas**. 2006, 140f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

PONS, A. H.; PINTO, L.M.O.I. **Citotoxicidade na doença de Chagas**. Acessado em 09.02.2011. Disponível em:

<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=166>

PORTH, C. M. **Fisiopatologia**. 6ª Edição, Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro – 2004.

PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P. A., BRUNER, L. H., FLINT, O. P., FRAZIER, J. M., STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing.

Toxicological Science; 43(2):86-101. (1998).

QUEIROZ, S. J. **Identificação da atividade antimicrobiana no veneno da serpente *Bothrops moojeni* em bactérias gram negativas**. 2010. 93f. Dissertação (mestrado em ciências ambientais e saúde). Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2010.

RADIS - BAPTISTA, G.; MORENO, F. B. ; LIMA NOGUEIRA, L.; MARTINS, A. M.; OLIVEIRA TOYAMA D.; TOYAMA, M. H.; CAVADA, B. S.; AZEVEDO JR., W. F.; YAMAME, T. Crotaetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. ***Cell Biochem Biophys***. 44(3):412-423. 2006.

RAMOS, O. H. P. **Produção de uma pró-metaloproteinase recombinante em bactéria, ativação in vitro e modelagem molecular**. 2001, f. 147. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos – UFSC, São Carlos – SP, 2001.

REIS, N. L.; COSTA, M. M.; SOARES, C. P. Avaliação do processo apoptótico induzido por veneno de serpentes em células CHO-K1. **X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós – graduação** – Universidade do Paraíba. p. 2165 – 2167, 2006.

RIVERO, J. V. R. **Avaliação da atividade não citotóxica do veneno de *Bothrops jararacussu* em células mononucleares do sangue periférico.** 2010. 11f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) Pontifícia Universidade Católica de Goiás, GO, 2011.

RODRIGUES, S. R.; DA SILVA, J.F.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F.P.; OTAVIANO, A.R.; SILVA, H.F.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A.J.; BRAZ, A.S.; DOS SANTOS, J.I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; FONTES, M.R.; FULY, A.L.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochemie** (91):490-501. (2008).

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Mat. Res.* 6 (3): São Carlos Apr./June 2003.

SALVINI, T. F.; AMARAL, A.C.; MIYABARA, E.H.; TURRI, J.A.O.; DANELLA, P.M.; SELISTRE DE ARAÚJO, H.S. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. **Toxicon.** (39): 1141-1149. 2001.

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** (1764): 707 - 714, 2006.

SAMPAIO, S. C.; RANGEL-SANTOS, A.C.; PERES, C.M.; CURI, Y. Inhibitory effect of phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. **Toxicon** (45): 671 – 676. 2005.

SANTORO, L.M.; SOUSA-E-SILVA, M.C.C.; GONÇALVES, L.R.C.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; CARDOSO, D.F.; LAPORTA-FERREIRA, I.L.; SAIKI, M.; PERES,

C.A.; SANO-MARTINS, I.S. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascabela* and *C. durissus collilineatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, 122 (1999) 61–73.

SANTOS, M. C.; GONÇALVES, L.R.C.; FORTES-DIAS, C.L., CURY, Y. GUTIÉRREZ, J.M.; FURTADO, M.F.D. A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops Jararacussu*. **Mem. Inst. Méd. trop. São Paulo**. (32): 77- 83, 1992.

SANTOS, A. R.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**. (44): 609 – 616, 2004.

SANTOS, A. S. R. dos. **Biodiversidade, Bioprospecção, Conhecimento Tradicional e o Futuro da Vida**. 2010. Disponível em: <http://www.ccuac.unicamp.br/revista/infotec/artigos/silveira.html>.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res**. 2000;45:528-37.

SCHULZE-OSTHOFF, K. How cells die: Apoptosis and other cell death pathways. In: **Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation Manual**. 4 th edition, Germany: Roche, 2008.

SEKI, C.; VIDAL, J.C.; BARRIO, A. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, 18 (3): 235-247, 1980.

SHERMAN, D. G.; ATKINSON, R.P.; CHIPPENDALE, T.; LEVIN, K.A.; NG, K.; FUTRELL, N.; HSU, C.Y.; LEVY, D.E. Intravenous Ancrod for Treatment of Acute Ischemic Stroke: The STAT Study: A Randomized Controlled Trial. **Journal of the American Medical Association**. 283(18):2395-2403, 2000.

SHINOHARA, L.; DE FREITAS, S.F.; DA SILVA, R.J.; GUIMARÃES, S. In vitro effects of *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* venoms on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Parasitology Research**. 98 (4): March, 2006.

SIERRA, M. C. M. & PÉREZ, M. B. Serpientes exóticas: nueva moda, nueva urgência. **Medicina Intensiva**, 25(2):66-75, 2001.

SILVA, Marina. *Prefácio*. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1. ed. Volume I. Ministério do Meio Ambiente – MMA. Biodiversidade 19. Brasília, DF – 2008.

SILVA, R. M. L.; YUKARI F.M.; CASAIS-E-SILVA, L.L.; ULLOA,J.; HAMDAN,B.; BRAZIL, T.K. Serpentes de importância médica no nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**; 79 (1): 7 – 20, 2009.

SILVA, R.J.; SILVA, M.; VILELA, L.; FECCHIO, D. Cytokine profile of Ehrlich ascites tumor treated with *Bothrops jararaca* venom. **Mediators Inflamm**. (11): 197-201, 2002.

SILVA, S. H. O. **Efeito farmacológico de novos componentes da crotoxina (*Crotalus durissus terrificus*) e suas isoformas sobre a junção neuromuscular**. 2001, 98f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). UNICAMP – CAMPINAS. SÃO PAULO, 2001.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 12 (1): 35 – 40, 2002.

SOARES, M., A. **Identificação e caracterização do efeito antitumoral da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* e avaliação do seu potencial uso na detecção de tumores**. 2007, 156f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de

Radiações, Minerais e Materiais) - Centro de Desenvolvimento e tecnologia nuclear – CDTN – Pampulha/Belo Horizonte – MG. 2007.

SOARES, M. A.; PUJATTI, P.B.; FORTES-DIAS, C.L.; ANTONELLI, L.; SANTOS, R.G. *Crotalus durissus terrificus* venom as a source of antitumoral agents. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**. 16 (2): 480 – 92. 2010.

SOUZA, D.H.; LUIZ M. E., JEFFREY E. F.; MING-SHI J.; RICHARD C. G.; GLAUCIUS O.; SELISTRE-DE-ARAUJO, S.H. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data. **Arch. Biochem. Biophys.** (368): 285-290, 1999.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA – SBH. 2011. **Lista Brasileira de Anfíbios e Répteis**. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Acessado em 27 de agosto 2011.

STIVAL, A. S. **Avaliação da atividade não citotóxica do veneno da *Bothrops moojeni* em células mononucleares do sangue periférico humano**. 2011. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) Pontifícia Universidade Católica de Goiás, GO, 2011.

STOLF, O. H. **Uso do adesivo tecidual de fibrina derivado de veneno de serpente e avaliação da técnica de autoenxertia utilizando a pele do sulco nasogeniano**. 1998. 103p. Tese (Doutorado) – Escola Paulista de Medicina, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo – SP.

SUSINI G, ABOUT I, TRAN-HUNG L, CAMPS J. Cytotoxicity of epiphany and resilon with a root model. **Int Endod J**. 2006; 39 (12): 940-4.

TAMIETI B. P.; DAMATTE, R. A.; COGO, J. C.; DA SILVA, N. S.; MITTMAN, J.;

PACHECO-SOARES, C. Cytoskeleton, endoplasmic reticulum and nucleus alterations in cho-k1 cell line after *Crotalus durissus terrificus* (south american rattlesnake) venom treatment. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, 13(1): 57, 2007.

TEMPONE, A. G.; ANDRADE J.R.; H. F.; SPENCER, P. J.; LOURENÇO, C. O.; ROGERO, J. R.; NASCIMENTO, N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. With hidrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochem Biophys Res Commun**; 280(3):620-4, 2001.

TICLI, F. K. **Caracterização funcional e estrutural de uma L-aminoácido oxidase do veneno de Bothrops jararacussu e avaliação de sua ação antitumoral, antiparasitária e bactericida.** 2006, f. 111. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêutico de Ribeirão Preto – USP, São Paulo – SP.

TORRES, C. F. A.; DANTAS, R.T.; TOYAMA, M.H.; DIZ FILHO, E.; ZARA, F.J.; RODRIGUES DE QUEIROZ, M.G.; PINTO NOGUEIRA, N.A.; ROSA DE OLIVEIRA, M.; DE OLIVEIRA TOYAMA, D.; MONTEIRO, H.S.; MARTINS, A.M. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acidoxidase. **Toxicon.** (55): 795-804. 2010

TOYAMA, M.H.; MARANGONI S.; BARBOSA, R.L.; CORSO, G.; BOSCHERO, A.C. Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolates by single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (south American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islet. **Biochim. Biophys. Acta**, (1474): 56 – 60, 2000.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química nacional moderna. **Quim. Nova.** 29 (2): 326-337, 2006.

VILLARRUBIA, V. G.; COSTA, L. A.; DÍEZ, R. A. Fosfolipas A₂ s egregadas (sPLA₂): ¿ amigas o enemigas ¿ Actores de la resistência antibacteriana y antivirus de la inmunodeficiencia humana?. **Med Clin (Barc)**; 123(19):749-57, 2004.

VITAL BRAZIL O. **Peçonhas**. In: Corbett CE. Farmacodinâmica. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982. p. 1044 – 74.

WALL GL, DOWSON J, SHIPMAN C, Jr. Antibacterial efficacy and cytotoxicity of three endodontic drugs. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 1972; 33 (2): 230-1.

WALKER, J.M; GAASTRA, W. Techniques in molecular biology. New York: **MacMillan Publishing Company**. 333p. 1983.

WEAVER, B.A; CLEVELAND, D. W. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: the mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. **Cancer Cell**. 2005; 8: 7-12.

WEBER, J.; PIONTKIVSKA, H.; QUIÑONES-MATEU, M. E. HIV Type 1 Tropism and Inhibitors of Viral Entry: Clinical Implications. **AIDS Rev**. Apr – Jun; 8 (2): 60-77, 2006.

WILSON, E. O. **Biodiversity**. Washiton: National Academy Press, 1988.

ZIEGLER, U; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**. 2004; 19: 124-28.

ZINSZNER, H.; KURODA, M.; WANG, X.; BATCHVAROVA, N.; LIGHTFOOT, R.T.; REMOTTI, H.; STEVENS, J.L. & RON, D. Chop is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. **Genes Dev**; 12(7):982-995. 1998.

ZUG, G. R.; VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles, Second Edition (Hardcover). Academic Press, USA, 2000.**

APÊNDICES



São Paulo, 30 de abril de 2010.
CEP 0308/10

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) IRMTRAUT ARACI HOFFMANN PFRIMER
Co-Investigadores: Luiz Mário Janini; Maria Cecília Araripe Sucupira; Ricardo Sobhie Diaz (orientador)
Disciplina/Departamento: Infectologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: CAPES.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Atividade antiviral de venenos ofídicos obtidos de serpentes da região centro-oeste em células mononucleares do sangue periférico infectadas com HIV-1".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo para entendimento de certa doença e seu tratamento.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Risco mínimo, desconforto leve, com coleta de sangue.

OBJETIVOS: Avaliar a atividade antiviral de venenos brutos isolados das serpentes *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi*, *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops alternatus* da região centro-oeste em células mononucleares do sangue periférico infectadas com HIV-1. Avaliar atividade citotóxica dos venenos brutos em células primárias humanas. Identificar a concentração inibitória mínima do veneno bruto capaz de inibir a replicação viral.

RESUMO: Serão coletadas amostras de sangue de indivíduos sadios para obtenção de células mononucleares periféricas (PBMC). As células serão isoladas e contadas e cultivadas. Será realizada uma distensão celular para verificar o grau de pureza da amostra e tratadas para posterior infecção viral. Antes de serem aplicadas as diferentes concentrações dos venenos dos ofídicos nas PBMC, será realizado um teste de viabilidade celular com o corante de Azul de Trypan. A infecção viral se dará mantendo as células em cultura com o vírus por 2 horas em meio de cultura tratado, e após esse período serão realizadas 3 lavagens com meio RPM11640 para retirada de vírus livres. Será avaliado o efeito da concentração não citotóxica do veneno em células infectadas com HIV-1. de acordo com o teste: infectar as células mononucleares do sangue periférico com HIV-1 e posteriormente aplicar a concentração não citotóxica do veneno transcorridos diferentes intervalos de tempo, e utilizando os casos como controles: 1) células mononucleares em meio de cultura (controle negativo); 2) células mononucleares +(HIV-1)(controle positivo); 3) células mononucleares + venenos (concentração não citotóxica (controle negativo). Será realizado PCR em tempo real transcorridas 72h de interação entre células, vírus e veneno..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: A pesquisa poderá gerar benefícios para a população com HIV-1, pois a identificação de venenos com atividade anti-retroviral poderá ser um avanço científico na procura de um novo tratamento alternativo contra o HIV-1..

MATERIAL E MÉTODO: Descritos os procedimentos experimentais, que serão realizados por equipe especializada.

TCLE: Apresentado adequadamente.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

DETALHAMENTO FINANCEIRO: CAPES.

CRONOGRAMA: 36 MESES.

OBJETIVO ACADÊMICO: Pós-Doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **25/4/2011 e 24/4/2012.**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0308/10

Apêndice 2

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Atividade anti-viral de venenos ofídicos obtidos de serpentes da região
Centro-Oeste em células mononucleares do sangue periférico infectadas
com HIV-1.**

O objetivo desse estudo é o de avaliar a atividade de venenos de 5 espécies de serpentes da região Centro-Oeste do Brasil em células do sangue periférico infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1). O projeto terá uma duração de 36 meses com início em março de 2010 e término em março de 2013.

Os venenos utilizados na pesquisa serão disponibilizados pela Profa. Ms. Marta Regina Magalhães.

Na primeira fase da pesquisa serão realizados os testes de citotoxicidade celular, ou seja, serão testadas diferentes concentrações dos venenos em células sanguíneas até identificar a concentração que não seja citotóxica. Essa fase será desenvolvida no Laboratório de Imunologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO).

Na segunda fase da pesquisa a concentração do veneno que não causar morte das células será adicionada às células infectadas com o vírus da AIDS

(HIV-1) para se saber se as concentrações dos venenos têm efeito contra o HIV. Essa segunda fase do projeto será desenvolvida no Laboratório de Biossegurança Nível III (P3) do Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Caso você participe, o único desconforto será uma colheita de sangue que será feita por punção de veia do antebraço, o que pode causar um pouco de dor, ficar roxo (hematoma) no local ou causar tontura passageira. No total será preciso 20 mL de sangue correspondendo a 2 colheres de sopa. As células mononucleares serão separadas das amostras de sangue, e o material restante será descartado seguindo os protocolos de biossegurança.

A pesquisa não trará benefícios diretos para os participantes, mas poderá gerar benefícios para pessoas infectadas com o vírus do HIV-1. A identificação de novos compostos naturais com atividade anti-HIV poderá abrir um novo caminho na produção de um medicamento capaz de eliminar o vírus ou prevenir sua infecção, pois lamentavelmente ainda não contamos com um medicamento eficaz no combate do vírus.

Em qualquer etapa do estudo, o participante terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador será a Profa. Dr^a. Irmtraut A. Hoffmann Pfrimer que poderá ser encontrada no endereço: Rua Pedro de Toledo, 781 – 16 andar- Vila Clementino – São Paulo – SP, telefone (011)-50844262 / 55712130. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@epm.br.

As informações obtidas pelos pesquisadores serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. O participante terá direito de se manter atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento da pesquisa e existirá garantia de sigilo. As pessoas que participarem da pesquisa não receberão benefícios diretos da mesma, nem ressarcimento de despesas efetuadas com transporte, hospedagem e alimentação.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos realizados neste estudo, evidenciando-se nexos causal com o procedimento da punção venosa ou qualquer intercorrência relacionada à coleta do material o participante tem direito a tratamento médico bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

O pesquisador se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____