

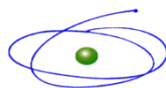


MESTRADO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE

**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 ATIVIDADE NÃO CITOTÓXICA DO VENENO
DA *BOTHROPS MOOJENI* EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO
SANGUE PERIFÉRICO HUMANO

AISLAN SENA STIVAL



Goiânia – Goiás

2011



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**

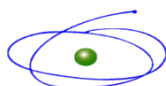
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NÃO CITOTÓXICA DO VENENO
DA *BOTHROPS MOOJENI* EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO
SANGUE PERIFÉRICO HUMANO**

AISLAN SENA STIVAL

ORIENTADORA:

Profa. Dra. IRMTRAUT ARACI HOFFMANN PFRIMER

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Ambientais e Saúde, da Pró-Reitoria 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

2011

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

(Chico Xavier)

DEDICATÓRIA

Primeiro a Deus,

Aos meus pais, Divino e Celeste, pela sempre atenta educação, carinho incondicional e pelo exemplo de caráter. Eles são responsáveis por eu poder escrever esta dissertação e por tudo mais que eu conseguir de positivo em minha vida.

À minha esposa, Margareth pela compreensão nos momentos difíceis que passamos.

À Dra. Marilúcia Pereira do Lago pela amizade e incentivo a realização deste mestrado.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer, pela sábia orientação, amizade e confiança inculcada para que conduzisse este trabalho. Por ter acreditado e por ter tantas vezes entendido minhas limitações.

Aos meus colegas do Mestrado pela luta conjunta nas nossas pesquisas, em especial Fernanda de Oliveira Feitosa e José Vitelio Ruiz companheiros do dia a dia no desenvolvimento das técnicas laboratoriais.

À Professora Martha Magalhães do Centro de Pesquisa e Estudos Biológicos (CEPB) por ter cedido o veneno, sem os quais o Projeto não poderia ter sido executado.

Aos alunos bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Imunologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO) que me ajudaram com as doações de amostras de sangue para a separação celular e organização do laboratório: Larissa Viandeli, Maryanne Mota de Faria, Arthur Antonucci Vieira Moraes, Eliabe Lopes Cavalcante, Alan Rodrigo Apio e Flávio Cavalcante de Assis.

Ao Luciano Nunes da Silva pelo apoio recebido na secretaria e ao Carlos Eduardo Lopes pelo apoio logístico no Laboratório de Imunologia da PUC-GO do Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde.

Para todas as pessoas que estiveram comigo durante esta etapa da vida que Deus me permitiu viver... Um grande abraço em todos e Obrigado.

RESUMO

Introdução: O Brasil possui hoje a segunda colocação dentre os países com maior riqueza de répteis em seu território. A *Bothrops moojeni* é uma serpente venenosa encontrada abundantemente na região Centro Oeste do Brasil. O veneno das serpentes são misturas complexas contendo neurotoxinas, citotoxinas, miotoxinas, proteases e nucleases. O veneno da *Bothrops moojeni* é composto de um grande número de componentes bioativos que poderá ser no futuro um potencial uso terapêutico nas pesquisas científicas voltadas para a área da saúde.

Objetivos: O objetivo deste projeto foi o de avaliar a atividade não citotóxica do veneno bruto *Bothrops moojeni* em células mononucleares de sangue periférico (CMN).

Metodologia: Neste trabalho foram obtidas CMN de doações de pessoas saudáveis, as CMN foram separadas em meio de gradiente de densidade. Após ativação das CMN com fitohemaglutinina (PHA) e interleucina (IL2) foram adicionadas diferentes concentrações do veneno da cobra *Bothrops moojeni* para avaliar sua atividade não citotóxica.

Resultados: As concentrações 0,5 e 0,05 µg/mL do veneno bruto da serpente *Bothrops moojeni* não apresentou atividade citotóxica sobre CMN do sangue periférico humano.

Conclusão: O veneno bruto da serpente *Bothrops moojeni* por não apresentar citotoxicidade nas concentrações 0,5 e 0,05 µg/mL, é potencialmente útil para verificar possível efeito terapêutico sobre estas células infectadas por microorganismos como por exemplo o HIV - 1.

Palavras-Chave: Células Mononucleares, Veneno de serpentes, *Bothrops moojeni*, Citotoxicidade.

ABSTRACT

Introduction: Today, Brazil has the second position among the countries with more richness of reptiles in their territory. The *Bothrops moojeni* is a poisonous snake found abundantly in the Midwest region of Brazil. Neurotoxins are complex mixtures containing neurotoxins, cytotoxins, myotoxins, proteases and nucleases. The venom of *Bothrops moojeni* and composed a great number of bioactive components that may eventually be a potential therapeutic use in scientific research focused on health.

Objectives: The objective of this project was to evaluate the activity of non-cytotoxic venom *Bothrops moojeni* in peripheral blood mononuclear cells (CMN). Methodology: In this work were obtained CMN donations from healthy individuals, MNCs were separated in the density gradient. After activation of CMN with phytohemagglutinin (PHA) and interleukin (IL2) was added different concentrations of cobra venom *B. moojeni* to evaluate its activity is not cytotoxic.

Results: The levels of 0.5 and 0.05 mg / mL crude venom of *Bothrops moojeni* showed no cytotoxic activity on human peripheral blood CMN.

Conclusion: The crude venom of *Bothrops moojeni* by not showing cytotoxicity at levels of 0.5 and 0.05 mg / mL, is potentially useful for evaluating potential therapeutic effects on these cells infected with microorganisms such as HIV - 1.

Keywords: mononuclear, snake venom, *Bothrops moojeni*, Cytotoxicity.

Lista de Tabelas

- Tabela 01:** Análise da recuperação, viabilidade, contagem diferencial e grau de pureza após separação de CMN do sangue venoso de doadores sadios. 30
- Tabela 2:** Análise do crescimento celular induzido pelas concentrações de PHA e/ou IL-2 durante 72 horas. 32

Lista de Figuras

- Figura 1.** *Bothrops moojeni* do serpentiário do Centro de Estudo e Pesquisa Biológica CEPB PUC-GO. 13
- Figura 2.** Distribuição geográfica da espécie *Bothrops moojeni* (Fonte: Campbell & Lamar (2004)). 14
- Figura 3** – Fluxograma realizado para obtenção de células mononucleares do sangue periférico para cultivo celular. 19
- Figura 4.** Fluxograma realizado para avaliação da atividade não citotóxica do veneno bruto em células mononucleares do sangue periférico. 20
- Figura 5** - Associação intra-observador das leituras realizadas de um mesmo ensaio. 28
- Figura 6** – Associação inter-observador das leituras realizadas de um mesmo ensaio. 28
- Figura 07.** Atividade citotóxica de diferentes concentrações do veneno de *Bothrops moojeni* para células mononucleares nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas. 32

SUMÁRIO

Resumo	VI
Abstract	VII
Lista de Tabelas	VIII
Lista de Figuras	IX
Lista de Abreviaturas	XI
1. Introdução	12
1.1 Veneno de Serpentes e suas atividades.	14
2. Objetivos	18
2.1 Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3. Materiais e Métodos	19
3.1 Protocolo	19
3.2 Extração do Veneno	21
3.3 Casuística	21
3.4 Obtenção de Células Mononucleares (CMN) de sangue periférico para cultivo celular.	21
3.4.1 Teste da Viabilidade Celular	22
3.4.2 Grau de Pureza	22
3.4.3 Grau de Recuperação	23
3.5 Padronização das Condições de Cultivo de Células Mononucleares do Sangue Periférico	23
3.6 Condições de Cultivo das CMN	24
3.7 Citotoxicidade	24
3.8 Análise dos dados	25
4. Resultados e Discussão	26
4.1 Avaliação da variação intra e inter- observador da contagem de leucócitos totais.	26
4.2 Avaliação da separação de CMN em meio gradiente de densidade (<i>Ficoll-Paque</i>)	28
4.3 Análise de recuperação e composição celular após separação de células.	29
4.4 Avaliação da concentração da dose ideal de Interleucina-2 e Fitohemaglutinina.	31
5. Conclusão	34
6. Referência Bibliográfica	35
Apêndices	42

LISTA DE ABREVIATURAS

B. moojeni - *Bothrops moojeni*

CMN – Células Mononucleares

ECA – Enzima Conversora da Angiotensina

EAT – Tumor ascístico de Erlich

HIV – Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)

IL2 – Interleucina - 2

LAO – L-Aminoacido Oxidase

MjTX-II - Miotoxina II de *Bothrops moojeni*

NTX – Neurotoxinas

PBS – Phosphate Buffered Saline (Salina Tamponada Fosfato)

PHA – Fitohemaglutinina

PLA2 - Fosfolipase A2

PUC - GO - Pontifícia Universidade Católica de Goiás

RPM – Rotações por minuto

RPMI- Meio de Cultura (Roswell Park Memorial Institute)

SFB – Soro fetal bovino

1. INTRODUÇÃO

As cobras foram objeto de fascínio, medo e mitos ao longo da história. Desde o início da civilização a serpente vem sendo o símbolo da cura. No Egito antigo, as cobras foram adoradas e sua réplica foi usada para decorar as coroas dos Imperadores Romanos. Na Grécia antiga, os deuses da medicina foram retratados com um cajado entrelaçado por uma serpente. Este é o símbolo usado para representar a medicina e a farmácia (Koh *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2006).

Os ofídios, também são conhecidos como serpentes ou cobras, são animais vertebrados, que pertencem ao grupo dos Répteis – *Classe Reptília*. O Brasil é atualmente o segundo colocado entre os países com maior número de répteis em seu território. A riqueza da população de répteis do país é representada por 721 espécies conhecidas, destas, as serpentes somam 371 espécies, distribuídas em 9 famílias e 75 gêneros. Destas 9 famílias somente quatro foram utilizadas para pesquisas médicas: *Elapidae*, *Viperidae*, *Crotalinae* e *Hydrophidae*. Dentre todas as espécies encontradas no cerrado a *Bothrops moojeni* da família *Viperidae* é a mais estudada em pesquisas científicas voltadas para a área da saúde (Nogueira *et al.*, 2003; França *et al.*, 2006; SBH, 2010).

Hoje no Brasil não existe uma política para a preservação das serpentes, o que contribui significativamente para a extinção destes animais. Entre os principais fatores podemos ressaltar a poluição e mudanças climáticas pela qual vem passando o planeta, a perda e a degradação acelerada de seus habitat e a introdução de espécies invasoras (Gibbons *et al.*, 2000).

O gênero *Bothrops* compreende cerca de 30 espécies, distribuídas por todo o território brasileiro (Pinho & Pereira, 2001). A *Bothrops moojeni* (Figura 1) é popularmente conhecida como Caiçaca pertence à ordem *Squamata*, família *Viperidae*, subordem *Ofidia* e classe *Reptilia* (SBH, 2010).



Figura 1. *Bothrops moojeni*. http://www.univap.br/cen/bothrops_serpentario.php

A *Bothrops moojeni* é uma serpente venenosa abundantemente encontrada na região central do Brasil (Figura 2), gosta de viver em áreas abertas de regiões quentes e secas. Seu comprimento pode alcançar até 230 cm, sendo que em sua maioria não atingem mais de 160 cm. A serpente apresenta desproporção em seu comprimento dependendo do sexo, sendo os machos menores que as fêmeas. A *B. moojeni* apresenta uma dieta variada, constituída de lagartos, roedores e anfíbios (Borges & Araújo, 1998; Nogueira *et al.*, 2003; Faria & Brites, 2003; Campbell & Lamar, 2004).

Segundo o Ministério da Saúde (2010) o número de envenenamentos no Brasil por serpentes no ano de 2008 foram de 26.852 casos, sendo que 73% destes foram ocasionados por serpentes do gênero *Bothrops* no Norte e Centro-Oeste. Entretanto, a variação regional é significativa. O Norte e Centro-Oeste apresentam coeficientes de 3 a 4 vezes mais elevados do que as demais regiões do país ocasionados por serpentes do gênero *Bothrops*.

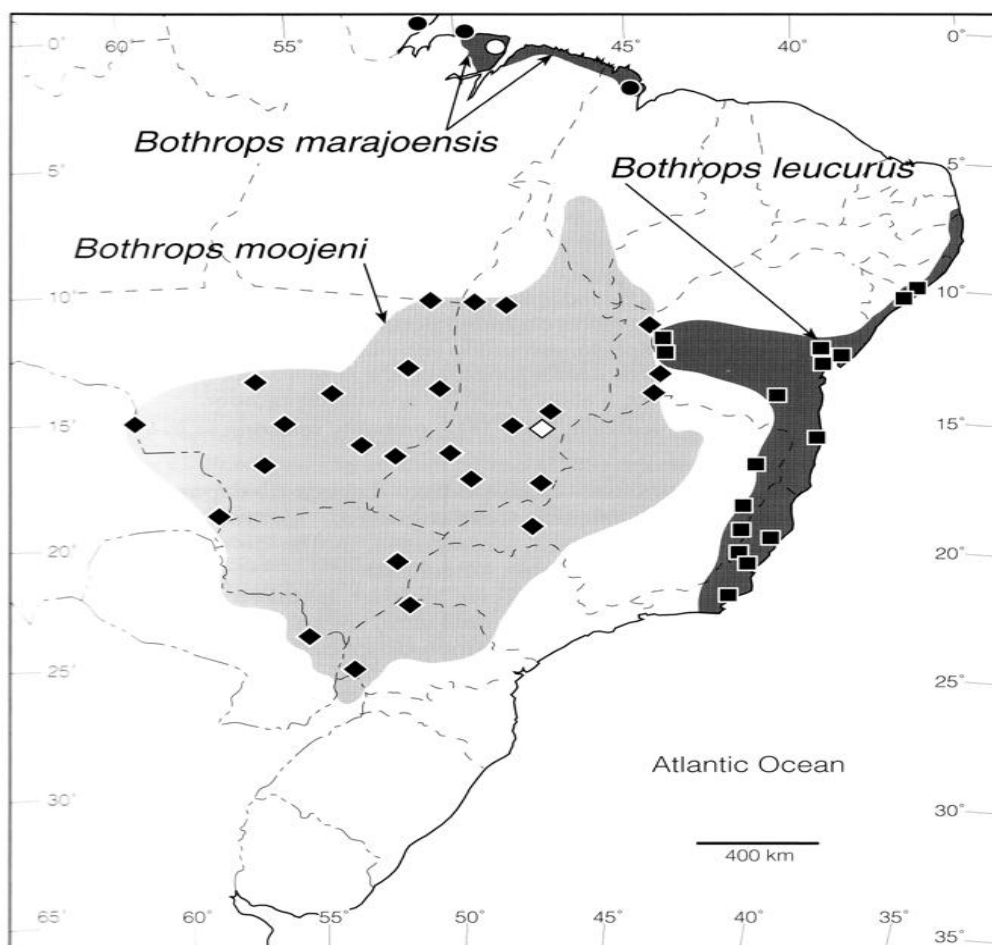


Figura 2. Distribuição geográfica das espécies *Bothrops moojeni*, *Bothrops marajoensis* e *Bothrops leucurus* (Fonte: Campbell & Lamar, 2004).

1.1 Veneno de Serpentes e suas atividades.

Um grande número de componentes bioativos tem sido isolados a partir de venenos de serpentes (Menez, 1993). Venenos de serpentes contêm um grande número de moléculas ativas, proteínas e peptídeos, que são geralmente semelhantes em estrutura, mas diferentes quando comparados entre uma serpente e outra (Calvete *et al.*, 2007). Estas moléculas são produzidas por glândulas especializadas, que são evolutivamente relacionadas com as glândulas salivares (Shaikh & Jokhio, 2005).

Os venenos ofídicos são constituídos por misturas heterogêneas complexas inorgânicas e orgânicas, tais como neurotoxinas, citotoxinas, miotoxinas, proteases e nucleases, além do cálcio, magnésio e zinco. As proteínas constituem 90% a 95% do peso seco do veneno, principalmente enzimas e neurotoxinas, que em conjunto são responsáveis pela atividade tóxica dos venenos (Menez, 1993; Ribeiro, 2000). A quantidade de veneno das serpentes do gênero *Bothrops* depende do tamanho da cobra, se é adulta ou filhote e, se já havia atacado outra presa previamente (Pinho & Pereira, 2001). O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* possui três atividades que são consideradas principais: proteolítica ou necrosante, coagulante e hemorrágica (Ribeiro & Jorge, 1997).

A proteína C é um potente ativador que está presente no veneno da serpente *Agkistrodon contortrix contortrix* e é utilizada como reagente nas rotinas de ensaios laboratoriais (teste AVC) para avaliação da coagulação (Klein & Walker, 1986; Kirschbaum *et al.*, 1999; Marsh, 2001).

O valor medicinal de venenos tem sido conhecido desde os tempos antigos. Os princípios ativos de venenos têm sido amplamente estudados a partir do seu fracionamento. O efeito terapêutico destas biomoléculas é geralmente

obtido através de mecanismos diferentes se comparados aos agentes terapêuticos convencionais. Estas biomoléculas são sugeridas para o tratamento de diversas doenças inflamatórias, hematológicas, auto-imunes, infecciosas, cardiovasculares e doenças neuromusculares (Gawade, 2007). Lima *et al.* (2005) demonstraram que os venenos de serpentes da família *Viperidae* tem ação antibiótica mas ainda não foi devidamente explorada.

Após uma minuciosa investigação do veneno da serpente *Bothrops jararaca* foi descoberto um potente anti-hipertensivo, obtido pelo isolamento e estudo da enzima responsável pela conversão da angiotensina I e II (ECA), Este estudo resultou no desenvolvimento da droga captopril (Bailey & Wilce, 2001).

A L-aminoácido oxidase (LAO) das serpentes *Bothrops* é uma enzima com alto potencial de destruição sobre diversos patógenos, fungos, vírus e outros microorganismos, podendo se tornar uma enzima promissora para as áreas de biotecnologia e medicina (Isidoro,2007).

Zhang *et al.* (2003) após a purificação e clonagem do veneno da serpente *Stejnegeri trimeresurus* retirou a fração LAO (TSV-LAO), que foi capaz de inibir a infecção e replicação do HIV. A crotoxina e fosfolipase isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (sPLA2-Cdt), mostrou atividade antiviral contra o HIV *in vitro* (Villarrubia *et al.*, 2004).

As citotoxinas isoladas do veneno da *Naja nigricolis* demonstraram hemólise seletiva de eritrócitos pré-infectados com vírus Sendai (Borkow & Ovadia, 1999). Petricevich & Mendonça (2003) observaram atividade antiviral do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre o vírus do sarampo.

Silva & Sperandin (2005) em sua revisão bibliográfica sobre as serpentes do gênero *Bothrops* ressaltaram a importância dos efeitos neurotóxicos e

miotóxicos do veneno. Harvey *et al.*,(1982) verificaram que baixas concentrações da serpente *Bothrops pauloensis* indicam a presença de neurotoxinas enquanto que altas concentrações apresentam componentes miotóxicos. Silva *et al.* (2002) aplicou o veneno *Bothrops jararaca* no Tumor Ascítico Erlich (EAT) e obteve a inibição na sua fase inicial. O tratamento foi realizado *in vivo*.

A *Bothrops moojeni* e a *Bothrops jararacussu* inibem o crescimento de *Streptococcus mutans* presentes na microbiota oral humana (Mosca, 2008). A miotoxina (MjTX-II) uma fosfolipase A₂ (PLA₂), do veneno da *Bothrops moojeni* apresentou também atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* (Stábeli *et al.* 2006). A miotoxina (MjTX-II) do veneno da *Bothrops moojeni* apresentou também atividade antimicrobiana contra a *Candida albicans* além da atividade antiparasitária contra *Schistosoma mansoni* e *Leishmania* spp (Stábeli *et al.* 2006).

Barbosa *et al.* (2010) verificaram que a proteína lectina-like (BmLec) do veneno da *Bothrops moojeni* possui muitas atividades biológicas, dentre essas atividade antibacteriana, com uma redução significativa da taxa de crescimento bacteriano em cerca de 15% *Xanthomonas axonopodis pv passiflorae* e *Clavibacter michiganensis michiganensis*.

Castilho (2008) demonstrou que o veneno bruto da *Bothrops moojeni* tem capacidade de reduzir a viabilidade *in vitro* de duas espécies de Leishmanias: *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*. Cardoso (1999) mostra também em seu trabalho que o veneno bruto da *Bothrops moojeni* apresentou atividade contra *Leishmania amazonensis*.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade não citotóxica do veneno isolado da *Bothrops moojeni* sobre as CMN do sangue periférico humano.

2.2 Objetivos específicos

1. Padronizar a obtenção de CMN do sangue periférico humano para cultivo celular.

2. Identificar as concentrações ideais de fitohemaglutinina e interleucina-2 capazes de estimular a proliferação em CMN do sangue periférico humano.

3. Detectar o efeito não citotóxico das diferentes concentrações do veneno bruto da *Bothrops moojeni* sobre CMN do sangue periférico humano.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Protocolo

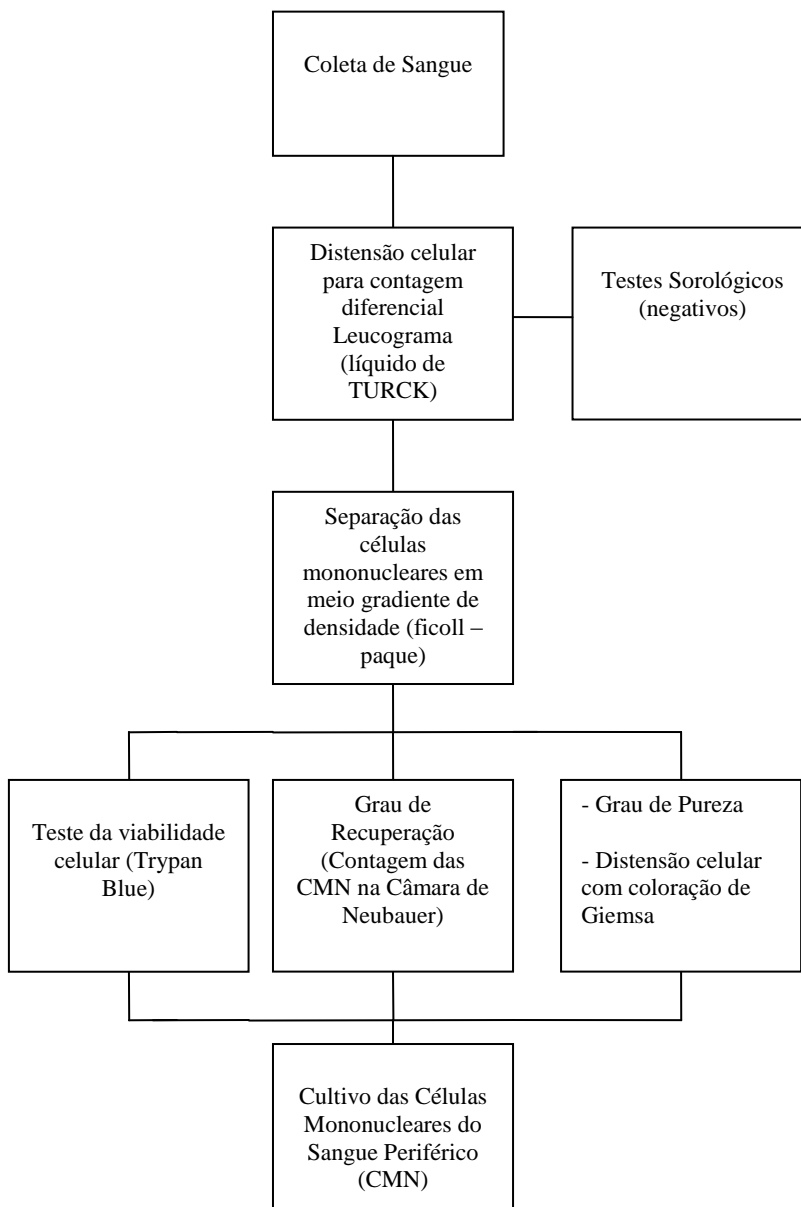


Figura 3 – Fluxograma realizado para obtenção de CMN do sangue periférico para cultivo celular.

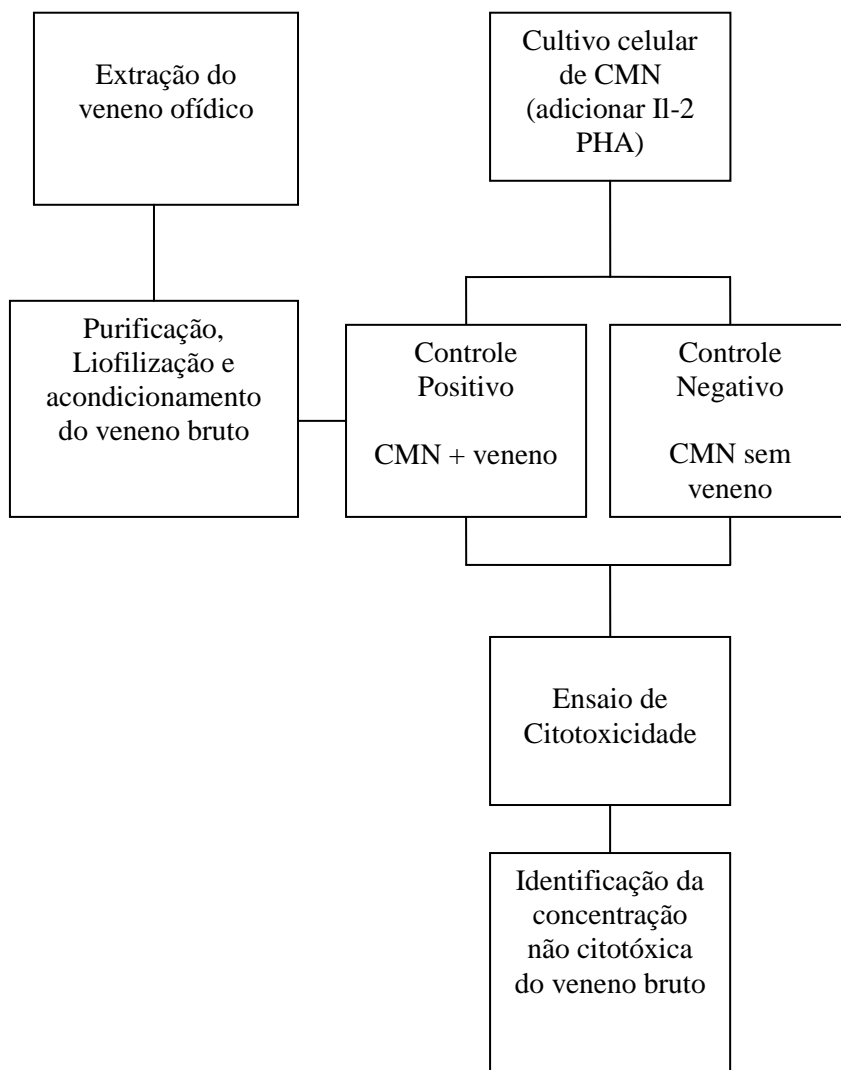


Figura 4. Fluxograma realizado para avaliação da atividade não citotóxica do veneno bruto em células mononucleares do sangue periférico.

3.2 Extração do Veneno

O veneno das serpentes, mantidas no serpentário do Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas (CEPB) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GOÍÁS), foram extraídos por massagem manual da glândula de veneno. Após clarificação por centrifugação a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C o veneno foi liofilizado e acondicionado à -86 °C.

3.3 Casuística

Participaram do presente estudo 12 sujeitos saudáveis de ambos sexos com idade de 20 a 30 anos. Foram colhidos 20 mL de sangue venoso para a realização da sorologia e obtenção das CMN, após terem sido feitos os esclarecimentos para os sujeitos da pesquisa e os mesmos terem concordado em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1).

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo Hospital São Paulo analisou e aprovou este projeto de pesquisa, CEP 0308/10 (Apêndice 2).

3.4 Obtenção de Células Mononucleares (CMN) de Sangue Periférico para cultivo celular.

As CMN foram obtidas a partir de 12 indivíduos doadores saudáveis. Foram utilizadas apenas as amostras de sangue negativas para todos os testes de triagem. Os testes sorológicos de triagem realizados foram: Anti-HBc, HBS-Ag,

Anti-HCV, Anti-HIV 1 e 2, Anti-HTLV 1 e 2, VDRL e Doença de Chagas. Foram extraídos 20 mL de sangue em tubo heparinizado. Após a coleta foram utilizados 20 µL de sangue total diluídos em líquido de Turck (1/20) para contagem de leucócitos totais.

As CMN foram obtidas pela técnica de separação celular em gradiente de densidade (Ficoll-paque, $d=1077$ g/L, Amersham). O sangue total heparinizado foi centrifugado por 10 minutos a 2000 rpm para formação do creme leucocitário. O creme leucocitário foi retirado e suspenso até o volume de 10 mL em salina tamponada (PBS) e posteriormente aplicado sobre o meio gradiente de densidade. Essa solução foi centrifugada por 20 minutos a 18°C a 2000 rpm. As células da interface foram lavadas em tampão PBS por três vezes (10 minutos a 18°C a 2000 rpm). As células foram contadas em câmara de Neubauer e mantidas a 5% de CO₂ à 35-37°C mantidas em meio RPMI 1640 com 20 mM de HEPES (Gibco-BRL™, Grand Island, NY, EUA) acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 2mM de L-glutamina (Gibco-BRL™).

3.4.1 Teste da Viabilidade Celular

Para avaliar a viabilidade celular foi utilizado o corante vital Azul de Trypan. Foram retirados 20µL da suspensão das CMN para diluição com esse corante Azul de Trypan na concentração de 0,1% em PBS.

3.4.2 Grau de Pureza

Foi realizada uma distensão celular com a suspensão das CMN obtidas utilizando-se a coloração de Giemsa, com leitura em microscopia ótica comum. Foram contadas 200 células e avaliado o percentual de CMN.

3.4.3 Grau de Recuperação

O grau de recuperação foi avaliado correlacionando o número de CMN presentes na distensão sanguínea do sangue total, com o número de CMN presentes na suspensão após a separação celular em gradiente de densidade. Foram adicionados 20 μL da amostra de sangue heparinizado, à 380 μL de líquido de Turck, diluição (1/20) e posteriormente, foi realizada a leucometria em câmara de Neubauer. No momento da coleta de sangue total e no final da técnica para obtenção de CMN foi realizado uma distensão que foi corada pelo método de Giemsa e visualizada em microscopia ótica comum. No final da separação foi realizada a contagem de CMN na câmara de Neubauer. O grau de recuperação foi determinado pelo total de CMN antes e após a técnica de separação celular.

3.5 Padronização das condições de cultivo de células mononucleares do sangue periférico

A avaliação da concentração ideal de PHA e IL-2 foi realizada utilizando-se 2×10^5 CMN. Para preparo da solução de PHA ótima foi utilizada uma solução estoque de PHA da qual foram retirados 90 μL da solução estoque diluída em 810

μL de RPMI. Para o preparo da solução de PHA subótima foram utilizados 125 μL da lectina diluída em 2375 μL de RPMI.

Posteriormente, a concentração ótima da IL-2 foi testada utilizando-se 9 μL da solução estoque de IL-2 diluída em 81 μL de RPMI. Para o preparo da solução de IL-2 subótima foram utilizados 12,5 μL da citocina diluída em 237,5 μL de RPMI.

Essas soluções foram adicionadas em triplicata aos poços da placa de cultivo celular, contendo 2×10^5 CMN. Os resultados foram observados após 24, 48, 72 horas de cultivo celular.

3.6 Condições de Cultivo das CMN

Foram ativadas 2×10^5 CMN mantidas em meio de RPMI, por poço em placa de cultivo celular com fitohemaglutinina e interleucina-2 durante 72 horas a 5% de CO_2 e 35-37°C. As placas de cultura celular foram monitoradas diariamente quanto à contaminação com agentes microbianos tais como bactérias, fungos filamentosos e leveduras em microscópio óptico de luz invertida (Nikon).

3.7 Citotoxicidade

O teste de viabilidade celular para CMN mantidas nas diferentes concentrações do veneno da *Bothrops moojeni*. O Trypan Blue é um teste de

exclusão celular para determinação do número de células viáveis presentes na suspensão celular. As células vivas possuem a membrana celular intacta que não são coradas pelo Trypan Blue, enquanto as células mortas são coradas apresentando uma coloração azul em seu citoplasma.

A quantificação de morte celular foi realizada com a contagem de 200 CMN células verificando o percentual de células coradas na câmara de Neubauer.

3.8 Análise dos dados

Para verificar correlação intra e inter-observador na leucometria, foi usado o coeficiente de correlação de Spearman, sendo significativo quando $p \leq 0,05$. Para análise da diferença entre as diferentes concentrações de PHA e IL-2 em cultivo celular foi realizada Análise de Variância (ANOVA), assumindo que a diferença foi significativa sempre que $p \leq 0,05$. A recuperação, viabilidade, contagem diferencial e grau de pureza das CMN foram apresentadas em tabela contendo análise descritiva dos dados, contendo as freqüências simples, médias e desvios-padrões. E, os dados referentes às análises das concentrações não citotóxicas do veneno foram plotados em um gráfico de linha para melhor visualização do resultado. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Bioestat versão 5.0 (Ayres *et al.*, 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da variação intra e inter-observador da contagem de leucócitos totais.

Durante o processo de padronização foi necessária a contagem de leucócitos totais do sangue periférico, posteriormente, de CMN obtidas após a separação e cultivo celular. Assim, é fundamental a capacidade técnica do observador, pois variações nas contagens celulares podem resultar no comprometimento dos resultados obtidos durante a realização dos experimentos.

Para se observar a fidedignidade na realização da diluição do sangue em líquido Turck e posterior contagem dos leucócitos em câmara Neubauer esta atividade foi realizada em duplicata para avaliação das variações intra-observador e inter-observador (Figura 5 e 6).

A relação nas leituras intra observador e inter observador foram fortes e tem alta significativas, as leituras do intra-observador realizadas de um mesmo ensaio $r = 0,982$, $p < 0,001$ e as leituras inter-observador realizadas de um mesmo ensaio $r = 0,988$, $p < 0,001$.

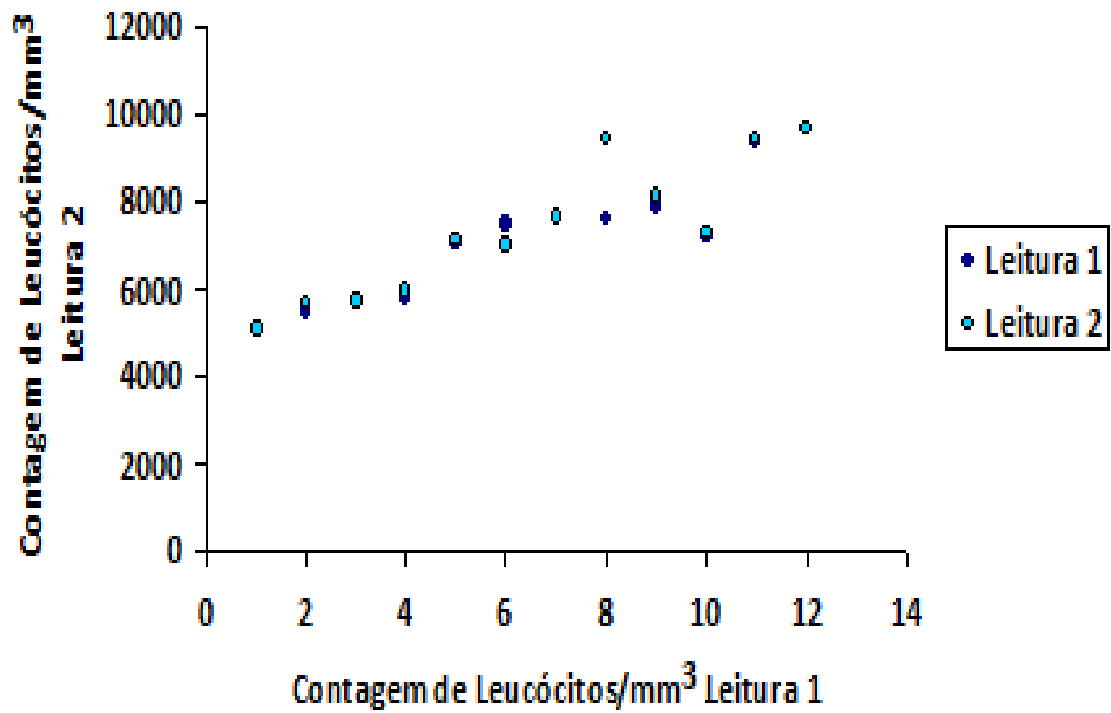


Figura 5 - Associação intra-observador das leituras realizadas de um mesmo ensaio ($r = 0,982$, $p < 0,001$, correlação de Spearman).

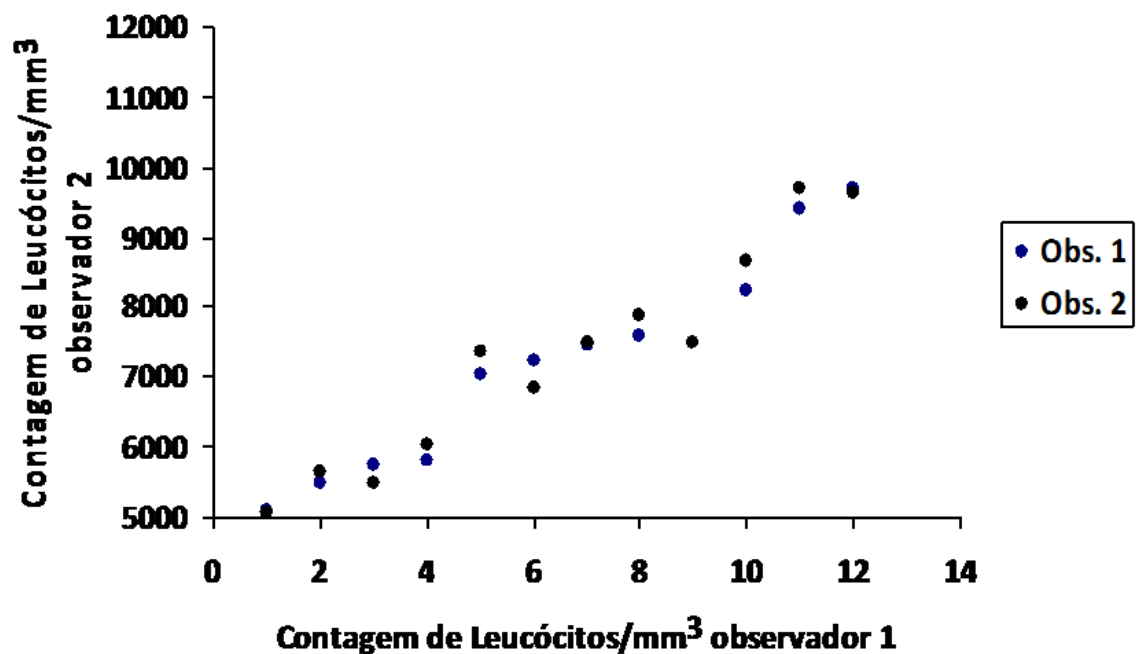


Figura 6 – Associação inter-observador das leituras realizadas de um mesmo ensaio ($r = 0,988$, $p < 0,001$ correlação de Spearman).

Santos *et al.* (2009) relatam que por mais que a contagem eletrônica de células seja precisa para avaliar uma grande quantidade de células, também pode levar a um grande número de falso positivos, sendo necessária a confirmação pela microscopia óptica. Howell *et al.* (1979) utilizou esta mesma técnica para a retirada do buffy-coat colocando o sangue em um tubo heparinizado e retirando o anel leucocitário para a separação das CMN.

4.2 Avaliação da separação, viabilidade, contagem diferencial e grau de pureza após separação de CMN do sangue periférico humano.

Para avaliar a qualidade da obtenção da CMN foi verificada a viabilidade das células, sendo que as células não viáveis apresentaram-se coradas com o corante vital Trypan Blue. A viabilidade das CMN sempre foi a 95% (Tabela 1).

O grau de recuperação foi determinado com a relação da porcentagem de CMN antes e depois da separação. A recuperação média das CMN foi de 67,25 %, com desvio padrão de 14.88. A média do grau de pureza foi superior 95.92% e o desvio padrão e de 2.25 das 12 amostras analisadas (Tabela 1).

Após verificar que a porcentagem da recuperação de CMN foi melhorando a cada vez em que a técnica foi se aprimorando e tendo um excelente aumento de recuperação de CMN.

Tabela 01: Análise da recuperação, viabilidade, contagem diferencial e grau de pureza após separação de CMN do sangue venoso de doadores saudáveis.

Amostras	%	%	Composição celular por amostra			
			Recuperação de CMN	Viabilidade das CMN	Linfócitos	Monócitos
1	40	> 95	60	37	3	97
2	41	> 95	62	34	4	96
3	51	> 95	68	30	2	98
4	52	> 95	63	28	9	91
5	63	> 95	68	28	4	96
6	72	> 95	66	32	2	98
7	75	> 95	58	34	8	92
8	79	> 95	61	34	5	95
9	81	> 95	65	32	3	97
10	82	> 95	57	41	2	98
11	85	> 95	52	45	3	97
12	86	> 95	70	26	4	96
Média	67.25	---	62.50	33.42	4.08	95.92
Desvio-Padrão	14.88	---	5.21	5.40	2.25	2.25

4.3 Avaliação da concentração da dose ideal de interleucina-2 e fitohemaglutinina.

Após feito a padronização da leitura inter-observador e intra-observador foi iniciada a análise da utilização de interleucina-2 e fitohemaglutinina no cultivo celular, com o objetivo de verificar o melhor resultado da replicação destas células nas dosagens ótima e sub-ótima, em conjunto e separadamente, após adição de

diferentes concentrações de PHA e/ou IL-2, conforme protocolo pré-estabelecido. A proliferação celular foi avaliada através da contagem na câmara de Neubauer (Tabela 2).

Tabela 2: Análise do crescimento celular induzido pelas concentrações de PHA e/ou IL-2 durante 72 horas.

Concentrações de PHA e/ou IL-2	Quantidade de Células / 200μL			
	24h	48h	72h	Média
1 PHA ótima	5.1 x 10 ⁵	6.5 x 10 ⁵	6.9 x 10 ⁵	6.17 x 10 ⁵
2 PHA subótima	16 x 10 ⁵	12 x 10 ⁵	11 x 10 ⁵	13.00 x 10 ⁵
3 IL-2 ótima	10 x 10 ⁵	7.8 x 10 ⁵	6.4 x 10 ⁵	8.07 x 10 ⁵
4 IL-2 subótima	6.5 x 10 ⁵	8.4 x 10 ⁵	12.6 x 10 ⁵	9.17 x 10 ⁵
5 PHA ótima+IL-2 ótima	2.6 x 10 ⁵	4.4 x 10 ⁵	4.7 x 10 ⁵	3.90 x 10 ⁵
6 PHA subótima+IL-2 subótima	11.3 x 10 ⁵	11.7 x 10 ⁵	14.2 x 10 ⁵	12.40 x 10 ⁵
7 Controle	4.2 x 10 ⁵	3.6 x 10 ⁵	1.3 x 10 ⁵	3.03 x 10 ⁵

Depois de realizada a Análise de Variância (ANOVA), verificou-se que houve diferença significativa entre as condições de PHA e IL-2 ($F= 11,72$, $p= 0,0002$), sendo que a diferença foi significativa entre as seguintes condições 1 e 2 ($p<0,05$), 1 e 6 ($p<0,05$), 2 e 5 ($p<0,01$), 2 e 7 ($p<0,01$), 4 e 7 ($p<0,05$), 5 e 6 ($p<0,01$) e 6 e 7 ($p<0,01$). Após análise dos resultados ficou estabelecida a utilização de PHA e IL-2 subótima nos cultivos celulares subseqüentes, pois verificou-se que a quantidade e qualidade ideal para o cultivo celular nas 72 horas era a ideal para o experimento, observou-se a evolução do cultivo tendo um aumento de células viáveis nas 72 horas.

A PHA possui um excelente grau de atividade mitogênica e estimula a diferenciação básica e conseqüente mitose de linfócitos T presentes em sangue,

a IL-2 é uma glicoproteína que age no crescimento de célula T. A PHA e a IL-2 quando combinadas estimulam o processo de divisão celular (mitose) sendo de grande importância nos testes *in vitro* pelo aumento no número de células (Sell & Costa, 2000).

4.4 Avaliação da atividade não citotóxica do veneno da *Bothrops moojeni* em CMN do sangue periférico.

Foi utilizado o veneno bruto liofilizado da espécie de serpente *Bothrops moojeni* com diluição em concentrações diferentes para avaliação do efeito não citotóxico em CMN do sangue periférico. As concentrações utilizadas foram 5µg/ml, 0,05 µg/mL e 0,005 µg/mL.

O veneno liofilizado foi diluído em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino. A concentração celular utilizada foi de 2×10^5 células/mL acrescida de PHA subótima e IL-2 subótima em cada poço da placa de cultivo celular.

A avaliação da atividade citotóxica do veneno foi realizada pela visualização da placa após 24, 48 e 72 horas. As concentrações 0,5 e 0,05 µg/mL não apresentaram atividade citotóxica, enquanto a concentração 5µg/mL apresentou atividade citotóxica (Figura 7).

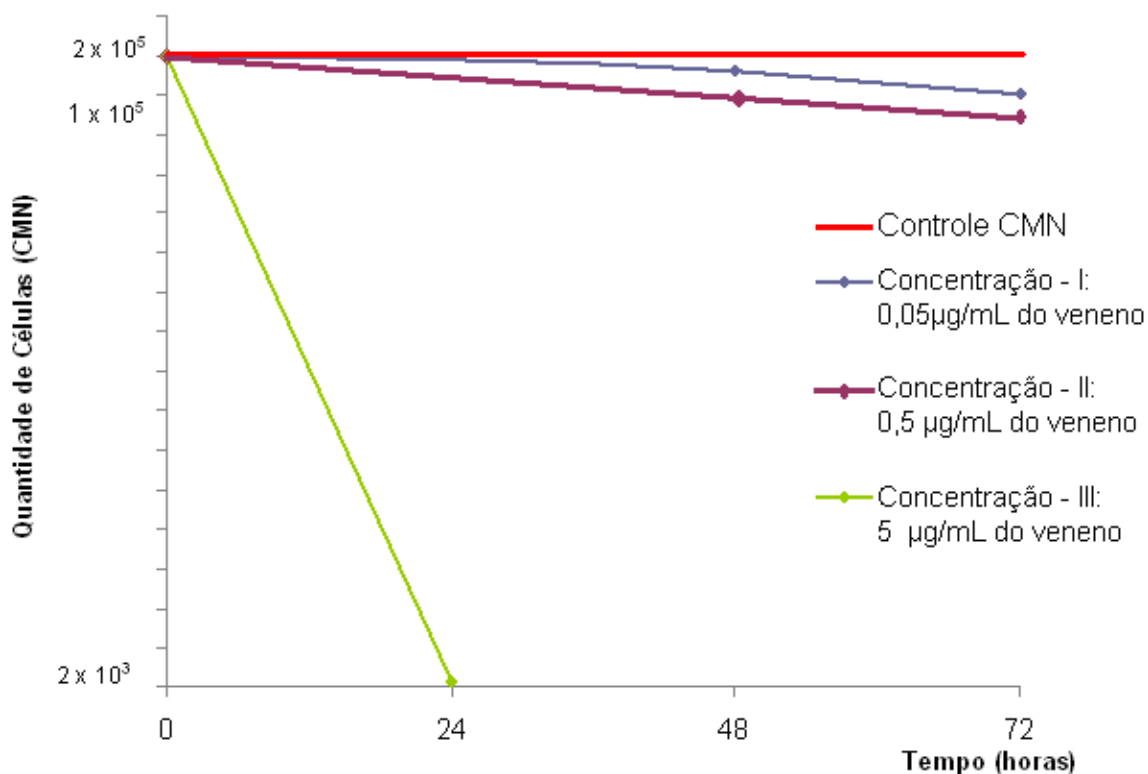


Figura 07. Atividade citotóxica de diferentes concentrações do veneno de *Bothrops moojeni* para CMN nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas.

Petricevich & Mendonça (2003), realizaram um teste semelhante com a finalidade de estudo para verificar a influência de diferentes concentrações do veneno da *Crotalus durissus terrificus* em células Vero avaliando a concentração não citotóxica no crescimento do vírus do sarampo, o tratamento das células Vero utilizados na pesquisa da *Crotalus durissus terrificus* foi de 2×10^5 células por poços em placa de 96 poços e incubadas a 5% de CO₂ a 37,8 °C.

O processo de morte celular pode ser causado por dois tipos: necrose ou apoptose. A apoptose vem sendo descrita por alguns autores como Reis (2009) que observou a presença de fragmentação do DNA em células CHO-K1 tratadas

com veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* nas concentrações de 10, 50, e 100 µg/mL.

Anazetti & Melo (2007) observaram que a apoptose é uma morte diferenciada da causada por necrose, pois causa um processo ativo de colapso celular. Suhr & Kim (1996) verificaram que o veneno da cobra coreana *Agkistrodon halys* é responsável pela indução de apoptose em várias linhagens de células utilizadas no cultivo.

Após observarmos que a literatura sugere que este processo poderia decorrer da apoptose de CMN, foi corrido um gel de eletroforese após o tratamento das CMN com 2 concentrações do veneno bruto da *Bothrops moojeni*. Foi extraído o DNA da CMN tratadas com o veneno nas concentrações de 0,5 e 5 µg/mL por 24 horas. Pode-se observar que não houve a fragmentação do DNA sugerindo, e que as CMN morreram por um processo não apoptótico (apêndice 3).

5. Conclusão

A avaliação da associação intra e inter-observadores das leituras de leucócitos totais apresentou coeficiente de correlação de Spearman altamente significativo.

As doses subótimas de PHA e IL-2 agiram sinergicamente, sendo capazes de aumentar a proliferação de CMN do sangue periférico humano durante 72 horas quando adicionadas ao cultivo celular.

As concentrações 0,5 e 0,05 µg/mL do veneno bruto da serpente *Bothrops moojeni* não apresentaram atividade citotóxica sendo possível sua utilização para avaliar o seu efeito sobre CMN infectadas por microorganismos.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Anazetti, M. C. & Melo, P. S. (2007). Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp*. 1:37-58.
- Bailey. P. & Wilce. J. (2001). Venom as a Source of Useful Biologically Active Molecules. *Emergency Medicine*. 13:28–36.
- Barbosa, P. S. F.; Martins, A. M. C.; Toyama, M. H.; Joazeiro, P. P.; Beriam, L. O. S.; Fonteles, M. C. & Monteiro, H. A. S. (2010). Purification and biological effects of a C-type lectin isolated from *Bothrops moojeni*. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 16 (3):493-504
- Borkow, G. & Ovadia, M. (1999). Selective Lysis of Virus-Infected Cells by Cobra Snake Cytotoxins: A Sendai Virus, Human Erythrocytes, and Cytotoxin Model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 264:63-68.
- Borges, R. C.& Araujo, A. F. B. (1998). Seleção de hábitat em duas espécies de jararaca (*Bothrops moojeni* Hoge e *B. Neuwiedi* Wagler) (Serpentes, Viperidae). *Revista Brasileira de Biologia*. 58 (4) : 591-601
- Calvete, J. J.; Juarez, P. & Sanz, L.. (2007). Snake venomomics. Strategy and applications. *Journal of Mass Spectrometry*. 42:1405–1414

- Campbell J. A. & Lamar, W. W. (2004). Venomous reptiles of the western hemisphere. Volumes I e II. Cornell University Press, New York.
- Cardoso, A. G. T. (1999). Ação do veneno de *Bothrops moojeni* e sua fração L-aminoácido oxidase, submetida ao tratamento com raios gama de ^{60}CO , em *Leishmania spp.* Universidade de São Paulo. 55p.
- Castilho, P. (2008). Efeito da peçonha *Bothrops moojeni* sobre formas promastigotas de *Leishmania ssp.* Universidade Federal de Uberlândia. 54-55p.
- Faria, R. G. & Brites, V. L. C. (2003). Aspectos Taxonômicos e Ecológicos de *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 (Serpentes, Crotalinae) do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. *Universidade Federal de Sergipe*. 3(2):25-32.
- França, F. G. R.; Mesquita, D. O. & Colli, G. R. (2006). A checklist of snakes from Amazonian savannas in Brazil, housed in the Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília, with new distribution records. *University of Oklahoma*, Norman Oklahoma. 17:1–13.
- Gawade, S. P. (2007). Therapeutic alternatives from venoms and toxins. *Indian Journal Pharmacology*. 39:260-264.
- Gibbons, J. W.; Scott, D. E., Avis, T. R.; Ryan, J.; Buhlmann, K. A.; Acey, T. R.; Tuberville, D.; Metts, B. S.; Greene, J. L.; Mills, T.; Leiden, Y.; Poppy, S.;

- Winne, C. T. (2000). The global decline of reptiles, déjà vu amphibians. *Bioscience*. 8(50):653-666.
- Harvey, A. L.; Marshall, R. J.; Karlsson, E. (1982). Effects of purified cardiotoxins from the Thailand cobra (*Naja naja siamensis*) on isolated skeletal and cardiac muscle preparations. *Toxicon*, 20(2) 379-396.
- Howell, C. L.; Miller, M. J. & Martin, W. J. (1979). Comparison of Rates of Virus Isolation from Leukocyte Populations Separated from Blood by Conventional and Ficoll-Paque/Macrodex Methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 10(4) 533-537
- Isidoro, L. F. M. (2007). Caracterização bioquímica e funcional de uma nova L-Aminoácido oxidase Isolamento da peçonha da serpente *Bothrops pirajai*. Dissertação de Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia. 19p.
- Kirschbaum, A.; Junker, R.; Koch, G. H., Vielhaber, H., Nowak-Gottl, U. (1999). Anticoagulant response to *Agkistrodon contortrix* venom (ACV) in infants and children with genetic defects in the protein C anticoagulant pathway. *European Journal of Pediatrics* 158(15):203-204.
- Klein, J. D., Walker, F. J. (1986) Purification of a protein C activator from the venom of the southern copperhead snake (*Agkistrodon contortrix contortrix*). *Biochemistry* 25(15):4175-4179.

- Koh, D. C. I.; Armugam, A. & Jeyaseelan, K. (2006). Snake Venom Components and their Applications in Biomedicine. *Cellular and Molecular. Life Sciences*. 63:3030–3041.
- Lima, D. C.; Abreu, P. A.; Freitas, C. C.; Santos, D. O.; Borges, R. O.; Santos, T. C. Cabral, L. M.; Rodrigues, C. R. & Castro, H. C. (2005). Snake Venom: Any Clue for Antibiotics and CAM? *eCAM*. 2(1):39–47.
- Marsh, N. A. (2001). Diagnostic Uses of Snake Venom. *Haemostasis* 31:211–217
- Menez, A. (1993). Les structures des toxines des animaux venimeux. *Pour la Science*. 190:34-40.
- Ministério da Saúde (2010). Acidentes por animais peçonhentos. Aspectos epidemiológicos. Acesso em 24/11/10. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31500
- Mosca, R. C. (2008). Inibição do crescimento da microflora oral por venenos de serpentes. Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. *Universidade de São Paulo*. 50p
- Nascimento, C. N. G.; Ramos, M. O. & Lichtenstein, A. (2006) Símbolo da medicina. *Revista Medica*. 85(2):66-70.

- Nogueira, C.; Sawaya, R. J. & Martins, M. (2003). Ecology of the Pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. *Journal of Herpetology*. 37:653-659,
- Petricevich, V. L. & Mendonça, R. Z. (2003). Inhibitory potential of *Crotalus durissus terrificus* venom on measles virus growth. *Toxicon*. 42:143–153.
- Pinho, F. M. O.; Oliveira, E. S. & Faleiros F. (2004). Acidente Ofídico no Estado de Goiás. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 50: 93-6.
- Pinho, F.M.O. & Pereira, I.D. (2001). Ofidismo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 47(1): 24-9
- Reis, N. L.; Maftoum-Costa, M. & Pacheco-Soares, C. (2009) 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 Vale do Paraíba. 2165-2167.
- Ribeiro, L. A. & Jorge, M. T. (1997). Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 30:475-480.
- Ribeiro, D. A. (2000). Purificação, caracterização bioquímica e funcional de uma serinoprotease (Uruprot) do veneno de *Bothrops alternatus* (Urutu). Dissertação de Mestrado. *Universidade Estadual de Campinas*. 5p.

- Santos, A. P.; Mateus B. Bandeira, M.B. & Siqueira, L. O. (2009). Comparação entre diversos métodos de contagem diferencial de leucócitos em pacientes leucopênicos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 31(3):203-205.
- SBH. Sociedade Brasileira de Herpetologia. (2010). Brazilian reptiles – List of species. Acesso em 07/06/2010. <http://www.sbherpetologia.org.br> .
- Sell, A. M. & Costa, C. P. (2000). Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. *Acta Scientiarum*. 22(2):297-303.
- Silva, R. J. da; Silva, M. G. da; Vilela, L. C. & Fecchio, D. (2002). Antitumor effect of *Bothrops jararaca* venom. *Mediators of Inflammation*. 11:99–104.
- Silva, C. S. & Sperandin, B. R. (2005). Efeito das toxinas e neurotoxinas da serpente do gênero *Bothrops*. Revisão bibliográfica. IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de pós-graduação – Universidade do Vale do Paraíba.
- Shaikh, D. M. & Jokhio, R. (2005). Effect of Snake Venom on Nucleic Acids and Total Proteins in Various Normal and Cancerous Animal Tissues. *Pakistan Journal of Physiology*.1:1-5.

Suhr, S. & Kim, D. (1996). Identification of the Snake Venom Substance That Induces Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 224:134–139

Stábeli, R. G.; Amui, S. F.; Sant'Ana, C. D.; Pires, M. G.; Nomizo, A.; Monteiro, M. C.; Romão, P. R.T.; Guerra-Sá, R.; Vieira, C. A.; Giglio, J. R.; Fontes, M. R.M. & Soares, A. M. (2006). *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 142:371–381.

Villarrubia, V. G.; Costab, L. A. & Díez, R. A. (2004). Fosfolipasas A2 segregadas (sPLA2): ¿amigas o enemigas? ¿Actores de la resistencia antibacteriana y antiviral de la inmunodeficiencia humana? *Med Clin* 123(19):749-57.

Zhang, Yu-Jie; Wang, Jian-Hua; Lee, Wen-Hui; Wang, Q.; Liu, H.; Zheng, Yong-Tang & Zhang, Y. (2003). Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 309:598–604.

APÊNDICE

Apêndice 1

**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 ____/____/____

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 ofícios 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

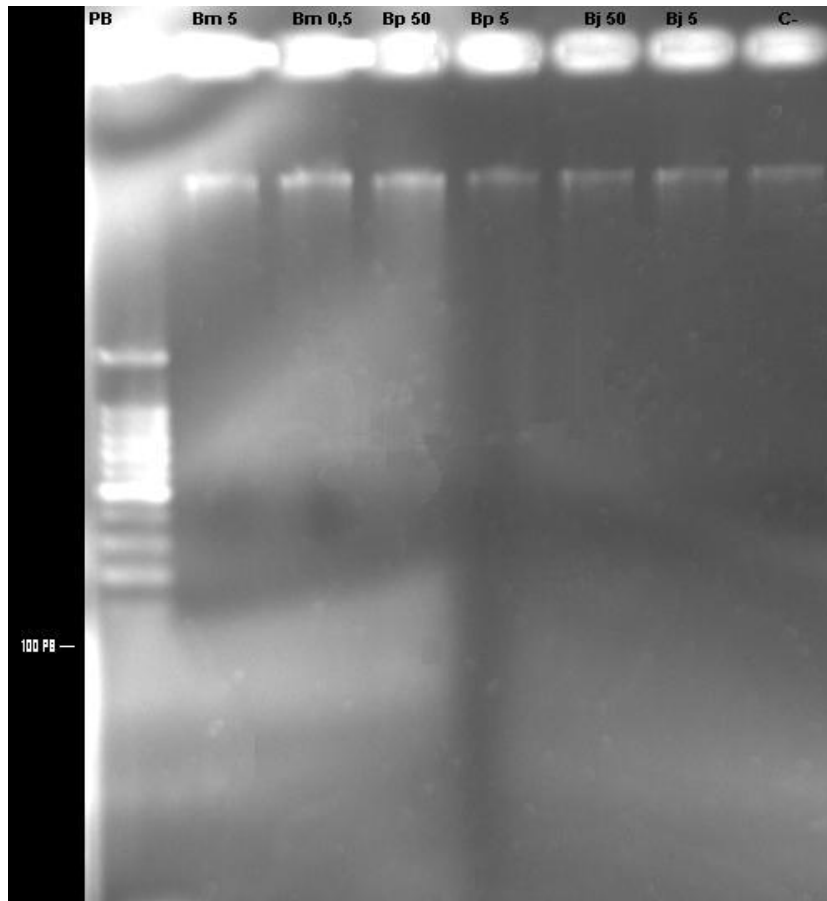
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0308/10

Apêndice 3

Gel de eletroforese após o tratamento de CMN nas concentrações de 0,5 e 0,05 $\mu\text{g/mL}$ por 6hs (A) e 24hs (B) do veneno bruto da *Bothrops moojeni*.

(A)



(B)

