



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 terrificus* EM CÉLULAS
MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO**

LEANDRO DOBRACHINSKI

**GOIÂNIA – GOIÁS
2012**





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 terrificus* EM CÉLULAS
MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO**

LEANDRO DOBRACHINSKI

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 13 DE MARÇO DE 2012 E CONSIDERADO
APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA:

1) Imtraut Araci H. Pfrimer

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

2)

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

3)

Luiz Carlos da Cunha
Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha / UFG (Membro Externo)

4)

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

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, ficado, para sempre, à margem de nós n

Fernando Pessoa

Dedico este trabalho a minha esposa **Marilissa Maciel Maineri!**

Eu caminhava sozinho... e então Deus me trouxe você, e meus dias se tornaram pequenos para tanta felicidade. Com o passar do tempo surgiram às dificuldades e os problemas pareciam não ter solução... mas novamente lá estava você, tudo se resolvia.

Um dia, já cansado e desiludido, quis tudo abandonar... E quando lágrimas rolaram, foi você quem veio me confortar. Agora finalmente chegamos lá... Que alegria... E ao meu lado está você, como no começo de tudo, sempre a me apoiar. E neste momento eu sei que não basta agradecer, porque mais do que tudo eu amo você.

*Aos meus pais, **Admar e Voni** aos quais dedico este trabalho por serem responsáveis por tudo que sou hoje, inclusive por esta conquista e que sempre me estimularam sem nunca poupar esforços para que eu realizasse meus sonhos. Sou privilegiado por tê-los ao meu lado, sempre tão presentes e dedicados e como exemplo de persistência e honestidade. Pelo amor, segurança e apoio em todos os momentos da minha vida, minha eterna gratidão.*

***Mãe**, palavra pequena, mas com um significado infinito, pois quer dizer amor, dedicação, renúncia a si própria, força e sabedoria. Teus braços sempre se abrem quando preciso de um abraço. Teu coração sabe compreender quando preciso de uma amiga. Teus olhos sensíveis se endurecem quando preciso uma lição. Tua força e teu amor me dirigiram pela vida e me deram as asas que precisava para voar.*

***Pai**, este homem que eu admiro tanto, com todas as suas virtudes e também com seus limites. Este homem com olhar de menino, sempre pronto e atento, mostrando-me o caminho da vida, que está pela frente. Este mestre contador de histórias traz em seu coração tantas memórias, espalha no meu caminhar muitas esperanças, certezas e confiança. Este homem alegre e brincalhão, mas também, às vezes, silencioso e pensativo, homem de fé e grande luta, sensível e generoso. O abraço aconchegante a me acolher, este homem, meu pai, com quem aprendo a viver. Pai, paizinho, paizão... meu velho, meu grande amigão, conselheiro e leal amigo: infinito é teu coração. Obrigado, pai, por orientar o meu caminho, feito de lutas e incertezas, mas também de muitas esperanças e sonhos!*

*Agradeço ao meu bom **Deus**, que sempre esteve ao meu lado, nas minhas quedas, nas minhas fraquezas, nas lutas e controvérsias, vitórias e derrotas. Sei que, principalmente agora, estás ao meu lado. Obrigado por este presente que agora me ofereces. Obrigado por tudo que vi, ouvi e aprendi. Obrigado pela graça. Obrigado pela Vida! Mais importante que o lugar que ocupas em mim, é a intensidade de tua presença em tudo que faço.*

*Ao meu irmão **Fernando Dobrachinski**, que sempre confiou profundamente em minha capacidade e torceu com muito orgulho por mim. Agradeço por tudo, pelos momentos de incentivo, carinho e amizade profunda.*

Mano,

“Há momentos na vida em que sentimos tanto a falta de alguém que o que mais queremos é tirar essa pessoa de nossos sonhos e abraçá-la.”

Clarisse Lispector

*A toda **minha família**, cunhados e cunhadas, **sogro e sogra**... A um homem nada se pode ensinar. Tudo que se pode fazer é ajudá-lo a se encontrar. Poucas foram às oportunidades que tive para agradecer-lhes por tão grandioso trabalho. Neste momento de alegria, no qual celebro o final de uma longa etapa, aproveito para prestar uma justa e sincera homenagem a vocês, que pela amizade, amor incondicional e orações, ajudaram-me nesta conquista.*

Agradecimentos Especiais

À Profa. Dra. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer

Ser Professora é muito mais do que transmitir o conhecimento. É aquela que ensina com dedicação e paciência, é aquela que quebra os nossos galhos, aquela que quando tudo está difícil abre um sorriso e diz: calma, você vai conseguir. É agir com simplicidade, com companheirismo, estar sempre disposta a ajudar a qualquer hora, enfim todas essas características se resumem em você, não é a toa que poço afirmar que você além de minha professora é uma grande AMIGA.

Obrigado por tudo!

Pelo tempo dedicado na orientação deste trabalho. Ao construir este sonho, não medi esforços para que todos pudessem aproveitá-lo na íntegra.

Obrigado por me dar a oportunidade de participar deste estudo, enriquecendo para sempre a minha vida.

Obrigado por fazer do aprendizado não um trabalho, mas um contentamento. Por fazer com que nos sentíssemos pessoas de valor; por nos ajudar a descobrir o que fazer de melhor e, assim, fazê-lo cada vez melhor. Obrigado por afastar o medo das coisas que pudéssemos não compreender; levando-nos, por fim, a compreendê-las...Por resolver o que achávamos complicado... Por ser uma pessoas digna de nossa total confiança e a quem podemos recorrer quando a vida se mostrar difícil...Obrigado por nos convencer de que poderíamos ser melhores do que suspeitávamos.

“O educador deve ser não um sábio, mas sim um homem diferenciado para sua educação, pela força de seus costumes, pela maturidade de seus modos, jovial, dócil, acessível, franco, enfim, em quem se encontre muito que imitar e pouco que corrigir”.

Simon Bolívar

Aos amigos *Fernanda, Aislan e José Vitélio*

Durante toda minha vida, muitas pessoas passaram por mim, dia após dia. Mas somente algumas dessas pessoas, ficarão para sempre em minha memória. Essas pessoas são ditas amigas e as levarei para sempre em meu coração, às vezes pelo simples fato de terem

cruzado meu caminho, às vezes pelo simples fato de terem dito uma única palavra de conforto quando eu precisei. Às vezes por ter me dado um minuto de sua atenção, e ouvido falar de minhas angústias, medos, vitórias, derrotas...

Às vezes por terem confiado em mim, e me contado também seus problemas, angústias, vitórias, derrotas...

Isso é ser amigo: é ouvir, é confiar, é amar.

*E amigos de verdade, ficam para sempre em nossos corações, assim como as
pegadas na alma, que são indestrutíveis.*

*E vocês meus amigos, são muito especiais e importantes para mim.
Suas amizades tem um valor enorme, e nada que eu possa dizer a vocês, pode ser
tão especial ou mais significativo do que poder chamá-los de amigos.*

Fernanda,

*Há uns que falam e não ouvimos. Há outros que nos tocam e não sentimos. Há
alguns que nos ferem e nem cicatrizes deixam. Mas há aqueles que simplesmente
vivem e nos marcam por toda vida.*

*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 do MCAS e ao **Carlos** pelo
apoio logístico no laboratório de cultivo celular e pesquisas com venenos ofídios da
PUC - Goiás.*

*Aos colegas do Núcleo de Estudos e Pesquisa Imunológica (NEPY) da Pontifícia
Universidade Católica de Goiás (PUC-GO) pela amizade e auxílio prestado ao longo
deste estudo: **Jéssica** e **Camila**, em especial aos nossos amigos **Alan** e **Eliaber**
que contribuíram para que este trabalho pudesse ser concretizado, o meu eterno
agradecimento.*

*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).*

*Maravilhoso é volver os olhos para trás e contar quantos obstáculos vencidos,
quantos sacrifícios, quantos esforços, quantas preocupações. Mas é maravilhoso
ainda olhar para frente com fé, sabendo que existe uma força maior, que nos
acompanha dia-a-dia, e que, ao descortinarmos um novo horizonte poderemos fazer
o bem, dando àqueles que precisam, um pouco do que sabemos.*

DOBRACHINSKI, L. **Avaliação da potencial atividade citotóxica da peçonha de *Caudisona durissa terrificus* em células mononucleares do sangue periférico humano.** 2012. f. 127. 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 terrificus* 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. terrificus* 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 terrificus*, 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 terrificus*, citotoxicidade, células mononucleares do sangue periférico.

DOBRACHINSKI, L. **Evaluation of the potential cytotoxic activity of *Caudisona durissa terrificus* venom in mononuclear cells of peripheral human blood.** 2012. 127 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 terrificus* 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. terrificus* 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 terrificus* 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 terrificus*, 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 de Veneno	27
1.2 VENENOS OFÍDICOS.....	30
1.2.1 Componentes do veneno da <i>Caudisona durissa terrificus</i>	33
1.2.2. Citotoxicidade e Testes de Avaliação <i>in vitro</i>	38
1.2.3 Morte Celular	40
1.2.3.1 Necrose	41
1.2.3.2 Apoptose	42
1.2.2 Aplicações Medicamentosas da Peçonha Ofídica	44
1.2.2.1 Ação Antibacteriana	45
1.2.2.2 Ação Antiparasitária	46
1.2.2.3 Ação Antiviral	48
1.2.2.4 Ação Antifúngica	50
1.2.2.5 Ação Antitumoral	50
1.2.2.6 Outras Aplicações da Peçonha Ofídica	52
2.OBJETIVOS	57
2.1 GERAL	57
2.2 ESPECÍFICOS	57
3.MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.1 CASUÍSTICA.....	58
3.2. EXTRAÇÃO DO VENENO	61

3.3. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES (CMN) DE SANGUE PERIFÉRICO HUMANO	61
3.3.1 Grau de Recuperação	62
3.3.2 Teste de Viabilidade Celular (VC)	62
3.3.3 Grau de Pureza	63
3.4. CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES.....	63
3.4.1 Ensaio de Citotoxicidade.....	64
3.4.2 Extração do DNA das CMN.....	64
3.4.3 Avaliação da potencial indução de apoptose do veneno em CMN, <i>in vitro</i>.....	65
3.5 ANÁLISE DOS DADOS.....	66
4.RESULTADOS.....	67
4.1 PADRONIZAÇÃO DA CONTAGEM DE CMN DO SANGUE PERIFÉRICO	67
4.2 AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO DE CMN.....	70
4.3 AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE CITOTÓXICA DO VENENO DA <i>Caudisona durissa terrificus</i> EM CMN DO SANGUE PERIFÉRICO.	71
4.4 AVALIAÇÃO DA POTENCIAL INDUÇÃO DE APOPTOSE DO VENENO EM CMN, <i>in vitro</i>.	73
5. DISCUSSÃO	77
6. CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS.....	91
APÊNDICES	121

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Caudisona durissa terrificus*.....21
- Figura 2.** Esquema da cabeça de um viperídeo onde se observa a posição da glândula venenosa (**gv**) e o ducto excretor (**de**), ligado à base da presa (**p**), o músculo compressor da glândula (**mcg**), o ligamento posterior (**lig**), que fixa à glândula ao crânio.....28
- Figura 3.** Macrofotografia de corte sagital, obtido da glândula de um viperídeo, onde se observa a glândula principal (**gp**) o ducto primário (**dp**), a glândula acessória (**ga**) o ducto secretor (**ds**) e o músculo compressor (**mcg**).....29
- Figura 4.** Fluxograma das atividades realizadas para obtenção de células mononucleares (CMN) do sangue periférico para cultivo celular.....59
- Figura 5.** Fluxograma do ensaio de citotoxicidade do veneno bruto de *Caudisona durissa terrificus* em CMN do sangue periférico humano para avaliação da concentração mínima não citotóxica.....60
- Figura 6.** Leituras referentes à contagem de leucócitos realizadas em câmara de Neubauer de uma mesma diluição por um único observador – Associação intra-observador68
- Figura 7.** Leituras referentes à contagem de leucócitos realizada em câmara de Neubauer de uma mesma diluição por observadores diferentes – Associação inter-observador.....69
- Figura 8.** Avaliação da viabilidade celular por exclusão com *Trypan Blue* após 0, 24, 48 e 72 horas de cultivo de CMN sem e com diferentes concentrações do veneno bruto de *Caudisona durissa terrificus*.....72

Figura 9. Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após o tratamento *in vitro* com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. durissa terrificus*. **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 negativo.....74

Figura 10. Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após o tratamento *in vitro* com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. durissa terrificus*. **A.** 3h após tratamento com 50µg/mL; **B.** 3h após tratamento com 5µg/mL; **C.** 3h após tratamento com 0,5µg/mL; **D.** 3h após tratamento com 0,05µg/mL; **E.** 3h após tratamento com 0,005µg/mL; **F.** 3h após tratamento com 0,0005µg/mL. **C.** controle negativo.....74

Figura 11. Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após o tratamento *in vitro* com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. durissa terrificus*. **A.** 6h após tratamento com 50µg/mL; **B.** 6h após tratamento com 5µg/mL; **C.** 6h após tratamento com 0,5µg/mL; **D.** 6h após tratamento com 0,05µg/mL; **E.** 6h após tratamento com 0,005µg/mL; **F.** 6h após tratamento com 0,0005µg/mL. **C-** controle negativo.....75

Figura 12. Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após o tratamento *in vitro* com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. durissa terrificus*. **A.** 24h após tratamento com 50µg/mL; **B.** 24h após tratamento com 5µg/mL; **C.** 24h após tratamento com 0,5µg/mL; **D.** 24h após tratamento com 0,05µg/mL; **E.** 24h após tratamento com 0,005µg/mL; **F.** 24h após tratamento com 0,0005µg/mL. **C.** controle negativo.....75

Figura 13. Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após o tratamento *in vitro* com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. durissa terrificus*. **A.** 48h após tratamento com 50µg/mL; **B.** 48h após tratamento com 5µg/mL; **C.** 48h após tratamento com 0,5µg/mL; **D.** 48h após tratamento com 0,05µg/mL; **E.** 48h após tratamento com 0,005µg/mL; **F.** 48h após tratamento com 0,0005µg/mL. **C.** controle negativo.....76

Figura 14. Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após o tratamento *in vitro* com diferentes diluições de veneno bruto de *C. durissa terrificus*. **A.** 72h após tratamento com 50µg/mL; **B.** 72h após tratamento com 5µg/mL; **C.** 72h após tratamento com 0,5µg/mL; **D.** 72h após tratamento com 0,05µg/mL; **E.** 72h após tratamento com 0,005µg/mL; **F.** 72h após tratamento com 0,0005µg/mL. **C-** controle negativo.....76

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
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
AST	Aspartato Aminotransferase
B16F10	Melanoma Murino
Bp-LAAO	Enzima L-aminoácido oxidase de <i>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
CK	Creatinoquinase
CEPB	Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas
CMN	Células Mononucleares
CTX	Crotoxina
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>)
HL60	Leucemia Pró-mielocítica
IL- 6	Interleucina 6
IL-2	Interleucina 2
KDa	Kilodaltons
K562	Leucemia Mielóide Crônica Humana

LAAO	L-aminoácido oxidase
LDH	Lactato desidrogenase
JURKAT	Leucemia de células T
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
RPMI	Meio de Cultura Celular que leva as iniciais do instituto onde foi desenvolvido (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
rTNF	Receptor de Fator de Necrose Tumoral
RT	Reptidase Time
RT2	Célula de Glioma de Rato
SBH	Sociedade Brasileira de Herpetologia
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SVTLEs	Enzimas de peçonha ofídica com similaridade à trombina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UNIFESP	Universidade Federal do Estado de São Paulo
VC	Viabilidade Celular
VCdt.	Veneno de <i>Caudisona durissa terrificus</i>
VDRL	Teste não treponêmico de diagnóstico da sífilis (<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>)
VERO	Células de rim de macaco

1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios o homem tem se apropriado da natureza como fonte de exploração dos recursos naturais, principalmente as plantas e os animais (GARCIA, 1995). A congregação de produtos orgânicos e os diferentes níveis de vida biológica no planeta formam a biodiversidade (WILSON, 1988). Desta forma, o termo biodiversidade expressa não só a variedade de vida, mas também a importância desta variedade para a manutenção vital (IANNI, 2005). A rica biodiversidade mundial tem servido de subsídio para a obtenção de alimentos, medicamentos e produção industrial de abrigos, vestimentas e bens de consumo (BRASIL, 2002).

O aproveitamento da biodiversidade, bem como o entendimento da sua importância como vital à sobrevivência da humanidade, passou a ser melhor compreendido com o desenvolvimento da biotecnologia. Tal recurso possibilitou compreender que quanto maior a diversidade de vida que um país possui, uma maior variedade de produtos pode ser desenvolvida, tendo como exemplo a obtenção de matéria-prima para produção medicamentosa (YUNES *et al.*, 2001).

Nesta perspectiva, Newmann & Cragg (2007) afirmam que substâncias extraídas tanto da fauna quanto da flora, possuem diversas propriedades farmacológicas. Corroborando com tal afirmativa, Viegas *et al.* (2006) destacam que a evolução científica atravessa uma importante fase na qual os estudos com espécies animais e preparados vegetais adquirem destaque, tanto na busca por novas moléculas bioativas como no entendimento de seus mecanismos de ação.

Sendo assim, a necessidade por produtos químicos e farmacológicos aumentou o interesse sobre a biodiversidade uma vez que a indústria farmacêutica recentemente retomou o entendimento de que a cura para milhares de enfermidades

humanas pode estar nos produtos extraídos dos recursos naturais biológicos (SANTOS, 2010). Por esta razão, aumenta a cada dia a convicção quanto à importância da utilização dos recursos naturais. Afinal, plantas e animais constituem parte do desenvolvimento dos seres humanos, tornando-se inegável seus benefícios em prol da humanidade (SIMÕES & SCHENKEL, 2002).

A biodiversidade brasileira é considerada uma importante fonte de riqueza, qualificando-se como a mais diversificada de toda a América Central e do Sul (GOTTLIEB *et al.*, 1998; RODRIGUES, 2005). Por possuir uma vasta gama de recursos naturais, o país passa a ocupar uma posição de destaque, não só entre os países do continente americano, mas também no cenário mundial. Este fato é demonstrado por valores estimados onde 13% das espécies descritas mundialmente pela ciência estão aqui localizadas (SILVA, 2008).

Com a crescente perspectiva no campo do desenvolvimento biotecnológico (OLIVEIRA *et al.*, 2006), o Brasil encontra-se diante de uma nova realidade, onde a possibilidade da utilização de recursos naturais associado à evolução da biotecnologia como instrumento de desenvolvimento econômico e social (VALLE & SANTOS, 2008), proporcionará ao país um importante papel de destaque no desenvolvimento econômico e científico (SOUZA, 2011). Desta forma, fazem-se necessários fortes investimentos na base acadêmica e científica, uma vez que a biotecnologia poderá desempenhar um papel importante para atingir as metas da sustentabilidade social no país (SILVEIRA *et al.*, 2004; SCHEMBERG, 2010).

Contudo, mesmo o Brasil possuindo uma grande diversidade genética vegetal e ser um dos maiores centros que congregam espécies animais, principalmente devido a sua localização geográfica, ao clima e umidade adequados e aos inúmeros fatores bióticos e abióticos a pesquisa com tais recursos ainda é reduzida, ora pelo

baixo número de pesquisadores, ora pela falta de interesse e investimentos públicos (GOTTLIEB & BORIN, 1997; VARELLA, 1997; LEWINSOHN & PRADO, 2005).

Segundo Gracia (1995), a evolução da biotecnologia, tem gerado expectativas quanto ao uso dos recursos naturais na perspectiva de resolver problemas de saúde da humanidade. Entretanto, o desafio é desenvolver estratégias que permitam a coexistência sustentável entre a biodiversidade, o desenvolvimento biotecnológico e a saúde, refletindo sempre a integração da natureza com a sociedade.

Segundo a Sociedade Brasileira de Herpetologia (2011), a fauna brasileira apresenta uma grande densidade de répteis, representados aproximadamente por 721 espécies. Estes dados adquirem relevância ainda mais significativa quando comparados ao número de espécies de répteis encontrados no mundo todo, cerca de 8.700 espécies (UETZ & HALLERMAN, 2009). Segundo Bérnils (2010), esta relação de espécies encontradas no Brasil, comparadas com a quantidade de répteis descritos mundialmente, coloca o país como a segunda nação no mundo em número de répteis.

Martins & Molina (2008) afirmam que um terço da fauna brasileira de répteis existe somente no Brasil, com destaque para a população ofídica, onde são encontradas 371 espécies de serpentes (SBH, 2011) o que segundo Valle (2005) proporcionará ao país boas perspectivas no desenvolvimento biotecnológico.

Desta forma, algumas serpentes brasileiras têm servido de subsídio para o desenvolvimento de pesquisas, dentre elas as pertencentes à família *Viperidae*, representada pelos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* que, devido avanços sobre o conhecimento das relações filogenéticas entre as serpentes, proporcionou a mudança na sua classificação de *Crotalus* para *Caudisona* (HOSER, 2009;

BERNARDE, 2011), além do gênero *Lachesis* (BARRAVIERA, 1995; BOCHNER & STRUCHINER, 2003).

O interesse na realização de pesquisas com venenos ofídicos vem adquirindo destaque ao longo dos anos (CHIPPAUX & GOIFFON, 1998), uma vez que os mesmos são fontes naturais de substâncias biologicamente ativas e com potencialidades terapêuticas (KOH *et al.*, 2006; CALKOSINSKI *et al.*, 2010) principalmente em situações que visam os cuidados à saúde humana (KREUZER & MASSEY, 2002).

Segundo Vital Brazil (1982) o estudo dos venenos animais e seus constituintes são de suma importância, pois possibilita a aquisição de conhecimentos sobre os aspectos fisiopatológicos dos envenenamentos proporcionando a aplicação de medidas mais eficientes na conduta terapêutica. Além disso, podem revelar substâncias com potencialidades terapêuticas, cujo estudo de seus constituintes químicos poderá auxiliar na descoberta de novos compostos com propriedades farmacológicas.

Estudos envolvendo ofídios passam a apresentar grande significado quando realizados com a biodiversidade do cerrado brasileiro, onde se encontram cerca de 107 espécies de serpentes, sendo deste total, 11 consideradas endêmicas (COLLI, 2005). O cerrado possui uma rica fonte de recursos naturais, que o coloca entre as 25 regiões de prioridade no mundo para estudos com a sua biodiversidade (MYERS *et al.*, 2000). Entretanto, Nogueira (2001) afirma que mesmo sendo uma vasta fonte de riquezas naturais, a diversidade biológica do cerrado ainda é pouco estudada.

Dentre as serpentes, as pertencentes ao gênero *Crotalus* adquirem destaque por apresentar o maior índice de letalidade, chegando a 11% mesmo quando o paciente recebe o tratamento com soro anti-ofídico (BARRAVIERA, 1993; FEITOSA

et al., 1997). Muitos estudos estão sendo realizados com o propósito de identificar os componentes da peçonha das serpentes deste gênero, bem como os seus mecanismos de ação e a possibilidade de aplicá-los terapeuticamente (KOH *et. al.*, 2006). Sendo assim, avaliar a potencial atividade citotóxica da peçonha de *Caudisona durissa terrificus* sobre células mononucleares do sangue periférico humano tornou-se o objetivo principal deste estudo.

Embora já existam estudos confirmando a utilização de componentes da peçonha ofídica na saúde, peçonhas de serpentes típicas do cerrado brasileiro ainda são pouco estudadas, principalmente no que se refere à sua ação contra microorganismo. Desta forma a determinação da potencial atividade citotóxica da peçonha de *Caudisona durissa terrificus* (Fig. 1) em CMN, servirá de subsídio para a sua utilização em futuras pesquisas na tentativa de testar a sua potencialidade contra microorganismos sem causar danos à saúde.



Figura 1. *Caudisona durissa terrificus*.
Fonte: Bernarde (2009).

1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS SERPENTES

Também conhecidas como ofídios, as serpentes pertencem à ordem *Squamata*, subordem *Ophidia*, e classe *Reptilia*, organizadas em três superfamílias, a *Scolecophidia* (*Typhlopoidea*), a *Henophidia* (*Boidea*) e a *Caenophidia* (*Xenophidia*). Mundialmente são encontradas cerca de 2.900 espécies de serpentes, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias, sendo que no Brasil, encontram-se cerca de 13%, representadas por 371 espécies distribuídas em 75 gêneros e 9 famílias (VIZOTTO, 2003; GRAHAN *et al.*, 2007; FRANCO, 2009; MELGAREJO, 2009; SBH, 2011).

Estes animais vertebrados apresentam características morfológicas e fisiológicas especiais que as diferenciam dos outros répteis entre elas, a ausência de membros locomotores, movimentando-se através da contração dos músculos que se inserem nas vértebras e nas costelas e da estrutura muscular ventral. A estruturação anatômica de órgãos como rins, fígado, coração e pulmões acompanha o formato alongado do corpo, sendo também desprovidas de pálpebras móveis possuindo apenas uma membrana fixa que protege a córnea (GUIMARÃES, 1979; COATES & RUTA, 2000; TERRUGGI, 2004).

Os ofídios não possuem ouvido externo ou membrana timpânica, o que os torna totalmente restritos a percepção de sons aéreos. Desta forma, sua orientação ocorre através por meio de vibrações do maxilar e do crânio. Nesta perspectiva, do ponto de vista sensorial, algumas serpentes orientam-se através de um órgão denominado fosseta loreal, representando um sistema termo-receptor de orientação, que possibilita a serpente detectar a proximidade de um animal com temperaturas

em torno de 36 a 37° C à distância de dois metros (SILVA, 2001; HICKMAN *et al.*, 2004).

As serpentes apresentam junto às áreas olfativas das narinas os órgãos de Jacobson sendo este localizado anteriormente ao palato. Esta estrutura é ricamente innervada e revestida por epitélio olfativo. A língua, com morfologia bífida, capta partículas odoríferas trazendo-as para o interior da boca entrando em contato com os órgãos de Jacobson onde substâncias químicas são enviadas até o encéfalo para a identificação de odores. Além disso, as serpentes se destacam entre os répteis por apresentarem grande extensibilidade da cavidade bucal. Isto ocorre devido o crânio e a mandíbula estarem ligados por meio de uma estrutura óssea denominada “quadradojugal” o que possibilita grande recuo da mandíbula para baixo, explicando assim a possibilidade das serpentes abrirem a boca até aproximadamente um ângulo de 180 graus. Esta característica possibilita as serpentes engolir animais vertebrados ou invertebrados inteiros durante a sua alimentação (ZUG *et al.*, 2000; POUGH, 2003; ORR, 2007).

Ressalta-se ainda o fato das serpentes apresentarem a pele revestida por escamas, organizada desta forma para além de fornecer proteção e evitar a perda de água, proporcionar a absorção de calor para a manutenção da temperatura corporal e conseqüentemente, regular o metabolismo, já que fisiologicamente apresentam dificuldade de gerar calor internamente, sendo necessária a obtenção por meio de fontes externas o que caracteriza as serpentes como tanatofídios (BRASIL, 1999; SILVA, 2001; MARQUES & SAZIMA, 2009). Este aspecto morfológico e fisiológico justifica a ampla distribuição dos ofídios em quase todos os ambientes do globo terrestre, excetuando regiões de baixas temperaturas, como as calotas polares, o que torna inviável a sobrevivência de animais ectotérmicos nestas

regiões, também sendo escassas em regiões de grandes altitudes (GREENE, 1997; KIYOMI, 2006).

Desta forma, a maioria das serpentes encontra-se distribuída em regiões de clima tropical e subtropical (STORER *et al.*, 2002) ocupando o ambiente terrestre, cujos habitats podem ser subterrâneos, dendrícolas ou até mesmo a superfície do solo. São encontradas também no meio aquático, tanto em águas continentais (dulcícolas) como oceânicas (salgadas) ou ainda com características anfíbias (TOKARNIA & PEIXOTO, 2006).

Características especiais encontradas em algumas serpentes fazendo com que estas sejam consideradas peçonhentas uma vez que, possuem glândulas produtoras de toxinas denominadas glândulas iógenas (ios = peçonhas, veneno) e presas apropriadas para a inoculá-las (SOERENSEN, 1990; ZUG, *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2005). As serpentes peçonhentas pertencem à superfamília *Caenophidia*, apresentando serpentes com alto desenvolvimento e características especializadas, com destaque para as famílias *Colubridae*, com cerca de 1600 espécies distribuídas pelo mundo todo com exceção da Antártida (PINTO, 1991; PEIXOTO *et al.*, 2004; PEIXOTO *et al.*, 2005; GRAHAM *et al.*, 2007) *Atractaspididae*, representada por 60 espécies localizadas na Ásia e na África, *Elapidae*, também distribuída por todos os continentes, com cerca de 250 espécies, exceto na Antártida e *Viperidae*, representada por 250 espécies, ausentes na Austrália e Antártida (NOGUEIRA & SAKATE, 2004; JUNQUEIRA, 2005; MELGAREJO, 2009). A família *Viperidae* congrega as serpentes de maior interesse médico, pertencendo a esta família, a serpente objeto deste estudo, e, portanto detalhada abaixo.

As espécies pertencentes à família *Viperidae* são caracterizadas pela capacidade de inocular veneno com extrema eficiência (JUNQUEIRA, 2005). Isso se deve ao fato das serpentes desta família apresentar denticção do tipo solenóglifa (*soleno* = canal, *gliphé* = sulco), ou seja, um par de presas anteriores, bem desenvolvidas, constituindo-se no mais perfeito aparelho inoculador de veneno já descrito fazendo destas serpentes, as maiores causadoras de acidentes ofídicos no Brasil (PIRES, 2004; BARRAVIERA & FERREIRA, 2005; AUTO, 2005).

A família *Viperidae* está dividida em duas subfamílias, *Crotalinae* e *Viperinae* (FRANCO, 2009). As serpentes pertencentes à subfamília *Viperinae* são conhecidas como víboras verdadeiras e localizam-se abundantemente no continente Africano, no sudoeste Asiático e no continente Europeu. Destaca-se a víbora-negra (*Vipera berus*), a víbora-de-ariete africana (*Bitis arietans*) e a víbora do norte da África (*Cerastes cornutus*), porém, não estão presentes nos continentes Americanos (ZUG *et al.*, 2000)

Como forma de caracterização da subfamília *Crotalinae* atribui-se a este grupo de serpentes a presença de fossetas nasais com finalidade termorreceptora, denominada de fosseta loreal, localizada entre os olhos e a narina (MELGAREJO, 2009). Portanto, as espécies pertencentes a esta subfamília são capaz de desferir ataques precisos contra suas vítimas mesmo durante a noite (AUTO, 2005). São cinco gêneros que representam os viperídeos da subfamília *Crotalinae* na fauna brasileira, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothrops*, *Caudisona* e *Lachesis* (SILVA, 2000; FRANCA & MÁLAQUE, 2009). Os gêneros *Bothrops*, *Caudisona*, *Lachesis* são considerados os de maior interesse médico no Brasil justificando-se pelos números descritos pelo Ministério da Saúde, onde 90% dos acidentes são ocasionados por espécies do gênero *Bothrops*, seguido pelas serpentes do gênero

Caudisona representando 7,7% dos casos e com menor ocorrência a serpente dos gênero *Lachesis* com 1,4% (BRASIL, 2002; DA SILVA *et al.*, 2003).

Entretanto, as serpentes pertencentes ao gênero *Caudisona* vem ganhando destaque nas pesquisas, tanto pelo alto índice de letalidade decorrente dos acidentes, quanto pela importância científica que a peçonha representa (FRANCISCHETTI *et al.*, 2000; CARDOSO *et al.*, 2009).

No Brasil, o gênero *Caudisona* está representado por apenas uma espécie, a *Caudisona durissa* (C.d.), sendo esta subdividida em cinco subespécies, conforme a sua coloração e distribuição geográfica, sendo possível observar diferenças morfológicas e comportamentais entre as serpentes deste gênero (PINHO & PEREIRA, 2001; CARDOSO *et al.*, 2003; CAMPBELL & LAMAR, 2004; NOGUEIRA & SAKATE, 2004; ARGÁEZ, 2006; MELGAREJO, 2009).

A *Caudisona durissa collilineata* tem predominância nas regiões sudeste e centro-oeste, já a subespécie *Caudisona durissa cascavella* predomina na região da caatinga nordestina enquanto que a *Caudisona durissa ruruima* na região norte e a *Caudisona durissa marajoensis* é encontrada na ilha de Marajó, no Pará (JORGE & RIBEIRO, 1992). Por fim, a *Caudisona durissa terrificus* é encontrada com maior frequência nos campos e matas da região sul, sudeste e centro-oeste e ainda em áreas de mata atlântica (ARAÚJO *et al.*, 2003; CAMPBELL & LAMAR, 2004).

As cascavéis também são conhecidas popularmente como boiçununga, cobra do guizo, boicinga, maracambóia ou maracá e tem sido alvo de estudos pelo número de acidentes que produzem (BRASIL, 1998; SAKATE, 2002). O Ministério da Saúde registrou o total de 1.931 acidentes crotálicos somente no ano de 2008 sendo na maioria dos casos fatais o que confere o maior índice de letalidade entre todas as espécies consideradas peçonhentas no país (CUPO *et al.*, 1990;

MELGAREJO, 2009). O mecanismo de ação do veneno é o mesmo entre as subespécies do gênero em questão, porém pode haver algumas variações como, por exemplo, ontogênica sendo a composição do veneno produzido pelo filhote diferente em relação à do adulto. A época do ano também pode influenciar na composição da peçonha, o que ocorre nas variações sazonais, bem como nas variações regionais entre serpentes pertencentes ao mesmo gênero, mas geograficamente separadas (SILVA, 2001; PEREIRA, 2004).

A ação do veneno de *C.d.terrificus* no organismo humano caracteriza-se por apresentar pouca evidência no local, porém a nível sistêmico apresentam ação neurotóxica e miotóxica, alterações na coagulação sanguínea, paralisia respiratória, diminuição da pressão arterial e a falência renal aguda (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 2009). Dependendo da gravidade do acidente crotálico, também podem ser observadas lesões em órgãos como coração, fígado e até mesmo a falência múltipla dos órgãos (CRUZ *et al.*, 2008). As serpentes do gênero *Caudisona* têm sido estudadas por causar o maior índice de letalidade em acidentes com seres humanos (PINHO & PEREIRA, 2001).

1.1.1. Glândula de Veneno

Algumas serpentes possuem um tecido especializado na produção, armazenamento e secreção de substâncias, sendo o órgão responsável por esta função denominado de glândula de veneno. Estas estruturas estão posicionadas uma de cada lado da cabeça, na região temporal atrás dos olhos e proporcionando um formato triangular a cabeça das serpentes. Ligamentos e músculos fixam a glândula ao crânio. O músculo compressor *glandulae* desempenha uma importante função no processo de inoculação do veneno uma vez que realiza a compressão da

glândula estimulando a sua liberação (MELGAREJO, 2009). Existe uma perfeita adaptação que liga à glândula a presa inoculadora, conhecida como ducto excretor (GUIMARÃES, 1979).

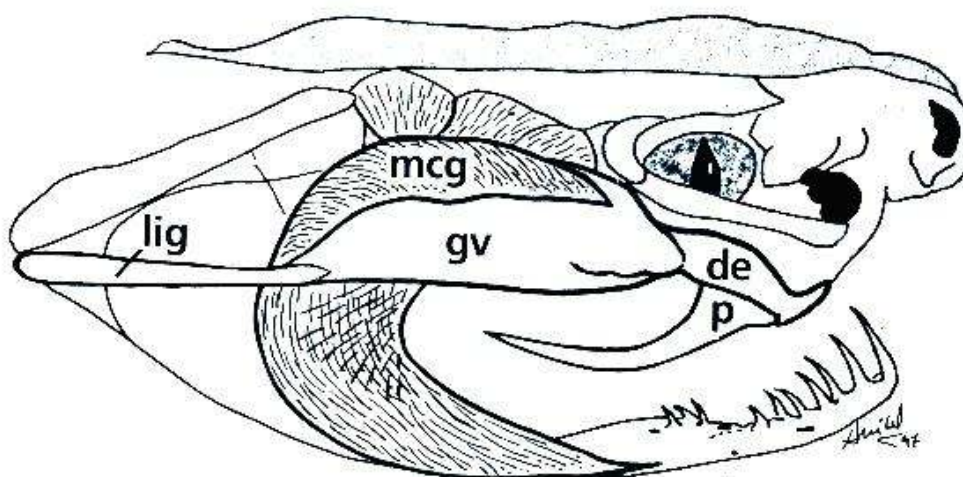


Figura 2 – Esquema da cabeça de um viperídeo onde se observa a posição da glândula venenosa (gv) e o ducto excretor (de), ligado à base da presa (p), o músculo compressor da glândula (mcg), o ligamento posterior (lig), que fixa à glândula ao crânio (MELGAREJO, 2009).

Quanto ao aspecto morfológico, a glândula pode ser dividida em quatro regiões bem definidas onde as mesmas foram descritas após estudo com diversas espécies. A glândula principal representa a parte secretora ocupando toda a porção posterior. O ducto primário que se estende para a porção anterior forma uma alça na região suborbital e que se abre na glândula acessória. A glândula acessória é formada por duas porções que contribuem com secreções durante a passagem do veneno e, por fim, o ducto secundário que se abre por dois poros na base da presa. A glândula principal é composta por túbulos ramificados, formados pelo epitélio que produz o veneno. Além disso, possui células produtoras de muco e o veneno produzido é armazenado no lúmen de diversos ductos coletores cuja função desempenhada é a de válvulas (MELGAREJO, 2009).

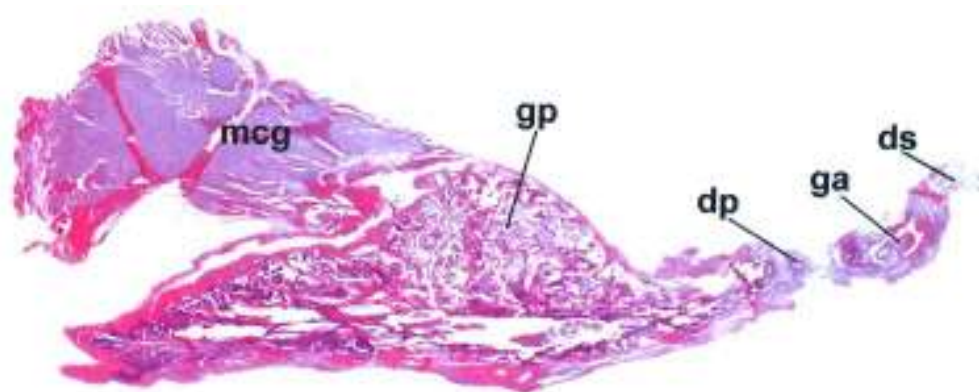


Figura 3 – Macrofotografia de corte sagital, obtido da glândula de um viperídeo, onde se observa a glândula principal (**gp**) o ducto primário (**dp**), a glândula acessória (**ga**) o ducto secretor (**ds**) e o músculo compressor (**mcg**). Corte processado no Laboratório de Histologia Comparada da Universidade Federal do Rio de Janeiro (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).

Dentre os vertebrados, as serpentes são responsáveis pela produção, secreção e armazenamento daquele que pode ser considerado o líquido mais concentrado. As toxinas produzidas pelas glândulas possuem relação direta com os níveis armazenados no lúmen glandular. Portanto, sua produção é regulada conforme a utilização do veneno pela serpente (PETERS & MAYER, 1998).

Desta forma, algumas serpentes são classificadas como animais peçonhentos não só pelo fato de possuir a glândula produtora de veneno, mas também por apresentarem estruturas inoculadoras do mesmo (SOERENSEN, 1990). Entre as famílias de serpentes, os viperídeos são os que apresentam maior importância devido à alta frequência com que ocorrem e a gravidade registrada (ARAÚJO *et al.*,

2003). Tais acidentes representam um importante problema de Saúde Pública em todas as regiões do planeta (BATISTA, *et al.*, 2007).

No mundo são encontradas cerca de 400 espécies de serpentes consideradas peçonhentas, sendo que no Brasil, 59 espécies possuem propriedades e características de produzir envenenamentos (MORENO *et al.*, 2005). Mundialmente ocorrem cerca de 2.500.000 acidentes com ofídios por ano, onde deste elevado número, 125.000 casos tem como consequência final o óbito (CHIPPAUX, 1991). O Brasil notifica anualmente 21.000 acidentes com letalidade em 0.45% dos casos embora estes números não representem a realidade, pois muitos envenenamentos e suas consequências são negligenciados, subestimando portando a sua real magnitude (BRASIL, 1999; BRASIL, 2002; SILVA *et al.*, 2009).

1.2 VENENOS OFÍDICOS

Considerado um dos fluidos mais concentrados secretados por animais, os venenos de serpentes são constituídos de vários componentes bioativos que apresentam uma ampla variedade de atividades (STOCKER, 1990; SAMPAIO *et al.* 2005; WARRELL, 2010). Os venenos de serpentes, quando desferidos contra suas presas, no intuito de facilitar a imobilização, morte e auxiliar na digestão e acidentalmente em vítimas humanas, como formas de defesa interferem na homeostase e alteram diversos processos fisiológicos, podendo levar a vítima ao óbito pela falência múltipla dos órgãos (FRANCISCHETTI *et al.*, 2000; FOX & SERRANO, 2005; MENEZES, 2006).

Dentre as substâncias orgânicas presentes nos venenos ofídicos destacam-se as proteínas e os peptídeos que representam mais de 90% do peso seco, além

de carboidratos, aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos e aminas biogênicas (BJARNASON & FOX, 1988; MARKLAND, 1998). Também estão incluídas nesta mistura complexa, substâncias inorgânicas tais como, cálcio, ferro, cobre, magnésio, potássio, manganês, sódio, cobalto, fósforo e zinco. Dentre todas as substâncias a maior parte são proteínas que possuem atividades enzimáticas (CALVETE, *et al.*, 2007).

Porém, cada espécie pode apresentar características distintas quanto às substâncias presentes e o grau de toxicidade uma vez que, fatores como a distribuição geográfica, idade do animal, gênero, hábitos alimentares, sazonalidade e fatores próprios interferem na composição química (CHPIPPAUX *et al.*, 1991; MAGRO *et al.*, 2001; STORER, 2002; CARDOSO *et al.*, 2003).

Estudos realizados com venenos de serpentes do gênero *Bothrops* mostraram diferenças na atividade biológica quando obtidos de serpentes adultas e serpentes jovens. A peçonha de serpentes jovens demonstrou maior índice de letalidade e o veneno das serpentes adultas demonstrou redução na atividade hemorrágica (ANTUNES *et al.*, 2010).

Segundo Calkosinski *et al.* (2010), as variações na composição química e toxicológica do veneno podem existir dentro da própria subespécie. O quadro 1 apresenta as substâncias presentes na peçonha de viperídeos.

Quadro 1. Substâncias encontradas em peçonhas de viperídeos.

	ENZIMAS	NÃO ENZIMÁTICOS	PEPTÍDEOS
PROTÉICAS	Metaloproteases Serino Proteases Catalases Fosfodiesterases Fosfolipases Fosfatase Alcalina Fosfatase Ácida Hialuronidasas Desoxirribonucleases Ribonucleases Adenosinatrifosfatases NAD-nucleotidasas Amilases Ativadores de fator X Fibrinogenases Ativadores de Protrombina Heparinases Oxidoredutases Transferases Acetilcolinesterases Colagenases Elastases Quininogenases Argininaesterase	Ativadores de Proteína C Fatores de crescimento de vasos endoteliais Fatores de crescimento de nervos Inibidores de protrombinase Lectinas Lectinas <i>like</i> Precursores de peptídeos bioativos Proteína de ligação plaquetária	Cardiotóxicos Citotóxicos Desintegrinas Natriuréticos Neurotóxicos Potenciadores de Bradicinina
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), neste coquetel de substâncias que compõem os venenos de serpentes existem moléculas de diversas características químicas, o que faz da glândula produtora da peçonha uma verdadeira “farmácia viva”, uma vez que estes compostos possuem atividades farmacológicas, tendo nestas moléculas bioquimicamente ativas uma fonte para pesquisadores desenvolverem novos fármacos.

Nesta perspectiva, se fazem necessários estudos com venenos de serpentes uma vez que, já foram obtidos produtos extraídos de peçonhas ofídicas e com o uso bem sucedido na clínica médica, como é o caso da extração de componentes da peçonha de *Bothrops jararaca* com atividades na hipertensão arterial (GARCIA, 2003).

Além disso, a aplicação de desintegrinas, peptídeos obtidos de venenos ofídicos, tem sido utilizada para o tratamento do câncer, demonstrando o grande valor para uso terapêutico destes compostos (KARALLIEDDE, 1995; CHEN *et al.*, 2002; WEBER *et al.*, 2006).

1.2.1 Componentes do veneno da *Caudisona durissa terrificus*

A peçonha crotálica constitui-se de uma mistura complexa de substâncias orgânicas e inorgânicas (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 2009). As proteínas e os polipetídeos compõem a maior parte do veneno, chegando a 90 - 95% do seu peso seco. A combinação destas substâncias confere alto grau de toxicidade à peçonha, cuja ação proporciona desordens metabólicas na vítima. Entre os principais efeitos causados pela peçonha, observam-se atividades neurotóxicas e cardiotoxicas, além de edematogenicidade, miotoxicidade, ações coagulantes hemostáticas, hemorrágicas, nefrotóxicas e hepatotóxicas (MARKLAND, 1998; DE BEM NETO, 2001; PINHO *et al.*, 2004). Devido a todos estes danos causados, considera-se a peçonha crotálica como uma das mais tóxicas quando comparada com peçonhas de outras serpentes brasileiras (PINHO & BURDMANN, 2000).

O veneno desempenha uma ação generalizada sobre as células e os tecidos, sendo a sua ação determinada pela composição e pela quantidade de um ou mais

constituintes específicos (RUSSEL *et al.*, 1996). A composição diversificada do veneno apresenta compostos inorgânicos como o potássio, cálcio, níquel, cobalto e sódio que desempenham papel importante a ativação de algumas enzimas (BARRAVIERA, 1993; BEGHINI, 2001). Os compostos orgânicos são representados por enzimas hidrolíticas, proteolíticas e não proteolíticas como a L-aminoxidase, enzima trombina-*like*, fosfodiesterases, atividade de caliceína do tipo tissular, NAD-hidrolase, fosfolipases, colinesterases, aminotransferases, catalases, ATPases, hialuronidases, NAD-nucleosidases e L-glicosaminidases desempenhando importantes efeitos bioquímicos, farmacológicos e imunológicos (BERCOVIC, 1987; MATSUI *et al.*, 2000).

A peçonha de *Caudisona durissa terrificus* consiste de quatro toxinas de grande importância: crotamina, convulxina, giroxina e crotoxina (ALEXANDER *et al.*, 1988; SOARES, 2007).

A **crotamina** é um polipeptídeo de baixo peso molecular, não enzimático e extremamente básica, formado por 42 aminoácidos e massa molecular de 4,8 kDa e com propriedade de resistir à temperatura de 70°C por até 18 horas, sem que haja alteração na sua atividade tóxica (SILVA, 2001; KERKIS *et al.*, 2004). A crotamina foi isolada do veneno crotálico pela primeira vez no ano de 1950 por Gonçalves e Vieira (MANCIN *et al.*, 1997). Descrita como uma miotoxina, responsável por causar mionecrose no tecido muscular e induzir a paralisia espasmódica em músculos esqueléticos de origem periférica através da despolarização do potencial de membrana das células musculares (GOPALAKRSHNAKONE *et al.*, 1984; SALVINI *et al.*, 2001; AIRD, 2002).

Estudos farmacológicos realizados demonstraram que a despolarização das células do músculo esquelético e o influxo de íons de Na⁺ ocorre pela ação direta da

crotamina nos canais de Na⁺ da membrana plasmática destas células (FLECTHER *et al.*, 1996; MELO *et al.*, 2004; OGUIURA *et al.*, 2005). Mancin *et al.* (1998) compararam o efeito analgésico da crotamina com a morfina, demonstrando que a crotamina exerceu efeitos aproximadamente 30 vezes mais potentes mesmo quando aplicadas baixas doses da toxina em camundongos. Outros estudos farmacológicos indicam que a toxina aumenta a liberação basal de acetilcolina e dopamina no tecido estriado de camundongos além de aumentar a secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas (TOYAMA *et al.*, 2000; CAMILLO *et al.*, 2001).

Outra toxina presente no veneno de *Caudisona durissa terrificus* é a **convulxina**, uma glicoproteína descrita por Prado-Franceschi em 1970 compondo cerca de 5% do peso do veneno, cuja massa molecular é de 68 kDa (BERCOVICI, 1987). Esta neurotoxina de alto peso molecular, quando administrada por via intravenosa em camundongos, após 20 minutos inicia suas manifestações através de sinais leves de apnéia, seguida de perda de equilíbrio e posteriormente o desenvolvimento de convulsões. Além disso, a convulxina é responsável por desenvolver alterações gastrintestinais e hematologicamente induz a agregação plaquetária seguida de isquemia cerebral e posteriormente a morte (PRADO-FRANCESCHI & VITAL BRAZIL, 1981).

A **giroxina** isolada por Barrio em 1961 é descrita como uma glicoproteína tóxica, porém não letal da peçonha crotálica, com peso molecular 35 kDa. Destaca-se como uma enzima semelhante à trombina com atividade esterásica, trombina-*like* e fibrinogenolítica (SEKI *et al.*, 1980). Sua ação ocorre sobre o sistema nervoso central (SNC), causando a síndrome labiríntica em camundongos, provocando movimentos rotatórios do animal ao redor de seu eixo longitudinal (ALEXANDER *et al.*, 1988). Observou-se que em tecidos do SNC de camundongos e ratos, a giroxina não alterou

a liberação basal e estimulada de neurotransmissores como a dopamina e a acetilcolina o que sugere a ausência de ação neurotóxica direta da toxina (CAMILLO *et al.*, 2001).

A **crotoxina (CTX)** é o componente em maior concentração no veneno de *Caudisona durissa terrificus* responsável pela composição de 65% do total da peçonha e considerado o principal componente tóxico, sendo sua descoberta descrita no ano de 1938 por Slota e Fraenkel-Conrat (BERCOVIC, 1987; GARCIA *et al.*, 2003). Com peso molecular de 24 – 26 kDa, a crotoxina é formada por um complexo não covalente de duas diferentes subunidades: uma subunidade ácida, um polipeptídeo sem atividade enzimática com peso molecular de aproximadamente 9,5 kDa conhecida como crotapotina ou crotoxina ácida (CA). A outra subunidade é descrita como uma fosfolipase A₂ alcalina com peso molecular de aproximadamente 14,5 kDa, com forte atividade enzimática e pouca toxicidade denominada crotoxina básica (CB) (BON *et al.*, 1988). A subunidade CB pertence ao grupo das β-neurotoxinas sendo a responsável pela atividade enzimática da crotoxina e classificada como uma miotoxina com estrutura de fosfolipase A₂ e propriedades neurotóxicas (AIRD & KAISER, 1985; NOVAIS *et al.*, 2006; PONCE-SOTO *et al.*, 2006).

As subunidades CA e CB associam-se de modo não covalente na proporção 1:1, formando o complexo crotoxina e desta forma promovendo a inibição da atividade fosfolipásica, porém com aumento significativo da toxicidade. Acredita-se que os componentes que formam a CTX sofrem dissociação logo após a interação com as membranas biológicas onde a CB liga-se à membrana e desencadeia o efeito e a CA sem atividades farmacológicas é liberada do complexo (HABERMANN & BREITHAUPT, 1978; CHOUMET *et al.*, 1996). A subunidade CB pode ligar-se de

maneira inespecífica à membrana de vários tipos de células, sendo assim o componente CA atua como um direcionador prevenindo a ligação inespecífica da CB às membranas, promovendo o reconhecimento específico dos sítios alvo para que a CB exerça suas atividades farmacológicas. Desta forma, quando a CB encontra-se associada a CA, sua atividade hidrolítica é reduzida, no entanto, as atividades neurotóxicas e miotóxicas são potencializadas (CHANG *et al.*, 1981; BON *et al.*, 1989; CHISARI *et al.*, 1998).

O estudo sobre a atividade tóxica das crotoxinas e frações CB isoladas da peçonha de *C. d. terrificus*, *C. d. cascavella* e *C. d. collilineata* realizado por Santos *et al.* (2004), demonstrou que as frações CB apresentam menor atividade neurotóxica, miotóxica e edematogênica em relação a crotoxina demonstrando assim que a interação entre as subunidades CA e CB é essencial para a elevação da toxicidade desta proteína.

A atividade neurotóxica do complexo crotoxina ocorre devido à ação pré-sináptica, inibindo a liberação da acetilcolina em junções neuro-musculares bloqueando assim a transmissão neuromuscular e, além disso, a fração CB exerce efeito anticoagulante, bactericida e edematogênico e pode ser considerada a responsável pelo efeito nefrotóxico e ocasionar parada respiratória de origem periférica (KOUYOUMDJIAN *et al.*, 1986; HAWGOOD, 1990; CURA *et al.*, 2002; AMORA *et al.*, 2006). O efeito miotóxico resulta da capacidade da toxina afetar diretamente as células dos músculos esqueléticos induzindo a miotoxicidade sistêmica, demonstrada pela presença de mioglobínúria, mioglobulinemia e com elevação dos níveis de creatinoquinase (CK), lactato desidrogenase (LDH) e aspartato aminotransferase (AST) (SALVINI *et al.*, 2001; CURY *et al.*, 2007; AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 2009)

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, ex: (defensinas, componentes do sistema complemento, TNF, perforina/granzimas) (NOVAES, 2004).

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 pelo qual 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 a redução do tetrazólio (MTT), incorporação do vermelho neutro, incorporação da timidina tritiada, método de difusão em ágar, método de extração e o método de *Trypan blue*, dentre outras (LONNROTH & DAHL, 2003; SUSINI *et al.*, 2006).

O teste de exclusão de células mortas com *Trypan blue*, 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 entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular (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 (KUMAR *et al.*, 2005).

As células necróticas são incapazes de manter a integridade das membranas, acarretando um influxo de água e íons extracelular, 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 (KUMAR *et al.*, 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).

1.2.2 Aplicações Medicamentosas da Peçonha Ofídica

As propriedades funcionais e farmacológicas das peçonhas ofídicas estão despertando o interesse de pesquisadores principalmente pela possibilidade da aplicação clínica destes compostos. Nesta perspectiva, as substâncias presentes no veneno de serpentes, devido a suas funções biológicas, passaram a servir de ferramentas bioquímicas em biotecnologia e pesquisas biomédicas (LIS & SHARON, 1998). A importância da utilização do veneno ofídico na saúde fica evidente na descoberta de um peptídeo potencializador da bradicinina no final da década de 40 quando Rocha e Silva *et al.* estudavam a ação da peçonha de *Bothrops jararaca*. Estudos posteriores levaram ao desenvolvimento do “captopril” fármaco comercializado mundialmente e utilizado no tratamento da hipertensão arterial, na insuficiência cardíaca congestiva e na doença arterial coronariana (CAMARGO, 1999).

Sendo assim, o interesse científico para compreender estruturalmente e funcionalmente a peçonha ofídica vem trazendo contribuições significativas no desenvolvimento de novas drogas utilizadas no tratamento de diversas enfermidades bem como na produção de kits laboratoriais para fins de diagnósticos (OLIVEIRA, 2006).

1.2.2.1 Ação Antibacteriana

Componentes do veneno de serpentes têm sido estudados para avaliar sua ação sobre bactérias. Marcussi *et al.* (2004) isolaram a L-aminoácido oxidase (LAAO) do veneno de *Bothrops moojeni* e posteriormente testaram a atividade bactericida sobre *Escherichia coli* DH5. Concluíram que a LAAO possui ação bactericida, mostrando-se uma enzima promissora e que pode ser utilizada futuramente no desenvolvimento de novos medicamentos.

No estudo de Ticle (2006), foi demonstrada a ação da LAAO obtida da peçonha de *Bothrops jararacussu* sobre as bactérias *E. coli* e *S. aureus* uma vez que ocorreu a redução significativa do número de colônias quando incubou-se junto com as bactérias no período de 60 minutos.

A ação antibacteriana da LAAO obtida da peçonha de *Ophiophagus hannah* também foi testada contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Para efeito de comparação, utilizou-se no estudo vários antibióticos como cefataxima, canamicina, tetraciclina, vancomicina e penicilina testados nas mesmas condições do veneno. Os resultados demonstraram que a LAAO inibiu eficientemente duas bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*), porém foi moderadamente eficaz contra três bactérias Gram-negativas, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli* (LEE *et al.*, 2011).

A atividade de componentes da peçonha ofídica contra bactérias gram-negativas e gram-positivas também foi demonstrada no estudo realizado por Páramo *et al.* (1998) por meio do isolamento de duas miotoxinas do veneno de *Bothrops*

asper (Lys49 e Asp49) com atividade bactericida. Torres *et al.* (2010) identificaram a atividade inibitória exercida pela LAAO da *Bothrops marajoensis* no crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Outro estudo realizado com a fração LAAO da *Bothrops pauloensis* também demonstrou atividade de supressão do crescimento sobre bactérias gram-negativas e gram-positivas (RODRIGUES *et al.*, 2008).

1.2.2.2 Ação Antiparasitária

Estudos desenvolvidos por Gonçalves *et al.* (2002) e Deolindo *et al.* (2005) utilizando o veneno da serpente *Bothrops jararaca*, demonstraram que a peçonha afetou o crescimento do *Trypanosoma cruzi* e de *Leishmania* spp., promovendo alterações estruturais e no crescimento das formas parasitárias epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi* e também das formas promastigotas de *Leishmania major*. Com o término do estudo, os pesquisadores concluíram que o veneno inibiu de maneira eficaz o crescimento do *T. cruzi* e de *L. major* através da desagregação do aparelho mitocondrial do parasito restringindo assim a produção de energia pelo mesmo (GONÇALVEZ *et al.*, 2002). O estresse induzido na forma epimastigota do *T. cruzi*, induziu um processo de morte celular programada, similar à apoptose, levando o parasito à morte. Esse fenômeno decorreu do aumento do volume mitocondrial, fragmentação de DNA nuclear e exposição de fosfatidilserina (DEOLINDO *et al.*, 2005).

Outro estudo realizado com a finalidade de avaliar os efeitos *in vitro* do veneno de *Caudisona durissa terrificus* e *Bothrops jararaca* sobre o crescimento e a aderência de trofozoítos de *Giardia duodenalis* foi desenvolvido por Shinohara *et al.*

(2006). Os autores afirmaram que ambos os venenos inibiram o crescimento dos trofozoítos sendo que o nível de inibição variou conforme as concentrações aplicadas e o tempo de incubação. Sendo assim, a redução do crescimento foi proporcional à concentração crescente do veneno e no que diz respeito à aderência do parasito não foi observado nenhum efeito.

O estudo realizado por Tempone *et al.* (2001) demonstrou que a LAAO extraída do veneno de *Bothrops moojeni* provocou a morte de formas promastigotas de *Leishmania spp*, *in vitro*, evidenciando assim a possibilidade de desenvolver um agente terapêutico contra a leishmaniose utilizando tal recurso. Os pesquisadores destacaram a atividade leishmanicida à produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Além disso, a LAAO obtida do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* causou a inibição das formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e *amazonensis* (TORRES *et al.*, 2010).

A ação antiparasitária da LAAO obtida da serpente *Bothrops jararacussu* foi testada por Ticle (2006) sobre *T. cruzi*, *L. donovani*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*. A ação leishmanicida da enzima ocorreu sobre todas as espécies de leishmanias avaliadas, porém com maior relevância sobre a *L. braziliensis* uma vez que a enzima apresentou ação sobre mais de 77% dos parasitas. A ação tripanocida apresentou excelentes resultados, pois a enzima causou a lise de mais de 60% das formas tripomastigotas do *T. cruzi* “*in vitro*”, já que dificilmente uma droga utilizada no tratamento da parasitose proporciona tais resultados.

Uma metaloprotease denominada neuwiedase, obtida do veneno de *Bothrops pauloensis*, apresenta capacidade de impedir a adesão do *Toxoplasma gondii* à célula alvo. Este processo ocorre pela degradação de proteínas expressas pelos fibroblastos que formam a laminina. A laminina potencializa a fixação do *T. gondii*

nas células alvo e neste caso, a sua degradação diminui a infecção parasitária (BASTOS, 2008).

1.2.2.3 Ação Antiviral

Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de avaliar a atividade antiviral do veneno de serpentes. Zhang *et al.* (2003) realizaram a caracterização molecular de uma LAAO obtida do veneno de *Trimeresurus stejnegeri* designada posteriormente de TSV-LAO, demonstrando através de sua pesquisa a potencialidade da mesma como anti-HIV possibilitando futuramente o desenvolvimento de novos fármacos.

Peptídeo obtido do veneno da serpente *Naja naja siamensis*, no estudo realizado por Meenakshisundaram *et al.* (2009) também demonstrou atividade contra o HIV. Após obtenção da *Imunocina*, a mesma diminuiu a infecção de linfócitos pelo HIV e pelo vírus da imunodeficiência felina. A ação do veneno da serpente *C.d.terrificus* também foi testado contra o vírus do sarampo, onde células obtidas dos rins de macacos (VERO) infectadas com o vírus foram tratadas com diferentes concentrações não citotóxica do veneno. Observou-se um efeito inibidor da adsorção do vírus às células tanto quando o veneno fora adicionado antes como durante a infecção (PETRICEVICH & MENDONÇA, 2003)

Fernard *et al.* (2001) realizaram uma pesquisa utilizando 12 peptídeos sintéticos derivados da fosfolipase A2, presente no veneno de serpentes. Os autores demonstraram que tais compostos possuem uma excelente atividade contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) uma vez que o peptídeo p3bv bloqueia a ligação do HIV-1 às células T, ligando-se ao receptor CXCR4.

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 à capacidade da PLA2 utilizar receptores específicos do tipo N para a realização dos seus efeitos. Tais receptores são encontrados em diversos tecidos incluindo as células do sistema imunitário.

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 comparado às outras fases do experimento.

1.2.2.4 Ação Antifúngica

Alguns estudos também demonstram a ação dos venenos ofídicos com potencial atividade antifúngica. Magaldi *et al.* (2002) demonstrou que a peçonha de *Caudisona durissa cumanensis* possui ação contra leveduras e fungos filamentosos, já que no estudo 78,6% e 50% respectivamente foram susceptíveis ao veneno da serpente. A ação da peçonha ofídica como agente antifúngico também foi demonstrada em outros estudos.

Murillo *et al.* (2007) utilizaram um peptídeo sintético homólogo à fosfolipase A2 obtido da peçonha de *Bothrops asper*, com a finalidade de testar sua atividade antifúngica. Os pesquisadores concluíram que o componente ofídico utilizado exerceu atividade fungicida contra a espécie de *Candida albicans*, determinando sua potencialidade para o desenvolvimento de novos fármacos. Da mesma forma, Torres *et al.* (2010) utilizando a LAAO da peçonha de *Bothrops marajoensis*, demonstraram que a mesma inibiu o crescimento de *Candida albicans*.

1.2.2.5 Ação Antitumoral

A utilização de venenos ofídicos como agentes antitumorais vem sendo proposta desde o início do século passado. Estudos realizados recentemente demonstraram que a administração do veneno total da serpente *Bothrops jararaca*, reduzia o crescimento do tumor ascítico conhecido como tumor de Ehrlich, em murinos, através da inibição da síntese de Interleucina-6 (IL-6), onde se observou o aumento na sobrevivência do camundongo (SILVA *et al.*, 2002; ABU-SINNA *et al.*, 2003). A pesquisa realizada por Ticli (2006) demonstrou a ação de uma LAAO obtida da peçonha de *Bothrops jararacussu* sobre células tumorais SKBR3 e células não

tumorais. Seus resultados apontaram para a possibilidade futura de produzir fármacos a partir desta LAAO já que a mesma apresentou citotoxicidade superior para as células tumorais em relação às células normais.

Freitas (2006) conseguiu uma redução significativa em 50% no tamanho do tumor em ratos, utilizando a peçonha de *Lachesis muta muta*. O autor atribui tal resultado à redução da angiogênese e inibição da agregação plaquetária. Hernandez *et al.* (1993) testaram frações da peçonha de *C.d.terrificus* contra sarcoma de ratas. Observaram resultados positivos quanto à regressão do tumor e ao tempo de sobrevivência dos animais. Lipps (1994) avaliou o efeito antitumoral em células de mieloma de ratos utilizando frações purificadas da peçonha de *Caudisona atrox* e *Naja naja kaouthia*. Os pesquisadores observaram que a atividade antitumoral das frações combinadas foi superior em relação ao uso separado. Além disso, não observaram efeitos citotóxicos em células normais.

A utilização de proteínas obtidas de peçonhas ofídicas apresenta propriedades de conter o desenvolvimento de metástases. No estudo realizado por Motta (2009) observaram que diferentes desintegrinas purificadas da peçonha de *Bothrops jararaca*, *Agkistrodon rhodostoma* e *Trimeresurus flavoviridis* reduziram a migração de células de um tipo de melanoma com grande capacidade de formar metástases. O mecanismo deve-se ao bloqueio ou a alteração funcional que a desintegrina realiza sobre proteínas presentes na membrana celular que são utilizadas pelas células cancerígenas para realizar a multiplicação.

1.2.2.6 Outras Aplicações da Peçonha Ofídica

Estudos com proteínas do veneno de serpentes como a enzima trombina-*like* estão sendo testadas clinicamente no tratamento de tromboembolismo uma vez que essas enzimas possuem a capacidade de interferir nos fatores de coagulação como na liberação de fibrinopeptídeos e fatores hemorrágicos (SELISTRE & GIGLIO, 1987).

Outras proteínas extraídas de venenos ofídicos já vêm sendo comercializadas devido suas ações farmacológicas no controle da coagulação sanguínea e agregação plaquetária como é o caso do Batroxobin[®] e do Protac[®] (OLIVEIRA, 2006).

O veneno da serpente *Calloselasma rhodostoma* encontrada no continente Asiático foi estudado pelos pesquisadores do Health Science Center da Universidade do Texas em San Antonio, nos Estados Unidos. Os mesmos 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. Este fato foi verificado após ser administrado o Ancrod[®], medicamento produzido a partir do veneno da serpente ter causado a diminuição do fibrinogênio ocasionando a anticoagulação e diminuição da viscosidade sanguínea resultando em uma melhora na circulação. O estudo foi realizado com 500 pacientes vítimas de derrames cerebrais, onde 42% que receberam o medicamento nas primeiras 3 horas após o derrame tiveram boa recuperação funcional motora (SHERMAN *et al.*, 2000).

Alguns componentes de venenos ofídicos têm servido de subsídio para o desenvolvimento de materiais para uso diagnóstico em doenças que afetam os fatores de coagulação (GAWADE, 2007). Enzimas de peçonha ofídica com

similaridade à trombina (SVTLEs) são utilizadas em testes clínicos de amostras sanguíneas com heparina uma vez que, estas enzimas não sofrem ação do anticoagulante. O teste do Reptilase Time (RT) que detecta anormalidades do fibrinogênio é um exemplo da utilização clínica destes compostos extraídos da peçonha ofídica (FUNK *et al.*, 1971).

A enzima trombina-*like* purificada a partir da peçonha de *Bothrops atrox* é amplamente utilizada, pois possui ação desfibrinogenante sendo útil no tratamento de doenças cardiovasculares como trombose e outras coagulopatias (MARSH & WILLIAMS, 2005). A proteína fibrinolítica obtida do veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus* encontrada na América do Norte, apresentou atividades fibrino e fibrinogenolíticas associadas à ausência de atividades hemorrágicas, despertando o interesse de pesquisadores para sua utilização terapêutica contra trombose (RAMOS, 2001).

Estudo realizado por Lozano (2002) possibilitou a identificação de duas enzimas conhecidas como trombina-*like* e fosfolipase A2, obtidas da peçonha da serpente *Bothrops atrox* (jararaca amazônica), com potencialidade de bloquear a formação de coágulos na corrente sanguínea. Segundo o pesquisador, a ação da enzima trombina-*like* proporciona a degradação do fibrinogênio o que leva a formação de coágulos fracos e a sua presença na corrente sanguínea ativa uma enzima que destrói os coágulos já formados. Desta forma, a ação dessa enzima, associada à baixa concentração de fibrinogênio causada pela trombina-*like*, forma um potente sistema inibidor da coagulação. Já a fosfolipase A2 identificada, possibilita a inibição da agregação plaquetária induzida pelo ADP, uma vez que a fosfolipase A2 compete pelos receptores para ADP nas plaquetas e impede a

ligação. O pesquisador acredita que estes dois compostos possam dar origem a novos medicamentos.

Além de moléculas que atuam no sistema circulatório e na coagulação, outros estudos vêm sendo desenvolvidos na busca de moléculas que possam ser utilizadas no desenvolvimento de novos produtos. Componentes obtidos de venenos de serpentes têm sido utilizados como “colas biológicas”. Segundo Stolf (1998), ao interagir fibrinogênio de búfalo com a fração trombina-*like* obtida do veneno de serpente ocorre à liberação de uma fibrina monomérica que na presença do fator XII e do cálcio torna-se polimérica agindo como uma cola biológica, permitindo a união de bordas de feridas. Os resultados foram obtidos após a realização de uma pesquisa onde se comparou a capacidade de síntese e ação homeostática do adesivo na cirurgia cutânea com sutura realizada com fio monofilamentoso. Não foram detectados efeitos tóxicos em nível local ou sistêmico verificando-se que o adesivo de fibrina obtido do veneno de serpente teve capacidade adesiva total em 66,7% e parcial em 33,3% dos pacientes, tornando-se um método alternativo para cirurgia cutânea (STOLF, 1998).

O estudo de Oliveira (2001) avaliou a aplicabilidade do adesivo de fibrina constituído de fibrinogênio derivado do plasma de búfalos, cloreto de cálcio e trombina-*like* derivada do veneno ofídico, em enxertos gengivais livres e comparando-os com suturação. Concluiu-se que o adesivo de fibrina apresentou vantagens sobre a sutura convencional como facilidade de aplicação, melhor recuperação pós-operatória e reparação tecidual mais rápida (OLIVEIRA, 2001). Gatti (2009) realizou um estudo para avaliar o tratamento de úlceras venosas com adesivo cirúrgico derivado do veneno de serpente. O pesquisador concluiu que os pacientes tratados evoluíram mais rapidamente para a cicatrização, com redução

considerada da dor e com aceleração do processo de alta. Em termos financeiros, a utilização do adesivo derivado do veneno de serpente reduz consideravelmente os custos do tratamento, uma vez que, é mais barato que os adesivos disponibilizados no mercado brasileiro.

É importante ressaltar que nos estudos realizados por Stolf (1998), Oliveira (2001) e Gatti (2009) não foram citadas as serpentes utilizadas para a preparação da cola biológica, provavelmente com a finalidade de desenvolver e patentear um novo produto.

Ao analisar a influência da cola de fibrina derivada do veneno de *C. d. terrificus*, na fixação e integração de enxertos de pele, Amaral *et al.* (2004) observaram que os enxertos fixados com cola de fibrina apresentaram avanço no estágio de recuperação. Os autores concluíram que a cola de fibrina favorece a integração do enxerto cutâneo.

Ramos *et al.* (2007) realizaram um estudo *in vitro* e *in vivo* com camundongos, utilizando uma proteína obtida do veneno da serpente *Bothrops alternatus*, com a finalidade de demonstrar sua potencialidade de atuar como cicatrizante e de regenerar tecidos lesados. Concluíram seu estudo afirmando que dependendo da concentração utilizada de altargina-C (toxina isolada do veneno) tanto poderá promover a formação como a inibição de novos vasos sanguíneos. Em concentrações elevadas, ocorrerá a inibição da angiogênese, tendo a possibilidade futura de ser utilizada no tratamento do câncer e de metástases. Já em concentrações baixas a proteína estimula a formação de novos vasos sendo esta proteína uma possível candidata ao desenvolvimento de fármacos para atuar em patologias vasculares.

Percebe-se que ao longo dos anos muitos estudos têm sido desenvolvidos, proporcionando grandes avanços nas pesquisas com toxinas ofídicas na tentativa de desenvolver produtos que possam ser utilizados na saúde, principalmente aqueles com potencialidades farmacológicas. Porém, as pesquisas em que são descritas a utilização de peçonhas de espécies de serpentes típicas do cerrado brasileiro ainda são escassas. Sendo assim, os componentes presentes nas peçonhas de serpentes encontradas no centro-oeste brasileiro podem constituir importantes opções para a descoberta de novas ferramentas farmacológicas e substâncias que poderão auxiliar no tratamento e na prevenção de doenças, principalmente quando relacionadas a microorganismos.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o potencial citotóxico da peçonha de *Caudisona durissa terrificus* 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 terrificus* sobre as CMN do sangue periférico humano, *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

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 4 e 5.

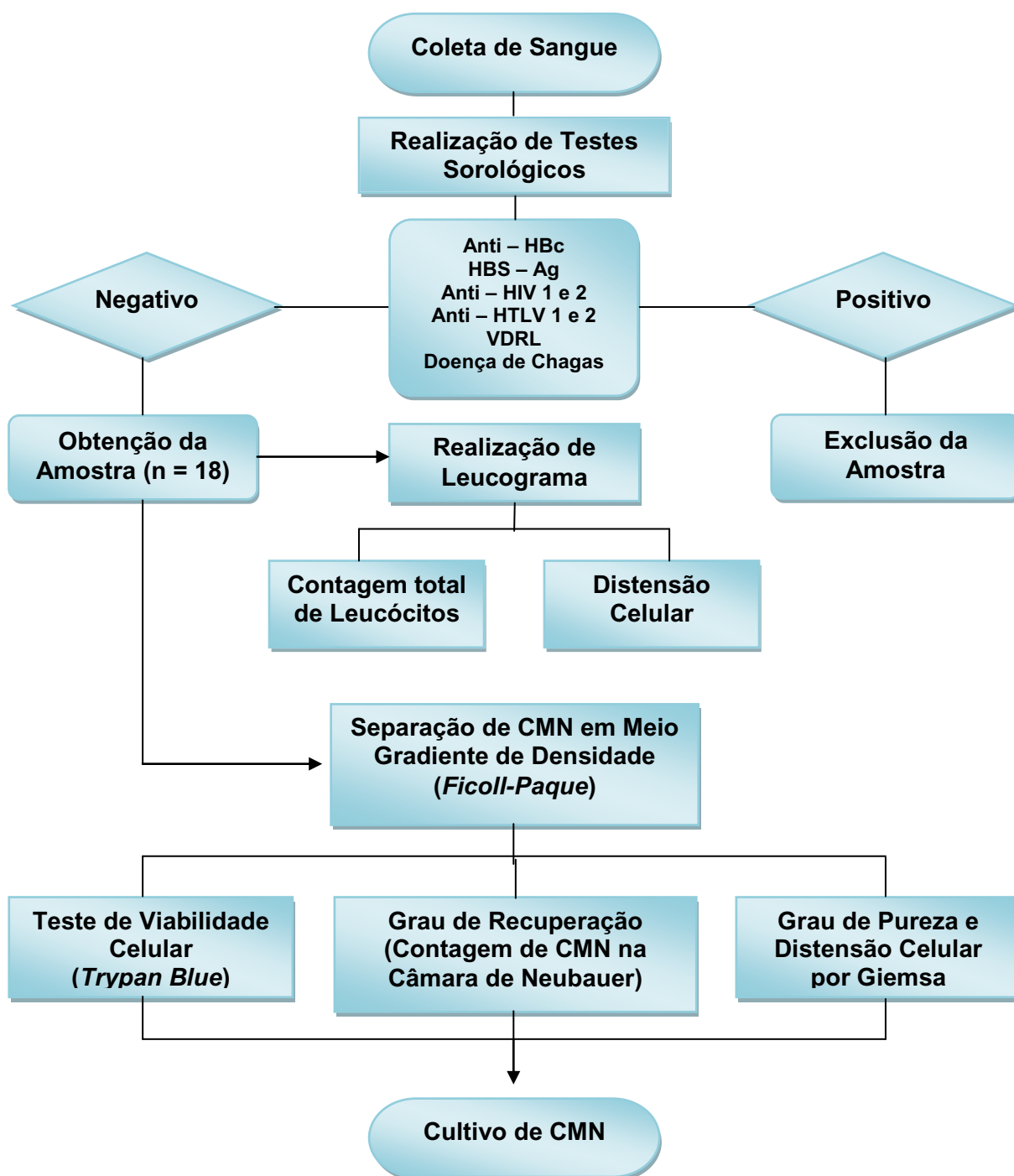


Figura 4: Fluxograma das atividades realizadas para obtenção de células mononucleares do sangue periférico humano (CMN) para a realização do cultivo celular.

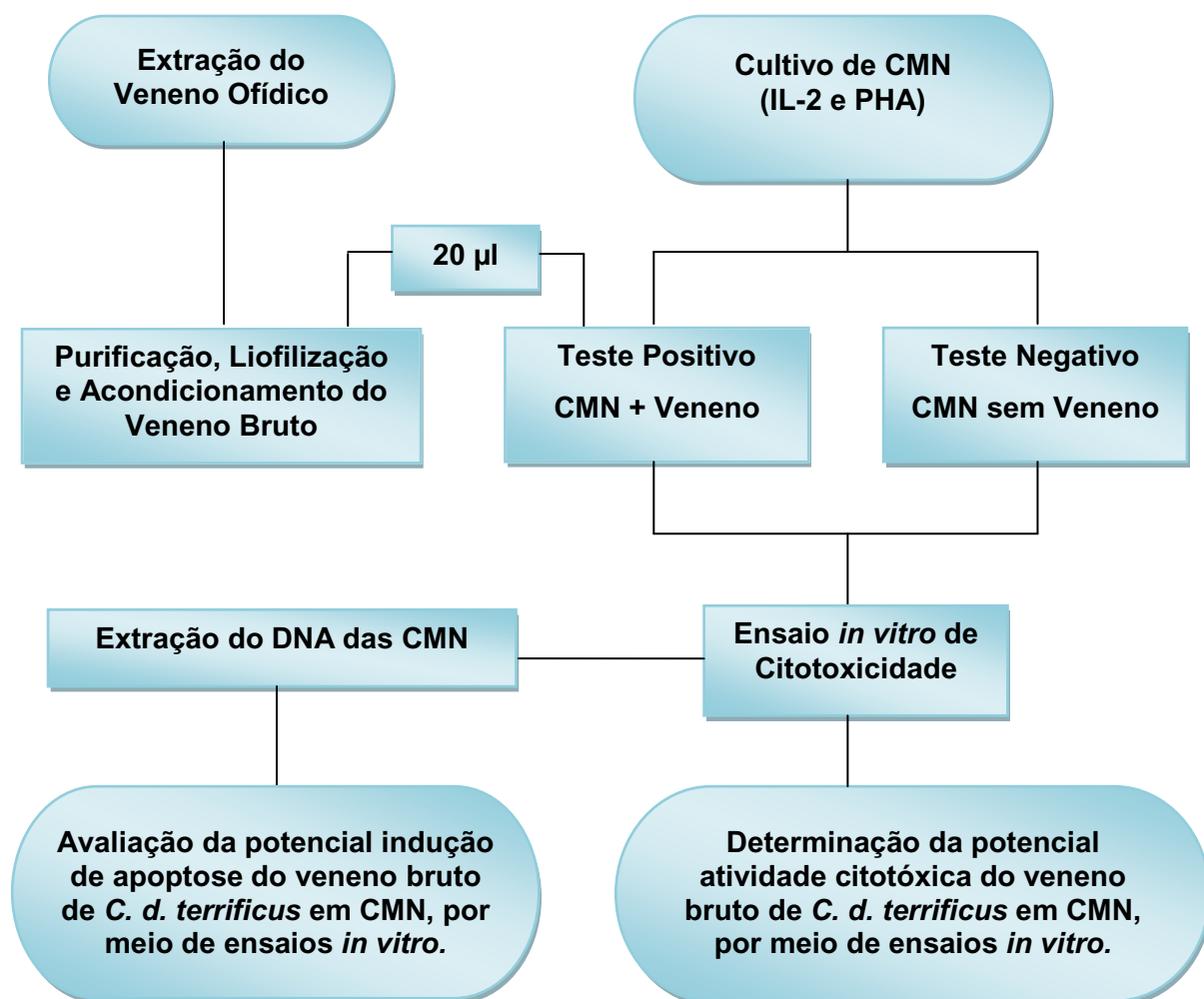


Figura 5 – Fluxograma do ensaio da potencial atividade citotóxica e indução de apoptose *in vitro*, do veneno bruto de *Caudisona durissa terrificus* em células mononucleares do sangue periférico humano.

3.2. EXTRAÇÃO DO VENENO

O veneno da serpente *Caudisona durissa terrificus*, 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, liofilizado e acondicionado a -86°C.

3.3. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES (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 20µL de sangue em 400µL 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 por meio 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 a realização do teste de viabilidade celular foi utilizado o corante de exclusão *Trypan Blue* que apresenta afinidade maior por proteínas do soro do que por proteínas celulares e onde as células não viáveis ficam coradas de azul. Para tanto, se utilizou 10µL da suspensão de CMN diluída em 10µL do corante, sendo a leitura realizada na câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi calculada pela seguinte fórmula:

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

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, 2×10^5 células/mL foram distribuídas em cada poço da placa de cultivo e ativadas com $1 \mu\text{g}$ de Fitohemaglutinina (PHA) (Pharmacia[®]) (dose subótima) e 20 UI de Interleucina 2/mL (IL-2) (Amersham[®]), em meio RPMI, acrescido de 10% de SFB e mantidas por 72 horas à temperatura de 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 triplicada 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 leveduriformes em microscopia óptica.

3.4.1 Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando o corante *Trypan Blue* nas soluções contendo diferentes concentrações do veneno bruto de *Caudisona durissa terrificus*. 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 em triplicata. As CMN expostas ou não ao veneno foram incubadas e visualizadas em diferentes períodos. Realizou-se a homogeneização das células de cada poço antes da retirada de uma alíquota de 10µL, sendo esta posteriormente homogeneizada com 10µL de *Trypan Blue* 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 das CMN

As CMN submetidas ao tratamento ou não com diferentes concentrações do veneno bruto de *C. d. terrificus* 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 tubo *Eppendorf* 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 *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 a polimerização do gel. Depois, 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 CMN DO SANGUE PERIFÉRICO

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 por dois avaliadores. Essa caracterização denominada de avaliação da associação intra e inter-observador, possibilita tornar o experimento o mais fidedigno em todo o seu processo.

Os resultados obtidos pelos avaliadores foram comparados por meio de correlação de Spearman, a fim de se verificar o grau de concordância entre as contagens.

Os resultados obtidos encontram-se apresentados nas Figuras 6 e 7.

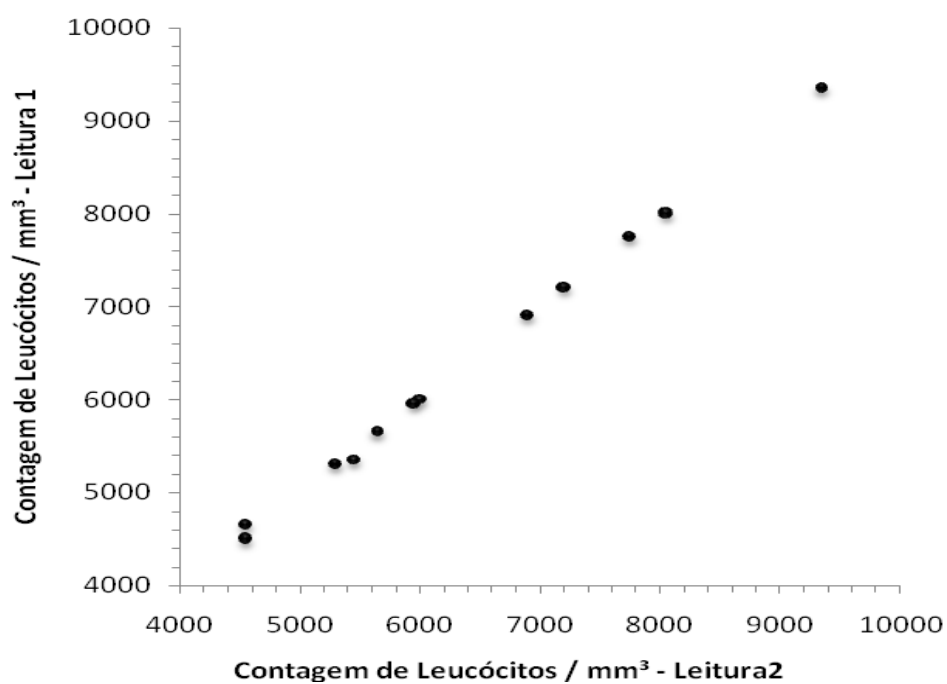


Figura 6 – Associação intra-observador da contagem de leucócitos/mm³ em câmara de Neubauer de uma mesma diluição por um único observador ($r=0,999$; $P < 0,001$, correlação de Spearman).

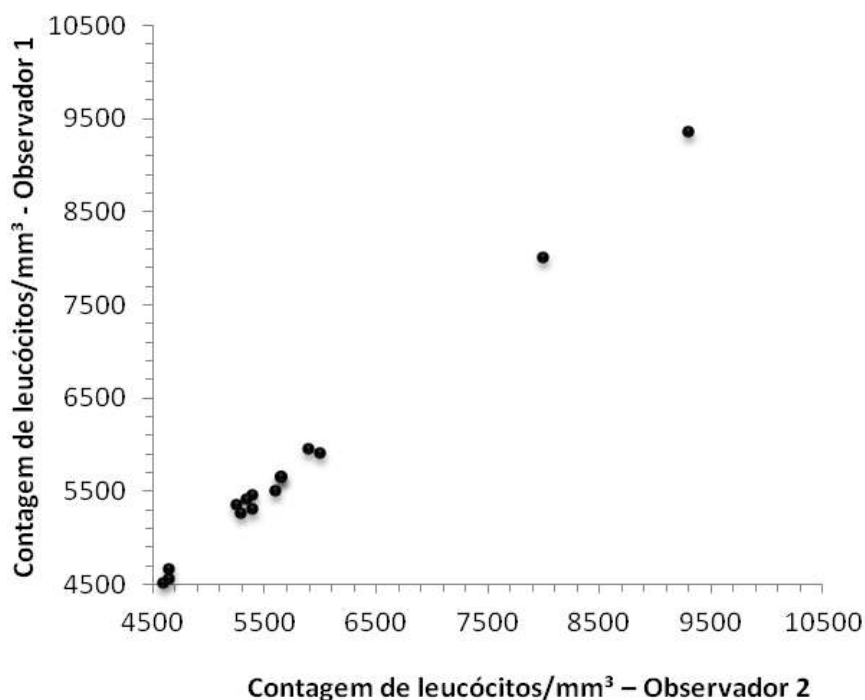


Figura 7 – Associação inter-observador da contagem de leucócitos/mm³ em câmara de Neubauer de uma mesma diluição por observadores diferentes ($r=0,993$; $P< 0,001$, correlação de Spearman).

Ao analisarmos a figura 6, nota-se 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 6 e 7) 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 mononucleares 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 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 saudáveis.

Amostra	%	%	%			Grau de Pureza
			Composição Celular por amostra			
	Recuperação de CMN	Viabilidade das CMN	Linfócitos	Monócitos	Polimorfo 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 *Trypan Blue*, 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%.

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

Foi utilizado o veneno liofilizado da espécie de serpente *Caudisona durissa terrificus* com diluição nas concentrações 50µg/mL, 5µg/mL, 0,5µg/mL, 0,05µg/mL,

0,005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,0005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 *Trypan Blue*, após 24, 48 e 72 horas de cultivo de CMN com e sem o veneno bruto (Figura 8).

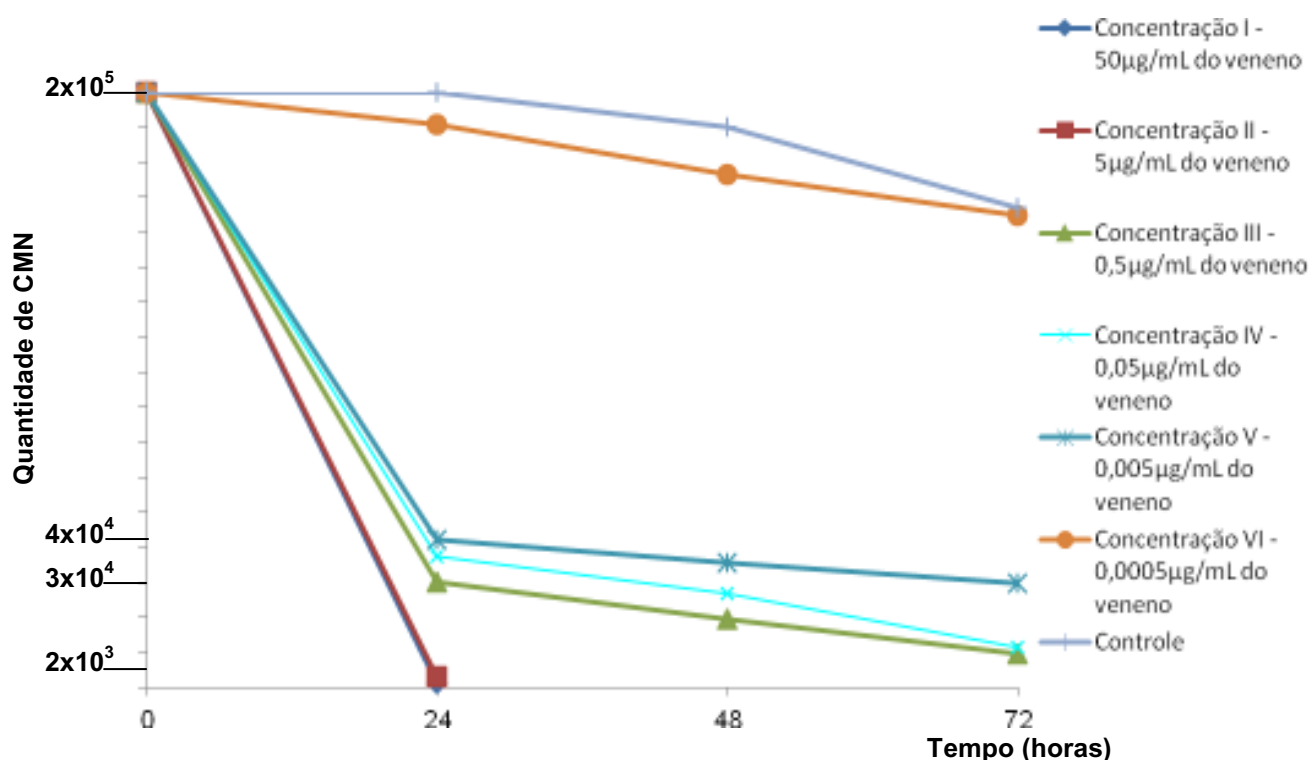


Figura 8 – Avaliação da viabilidade celular por exclusão com *Trypan Blue* após 0, 24, 48 e 72 horas de cultivo de CMN sem e com diferentes concentrações do veneno bruto de *Caudisona durissa terrificus*.

Ao analisar a Figura 8, nota-se que as maiores concentrações (I - 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e II - 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) do veneno bruto de *Caudisona durissa terrificus* 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,005 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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 ($0,0005 \mu\text{g/mL}$) 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 $0,0005 \mu\text{g/mL}$ do veneno bruto de *Caudisona durissa terrificus*, 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 das CMN tratadas em diferentes concentrações do veneno bruto de *Caudisona durissa terrificus* (50 – 5 – 0,5 – 0,05 – 0,005 e $0,0005 \mu\text{g/mL}$) após 1, 3, 6, 24, 48 e 72 horas de incubação foi realizada através da técnica de eletroforese em gel de agarose. Os resultados indicam que nenhuma das concentrações utilizadas nos diferentes períodos de tempo foi capaz de induzir a apoptose em CMN do sangue periférico humano, uma vez que não se observou a fragmentação do DNA (Fig. 9, Fig. 10, Fig. 11, Fig. 12, Fig. 13 e Fig. 14).

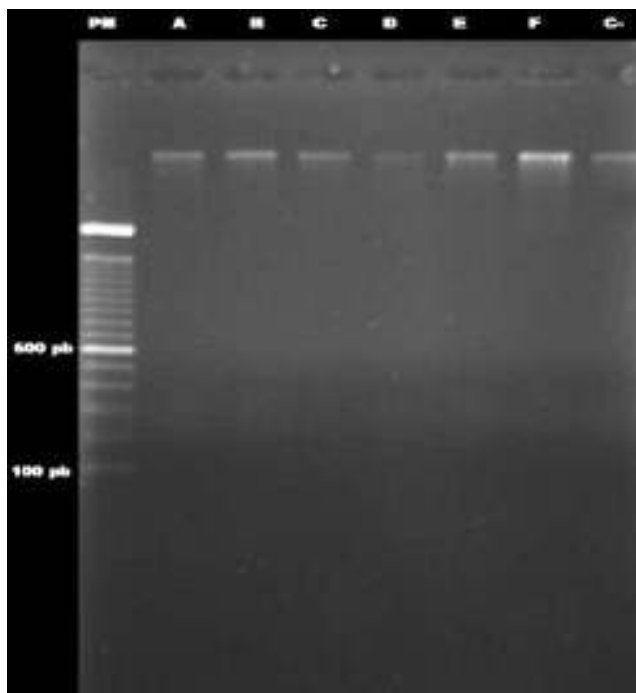


Figura 9. Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após o tratamento *in vitro* com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. durissa terrificus*. **A.** 1h após tratamento com 50µg/mL; **B.** 1h após tratamento com 5µg/mL; **C.** 1h após tratamento 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 negativo

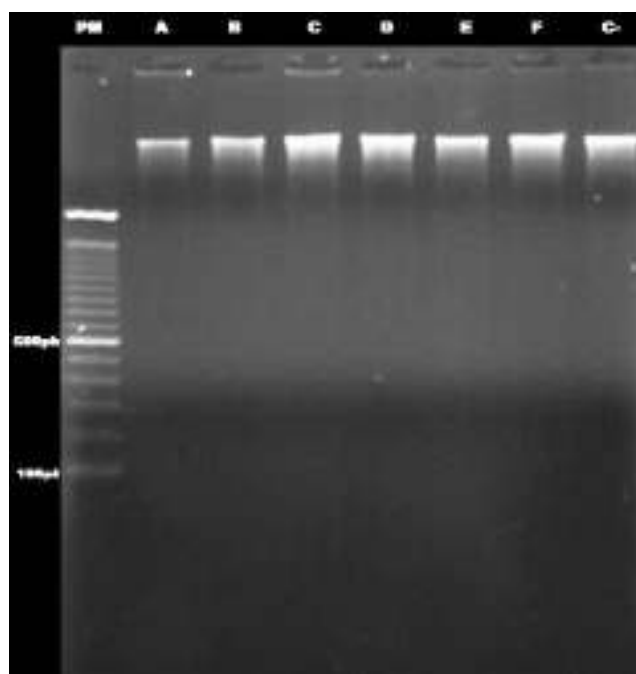


Figura 10. Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após o tratamento *in vitro* com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. durissa terrificus*. **A.** 3h após tratamento com 50µg/mL; **B.** 3h após tratamento com 5µg/mL; **C.** 3h após tratamento com 0,5µg/mL; **D.** 3h após tratamento com 0,05µg/mL; **E.** 3h após tratamento com 0,005µg/mL; **F.** 3h após tratamento com 0,0005µg/mL. **C.** controle negativo.

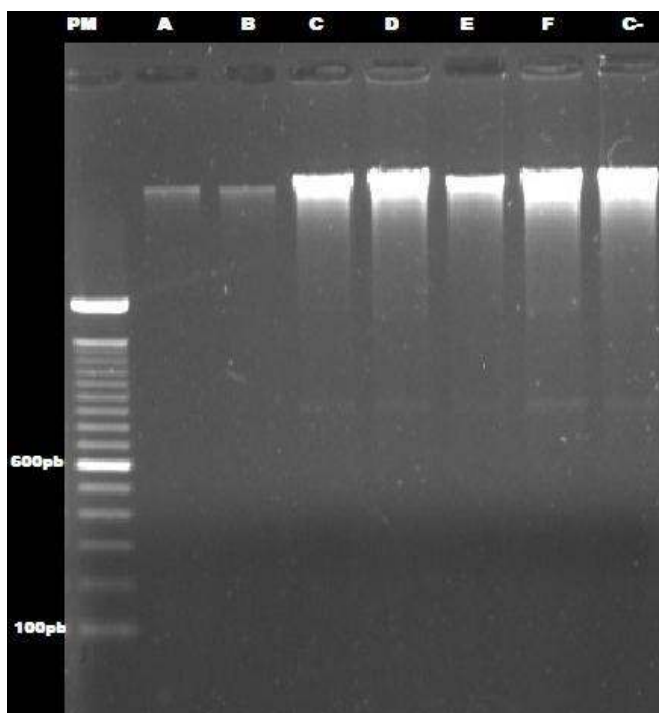


Figura 11. Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após o tratamento *in vitro* com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. durissa terrificus*. **A.** 6h após tratamento com 50µg/mL; **B.** 6h após tratamento com 5µg/mL; **C.** 6h após tratamento com 0,5µg/mL; **D.** 6h após tratamento com 0,05µg/mL; **E.** 6h após tratamento com 0,005µg/mL; **F.** 6h após tratamento com 0,0005µg/mL. **C-** controle negativo.

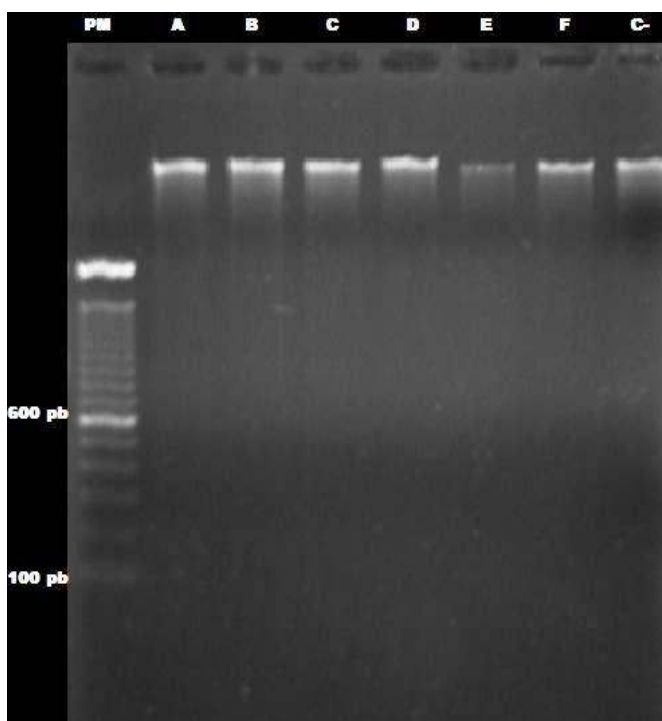


Figura 12. Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após o tratamento *in vitro* com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. durissa terrificus*. **A.** 24h após tratamento com 50µg/mL; **B.** 24h após tratamento com 5µg/mL; **C.** 24h após tratamento com 0,5µg/mL; **D.** 24h após tratamento com 0,05µg/mL; **E.** 24h após tratamento com 0,005µg/mL; **F.** 24h após tratamento com 0,0005µg/mL. **C.** controle negativo.

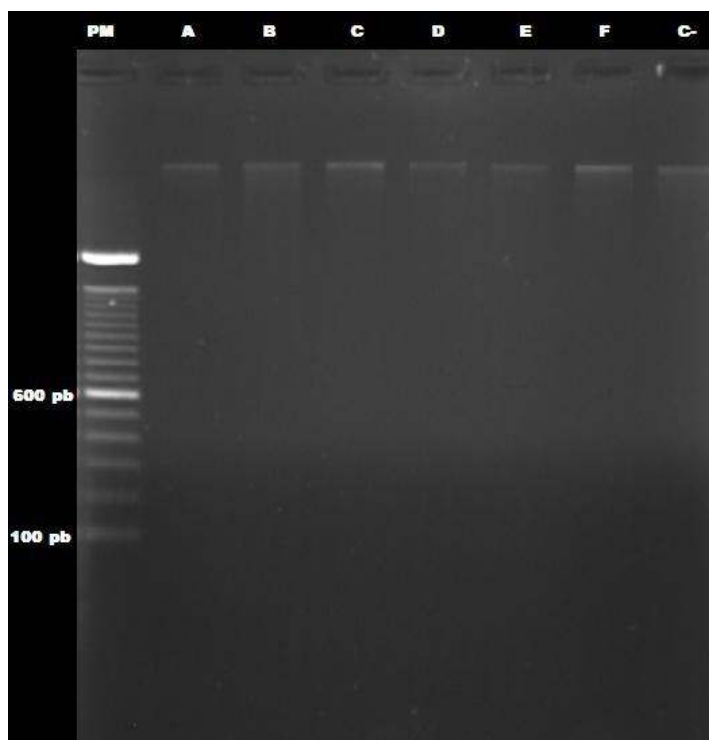


Figura 13. Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após o tratamento *in vitro* com 6 diferentes concentrações de veneno bruto de *C. durissa terrificus*. **A.** 48h após tratamento com 50µg/mL; **B.** 48h após tratamento com 5µg/mL; **C.** 48h após tratamento com 0,5µg/mL; **D.** 48h após tratamento com 0,05µg/mL; **E.** 48h após tratamento com 0,005µg/mL; **F.** 48h após tratamento com 0,0005µg/mL. **C-** controle negativo.

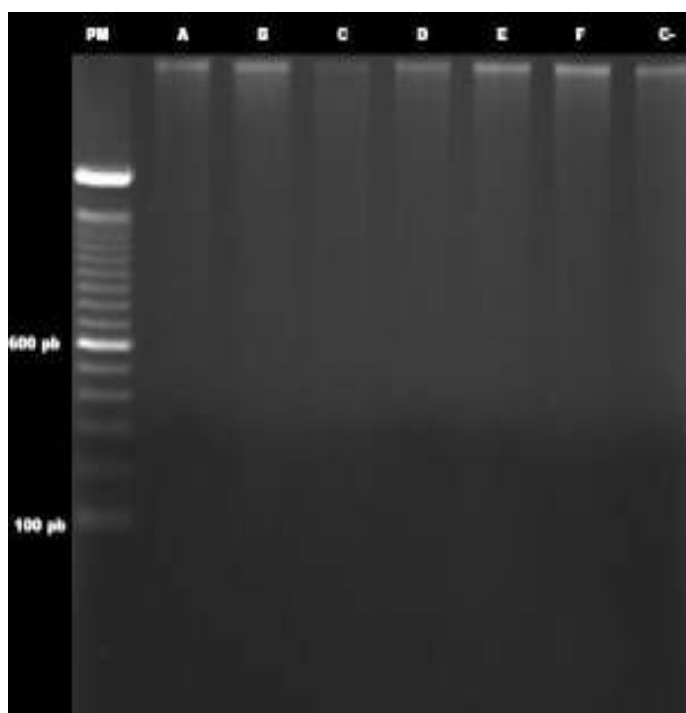


Figura 14. Gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo, mostrando amostras de DNA obtidas de CMN, após o tratamento *in vitro* com diferentes diluições de veneno bruto de *C. durissa terrificus*. **A.** 72h após tratamento com 50µg/mL; **B.** 72h após tratamento com 5µg/mL; **C.** 72h após tratamento com 0,5µg/mL; **D.** 72h após tratamento com 0,05µg/mL; **E.** 72h após tratamento com 0,005µg/mL; **F.** 72h após tratamento com 0,0005µg/mL. **C-** controle negativo.

5. DISCUSSÃO

As toxinas animais vêm ganhando destaque no mercado farmacêutico, uma vez que com a evolução da ciência o homem aprendeu que a diferença entre um medicamento e o veneno está na administração correta da dose. Desta forma, os estudos químicos, bioquímicos, farmacológicos, fisiológicos e tóxicos de um determinado composto estão sendo realizados com o interesse de se encontrar nas próprias toxina animais, substâncias com propriedades que possam agir de maneira benéfica ao homem (ALVES, 2007).

A escolha da peçonha de *Caudisona durissa terrificus* para a realização deste estudo, uma vez que a mesma apresenta compostos biologicamente ativos que exercem atividades sobre componentes do sistema circulatório, sendo estas ações desencadeadas pela sua alta citotoxicidade (MATSUBARA, 2009).

A análise da citotoxicidade celular constitui-se como um dos melhores métodos para estabelecer a toxicidade de uma determinada substância sobre diferentes tecidos. 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 a potencial atividade citotóxica do veneno por meio de ensaios *in vitro*, bem como avaliar a potencial indução de apoptose do 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).

Para tanto, foram realizados estudos preliminares, com o intuito de estabelecer condições ideais para a obtenção das CMN e posteriormente a realização do cultivo e os ensaios com o veneno. Estes resultados permitiram estabelecer médias referentes ao Grau de Recuperação, Viabilidade Celular e Grau de Pureza das CMN o que garante confiabilidade conforme determinado na metodologia do estudo. Tais resultados apontaram que a recuperação das CMN foi de 75,3%, a viabilidade celular >95% e o grau de pureza 97,4% (Tabela 2).

Os estudos realizados por Rivero (2010), Castro (2011) e Stival (2011) avaliando a atividade não citotóxica da peçonha das serpentes *Bothrops jararacussu*, *Bothrops pauloensis* e *Bothrops moojeni* respectivamente, sobre CMN humanas, afirmam que a padronização é um meio de garantir a confiabilidade do estudo. Os autores demonstraram que para a realização do estudo é necessária a obtenção de médias referentes ao grau de recuperação, viabilidade celular e grau de pureza em torno de 67,25%, >95% e 95,92% respectivamente, o que corrobora com os resultados encontrados neste estudo.

A determinação da concentração celular utilizada deve atender às necessidades específicas de cada estudo bem como às características das células utilizadas. A pesquisa realizada por Soares (2007) com o objetivo de caracterizar a atividade antitumoral da peçonha de *Caudisona durissa terrificus*, determina a utilização de alíquotas contendo 5×10^6 células de adenoma de hipófise (GH3) e de glioblastoma (RT2). O estudo realizado por Bastos (2008) avaliou a capacidade

imunomoduladora e inflamatória das frações PLA₂ e Crotopotina do veneno de *Caudisona durissa terrificus* sobre CMN do sangue periférico humano. Os autores determinaram para o seu estudo a utilização de $1,6 \times 10^6$ células/mL.

Com a finalidade de avaliar a atividade antiviral do veneno do veneno bruto e toxinas isoladas da peçonha de *Caudisona durissa terrificus* contra o vírus da dengue e da febre amarelas, Muller *et al.* (2011) utilizaram 2×10^5 células/mL (VERO E6) em seu estudo como parâmetro para a realização do cultivo celular.

Na determinação da concentração celular, deve-se levar em consideração o tipo de celular utilizado, o meio de cultura, bem como as condições em que será realizado o cultivo. Os resultados deste estudo permitiram determinar o número de células inicialmente utilizadas em cada poço da microplaca de cultivo (2×10^5 células/mL), sendo ativadas com 20 UI/mL de Fitohemaglutinina (PHA) (Pharmacia) e $1 \mu\text{g/mL}$ 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 influência do veneno sobre a viabilidade celular foi avaliada por contagem das células em câmara de Neubauer, por meio do corante de exclusão *Trypan Blue*. 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 *Trypan Blue* 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 daquela pesquisa.

Com a finalidade de evitar contaminações com microorganismos durante a realização do cultivo celular, muitos estudos preconizam a utilização de agentes antimicrobianos concomitantemente. Os estudos de Pontes (2006) e Soares (2007) determinam a importância do cultivo celular com a utilização de antibióticos como gentamicina, penicilina e estreptomicina uma vez que minimiza a possibilidade do desenvolvimento de contaminantes no cultivo. No presente estudo foi possível observar que não ocorreram contaminações, mesmo não utilizando nenhum agente antimicrobiano, o que reduz as chances de ocorrer viés nos resultados decorrentes de tais produtos. Assim, foi possível definir um protocolo de cultivo celular padrão para os ensaios realizados neste estudo.

A determinação da citotoxicidade da peçonha de *Caudisona durissa terrificus* sobre as CMN ocorreu em função da concentração do veneno utilizada e do tempo decorrido de incubação, sendo realizada por meio da taxa de sobrevivência das células tratadas. As concentrações I (50µg/mL) e II (5µg/mL) possuem elevada citotoxicidade sobre as CMN uma vez que em 24 horas de incubação, ocorreu uma queda significativa no número de células comparadas ao controle (Figura 6). Atribuí-se esta queda à alta toxicidade apresentada pela peçonha ofídica utilizada no estudo.

Destaca-se a presença de diferentes toxinas que compõem o veneno bruto, dentre elas a crotoxina, crotamina, giroxina, convulxina, serinoproteases e fosolipase A2 (BERCOVICI, 1987; OSHIMA-FRANCO *et al.*, 1999). Entre as principais ações

do veneno crotálico, destaca-se a capacidade de causar intensas alterações nos componentes hematológicos e imunológicos (SAMPAIO *et al.*, 2005). Segundo Chippaux *et al.*, (1991) a toxicidade da peçonha deve-se a toxicocinética, ou seja, à capacidade e à habilidade que o veneno possui de penetrar nas membranas de células teciduais.

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 podem 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).

Essa situação fica evidente quando comparados os resultados obtidos nesta pesquisa, com os resultados obtidos nos estudos realizados por Rivero (2010) e Castro (2011) quando os autores, utilizando diferentes concentrações do veneno do gênero *Bothrops*, porém com diferentes subespécies, determinaram a concentração com menor atividade citotóxica sobre as CMN. Os resultados demonstraram que a concentração de 0,05 μ g/mL utilizada por ambos os pesquisadores apresentou baixa atividade citotóxica comparada com o controle. Já o estudo realizado por Stival (2010), também utilizando a peçonha da serpente *Bothrops moojeni* nas mesmas concentrações que os autores citados anteriormente, demonstraram que as concentrações 0,5 μ g/mL e 0,05 μ g/mL não apresentaram citotoxicidade sobre as CMN. Diferentemente, a peçonha da serpente *Caudisona durissa terrificus* utilizada

neste estudo demonstrou que a concentração com menor citotoxicidade foi de 0,0005 µg/mL.

Estudo realizado por Santoro *et al.* (1999) demonstrou variabilidade interespecífica sobre a peçonha de *Caudisona durissa terrificus*, *Caudisona durissus cascavella* e *Caudisona durissa collilineata*. Rádis-Baptista *et al.* (2003), confirmam em seu estudo onde existe 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, o que pode ser uma possível explicação para a variação existente na composição do veneno.

Nesta perspectiva, o estudo realizado por Maineri (2011) utilizando diferentes concentrações da peçonha de *Caudisona durissa collilineata* sobre CMN demonstrou que a concentração de 0,0005µg/mL, apresentou baixa toxicidade corroborando com os resultados obtidos nesta pesquisa.

Essa diferença observada entre espécies e gêneros quanto à toxicidade do veneno, pode estar relacionada com a variação da composição química. Tais variações tem sido demonstrada 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 *Caudisona durissa collilineata* a fim de comparar sua estrutura molecular e atividade neurotóxica com os perfis cromatográficos de outros venenos crotálicos, observou que o veneno de *Caudisona durissa 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 *Caudisona durissa terrificus*, já que essa

toxina é responsável pelas atividades miotóxicas e neurotóxicas (*Caudisona durissa terrificus*) e ser responsável por 20% do veneno seco. Os autores sugerem, com estes achados, que a crotoxina homóloga na *Caudisona durissa collilineata*, provavelmente, desempenha um papel importante na ação neurotóxica do veneno.

Matsubara (2009) avaliou o efeito do veneno de *Cadisona duissa terrificus*, da Crotoxina e das suas subunidades CA e CB em monocamadas de células endoteliais em cultura. Para tanto o autor utilizou incubações das células com concentrações crescentes do VCdt ou CTX (1, 10 e 100 µg/mL) ou CB ou CA (correspondente molar de 0.04, 0.4 e 4µM, respectivamente) por períodos de 1, 3, 6, 12 e 24 horas. Identificou que apenas a maior concentração do VCdt e a subunidade CB afetam a viabilidade celular, o metabolismo e a integridade das células. Nas concentrações não citotóxicas o VCdt, a CTX e as subunidades CA e CB não alteram a proliferação das células endoteliais.

Lima (2010) realizou a caracterização das ações do veneno de *Caudisona durissa terrificus* sobre as funções dos neutrófilos, avaliando qual componente é responsável pelo efeito inibitório do VCdt sobre a fagocitose por neutrófilos e também investigar *in vitro* e *in vivo* efeito do VCdt e da CTX sobre a atividade microbicida e a produção de espécies reativas do oxigênio por essas células. Para tanto, foram testados três picos do VCdt 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 com a CTX ou com os picos I ou III, em diferentes concentrações (0,02; 0,04; 0,08; 0,16 ou 0,32 µg/mL), mostrou que somente o pico II inibiu essa atividade, demonstrando que a CTX é o componente do VCdt responsável pelo seu efeito inibitório sobre a fagocitose por neutrófilos. A incubação dos neutrófilos com o VCdt (0,125; 0,25; 0,5; 1,0 ou 2,0 µg/mL) ou a CTX

(0,02; 0,04; 0,08; 0,16 ou 0,32 µg/mL), bem como o tratamento dos animais com o VCdt (0,18 mg/kg) ou a CTX (0,1 mg/kg), 2 horas antes da administração de carragenina, não alteraram a atividade microbica e a produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso.

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.

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 diferentes concentrações do veneno em diferentes períodos de tempos. O veneno bruto foi testado nas concentrações de 1, 5, 10 e 50µg/mL em 1, 4, 8 e 24h e para suas frações foi testada à 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. Com as frações testou as mesmas concentrações do veneno bruto, porém apenas em 24 e 48h. Identificou que o veneno bruto da serpente causou danos celulares irreversíveis em torno de 10% a 20% nas células submetidas ao tratamento, e nas frações do veneno, 30% a 70% dessas células foi observada morte celular.

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 e sobre as CMN do sangue periférico humano. Observou que a concentração de 50µg/mL apresentou atividade citotóxica de 70% sobre a linhagem

tumoral JURKAT (leucemia de células T). Além disso, a concentração de 10µg/mL apresentou efeito citotóxico de 60% sobre a linhagem de células tumorais B16 F10 (melanoma de células de camundongo). Sobre a linhagem PC12, as células tiveram uma resposta dose dependente, uma vez que ao utilizarem a concentração de 25µg/mL observou-se citotoxicidade de aproximadamente 70% em relação ao controle negativo. Por fim, o autor afirma que ao incubar 10µg/mL da LAAOBatrox com CMN do sangue periférico humano, observou uma insignificante atividade citotóxica. Nota-se que a concentração do veneno utilizada no estudo sobre as CMN (10µg/mL) é superior a concentração utilizada neste trabalho o que confirma a variabilidade do veneno entre espécies diferentes.

Da mesma forma, Soares (2007) pesquisou o efeito antitumoral da peçonha de *Caudisona durissa 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). Percebeu 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.

Bastos (2007) avaliou a capacidade imunomoduladora e a citotoxicidade da crotapotina do veneno de *Caudisona durissa terrificus* sobre células mononucleares do sangue periférico humano. A citotoxicidade foi avaliada através da coloração de Azul de Trypan, determinando como padrão experimental a viabilidade $\geq 90\%$, o que corrobora com a padronização utilizada nesse estudo. As células mononucleares foram submetidas a diferentes concentrações das frações crotapotina e da PLA₂ (2, 1, 0,5, 0,2 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$). As placas foram incubadas a 37°C de atmosfera úmida com 5% de dióxido de carbono por um período de 96 horas. Observou que a crotapotina inibiu a proliferação linfocitária nas concentrações (0,2 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$) e que a PLA₂ não exerceu efeito sobre a proliferação linfocitária. Não foram constatadas diferenças significativas em relação ao controle de células o que determina que não houve o desenvolvimento de morte celular por nenhuma das frações.

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.

Ao observar que algumas concentrações utilizadas neste estudo ocasionaram a morte celular devido à redução do número de células quando comparado ao controle, levou-se em consideração que morte celular ocorrida durante o período de incubação nas concentrações citotóxicas não indicam um mecanismo de morte celular específica. Para tanto, a potencial indução de apoptose em CMN, *in vitro* por diferentes concentrações do veneno bruto de *Caudisona durissa terrificus* (50, 5, 0,5, 0,05, 0,005 e 0,0005 $\mu\text{g/mL}$), foi avaliada. Após o tratamento, as células foram

lisadas para a análise de fragmentação do DNA por meio da eletroforese em gel de agarose.

Foi possível observar que não houve dano ao DNA decorrente da incubação com o veneno bruto de *Caudisona durissa terrificus* após 1, 3, 6 e 24 h (Fig.7;). Este resultado indica que a morte celular decorrente do tratamento com as diferentes concentrações do veneno não é decorrente do processo apoptótico.

Alves (2007) analisou a capacidade da LAAO obtida da *Bothrops atrox* de induzir apoptose em diferentes linhagens de células tumorais, feocromocitoma de glândula adrenal de rato (PC12), melanoma murino (B16F10) e CMN do sangue periférico humano, sob diferentes concentrações (5, 10, 25 e 50µg/mL) incubadas por um período de 4 horas. Descreveu que as células PC12 quando tratadas com a concentração de 25µg/mL apresentaram o maior número de células mortas por apoptose. Porém, as CMN não foram induzidas a apoptose mesmo quando tratadas com 50µg/mL da enzima. A linhagem B16F10 destacou-se quanto ao desenvolvimento de apoptose uma vez que 60% das mesmas foram induzidas ao processo apoptótico quando tratadas com 50µg/mL da enzima.

A LAAO obtida de *Vipera berus berus* não induziu apoptose em células K562 (leucemia mielóide crônica humana), quando incubadas com baixas concentrações da enzima e por um curto período de tempo. Porém, após 24 horas de incubação com a mesma concentração inicial, pode-se observar a indução de apoptose (SAMEL et al.,2006). A mesma enzima, porém obtida da serpente *Agkistrodon contortrix laticintus*, na concentração de 25µg/mL, foi incubada com células HL-60 e após 24 horas de incubação foi observada a fragmentação do DNA sugerindo a indução de apoptose por essa enzima. Já em concentrações menores, porém com o

mesmo período de incubação não ocorreu a indução da apoptose (SOUZA et al., 1999).

Divergindo dos resultados obtidos neste estudo, Reis *et al.* (2006) ao realizarem o cultivo de células CHO – K1 com o veneno de *Caudisona durissa terrificus* observaram que as concentrações utilizadas foram (10, 50 e 100µg/mL) por períodos de 1, 6 e 12 horas, demonstraram que após 6 horas de tratamento com o veneno as células iniciaram processo de morte celular por apoptose, verificada através da fragmentação do DNA. Da mesma forma, Tamietti *et al.* (2007) também observaram a fragmentação do DNA a partir de 6h decorrentes da ação da peçonha de *Caudisona durissa terrificus* sobre linhagens de células CHO – K1 nas concentrações de 10, 50 e 100µg/mL.

A busca pela compreensão do mecanismo que induz a morte celular estimulada por peçonhas ofídicas tem sido estudada por muitos pesquisadores. Burin (2011) avaliou o efeito do veneno bruto da peçonha de *Bothrops pirajai* sobre células HL-60 (Células derivadas de leucemia pró-mielocítica). As células foram plaqueadas na concentração de 2×10^4 por poço na ausência e na presença do veneno bruto. Os ensaios foram realizados utilizando as concentrações de 0,05 - 0,1 - 0,5 - 1 - 5 - 7,5 - 10 - 25 - 50 e 100µg/mL por períodos de 12 e 18 horas. Observou-se 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 nas células tratadas e incubadas por 12 e 18 horas. Levando em consideração o tempo de incubação a morte celular foi maior nas concentrações de 10 a 100µg/mL do veneno por 18 horas.

Estudos de outros autores também demonstram a indução de apoptose por peçonhas ofídicas. Soares *et al.* (2010) descreveram a indução do efeito apoptótico da peçonha de *Caudisona durissa terrificus* sobre células de glioma de rato (RT2) e adenoma benigno de pituitária (GH3). O tratamento das células ocorreu com 5 e 10µg/mL da peçonha ofídica por um período de 48 horas. Observaram aumento significativo do número de células GH3 apoptóticas (17 vezes maior do que as células controle) e células RT2 apoptóticas (3,5 vezes maior do que as células controle).

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 *Caudisna durissa terrificus*.

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. terrificus* apresentou alta toxicidade sobre as CMN.
- A citotoxicidade do veneno bruto de *C. d. terrificus* 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 terrificus*, 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. & KAISER, I. Comparative studies on three rattlesnake toxins. **Toxicon**. 23(3): 361-374, 1985.

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

ALBERTS, B. et al. **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. f.. . *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.

ANTUNES, C. T.; YAMASHITA, K.M.; BARBARO, K.C.; SAIKI, M.; SANTORO, M.L. Comparative analysis of newborn and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, (56): 1443-1458, 2010.

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).

ARAÚJO, F. A.A. OLIVEIRA, R.C.; WEN, F.H.; SIFUENTES, D.N. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO J. L. C. *et al.* **Animais Peçonhentos no Brasil, Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes.** 1ª ed. Ed. Sarvier, p. 6-12, São Paulo, 2003.

ARGAÉZ, M. A. H. **Ecologia da cascavel (*Viperidae, Crotalus durissus*) no Cerrado brasileiro.** 2006, f. 51. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de Brasília – UNB, Brasília – DF.

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

BARRAVIERA, B; FERREIRA, R. S. Acidentes ofídicos. In: FOCACCIA, Roberto. Veronesi: **Tratado de Infectologia**. 3ª ed. Ed. Atheneu: São Paulo, 2005. Cap. 126, p. 1929 – 1947. Vol. 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.

BATISTA, R. S.; GOMES, A.P.; RUBIÃO, E.C.N.; SANTOS, S.S.; GONÇALVES, M.L.C.; PISSINATI, A. Acidentes por animais peçonhentos e venenosos. In. ALVES, J. G., **Emergências clínicas**. Ed. Rubio: Rio de Janeiro, 2007.

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.

BERNARDE, P, S. (2009) **Serpentes** (Galeria de Fotos) Disponível em: <http://www.flickr.com/photos/paulobernarde/3871427589/in/set-72157622187314030>.

Acesso em: 15/11/2011

BERNARDE, P. S. Mudança na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literature médica. **Gaz. méd. Bahia**; 81(1):55-63, 2011.

BÉRNILS, R.S. 2010. Brazilian reptiles: list of species.

<http://www.sbherpetologia.org.br/> (Acesso em 20/02/2011)

BJARNASON, J. & FOX, J.W. Hemorrhagic Toxins Snake Venoms. **J. Toxicol. Toxin. Reviews**. (7): 121-209, 1998.

BOCHNER, R. & STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad. Saúde Pública**, 19 (1): 7-16, Jan/Fev, 2003.

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.

BORKOW, 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. Fundação Nacional de Saúde – **Manual de diagnósticos e tratamento de Acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, DF, 1998

BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2ª ed. Brasília: Brasil, Ministério do Meio Ambiente, 1999.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília: MMA/SBF, 2002. 404 p.

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.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. New York: Cornell University Press, 2004. 728p.

CARDOSO J. L. C. *et al.* **Animais Peçonhentos no Brasil, Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2^a ed. São Paulo: Sarvier, 2009.

CARDOSO J. L. C. *et al.* **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.

CHANG, C.C.; SU, M.J. A study on the interaction of crotaopotin with crotoxin phospholipase A₂, notexin and other presynaptic neurotoxins, **Br. J. Pharmacol.** (73): 495–503, 1981.

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

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

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

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

CHISARI, A.; SPINEDI, E.; VOIROL, M.J.; GIOVAMBATTISTA, A.; GAILLARD, R.C. Phospholipase A2 related snake venom (from *Crotalus durissus terrificus*) stimulates neuroendocrine and immune functions: Determination of different sites of action. **Endocrinology**. 139(2): 617-625. 1998.

CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; DÉLOT, E.; FAURE, G.; SALIOU, B.; BOM, C. Structure and function relationship of crotoxin, a heterodimeric neurotoxic phospholipase A2 from the venom of a South American rattlesnake. **Adv Exp Med Biol**, (391): 197-202, 1996.

COATES, M. & RUTA, M. Nice snakes, shame about the legs. **Trends Ecol. Evol.**, (15): 503-507, 2000.

COLLI, G. R. As origens e a diversificação da herpetofauna do Cerrado. In *Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação*. (A. Scariot, J.C. Souza-Silva & J.M. Felfili, eds.). Ministério do Meio Ambiente, Brasília, p. 247-264. 2005.

CRUZ, A. H.; GARCIA-JIMENEZ, S.; MENDONÇA R. Z.; PETRICEVICH, V. L. Pro- and anti-inflammatory cytokines release in mice injected with *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mediat. Inflamm.** (8): 749-62, 2008.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E. Acute myocardial infarction-like enzymes profile in human victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. **Trans Roy Soc Med Hyg**, 84: 447-51, 1990.

CURA, J. E.; THEILLER, A.R.; ROODT, J.C.V. Phase I and pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA₂, NSC-624244) in patients with advanced cancer, **Clin. Cancer Res.** (8):1033–1041, 2002.

CURY, Y.; ZARZANA, E.C; SAMPAIO, S.C.; DE-LIMA, W.T.; PALERMO-NETO, J.P. Crotoxin, a new approach for the modulation of lung allergic inflammation in rats. **Anal. Inst. Butantan**, (1): 27 2007.

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.

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.

FEITOSA, R. F. G.; MELO, I. M. L. A.; MONTEIRO, H. S. A. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no estado do Ceará – Brasil. **Rev. da Soc. Brasileira de Med. Trop**. 30(4): 295-301, Jul/Ago, 1997.

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.

FLETCHER, J. E.; HUBERT, M.; WIELAND, S.J.; GONG, Q.H.; JIANG, M.S. Similarities and Differences in mechanisms of Cardiotoxins, Mellitin and Other Myotoxins. **Toxicon.** 34(11): 1301-1311, 1996.

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.

FRANCA, F. O. de S., MÁLAQUE, C. M. S. Acidente Botrópico. In: CARDOSO J. L. C. *et al.* **Animais Peçonhentos no Brasil, Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes.** 2ª ed. Ed. Sarvier: São Paulo, 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, Eloi 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.

GRACIA, E. S. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, 11(3): 495-500, Jul/Sep, 1995.

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.

GREENE, H.W. Snakes: the evolution of mystery in nature. Berkeley: University of California Press, 1997. 366p.

GUIMARÃES, B. **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**. 11^a ed. Ed. Guanabara – Koogan: Rio de Janeiro, 2004.

HOSER , R. A reclassification of the Rattlesnakes; species formerly. *Australasian Journal of Herpetology* 6 (2009):1-21.

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

induced by apoptotic and necrotic treatments. **Apoptosis**; 10(1):201-8, 2005.

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

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Epidemiologia e quadro clínico por cascavelsul-americana (*Crotalus durissus*). **Rev Inst Med Trop** São Paulo, (34): 347-357, 1992.

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.

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.

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

KERKIS, A.; KERKIS, I.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; OLIVEIRA, E.B.; VIANNA-MORGANTE, A.M.; PEREIRA, L.V.; YAMANE, T. Crostamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **FASEB J**. (18): 1407-1409, 2004.

KIYOMI, C. Ordem *Squamata* – Subordem *Ophidia* (Serpente). In: CUBAS, C. Z.; SILVA, C. R.; DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens**. Ed. Roca: São Paulo, 2006. Cap.8, p. 68 – 85

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASSELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**. (63):3031-3041, 2006.

KORSMEYER, S.J Cell death: critical control points. **Cell** ; 116(2):205-219, 2004.

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.

KREUZER, H.; MASSEY, A. **Engenharia genética e biotecnologia**. Ed. Artmed, Porto Alegre, 2002.

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.

LEWINSOHN, T. M. & PRADO, P. M. Quantas espécies há no Brasil? **Megadiversidade**., 1(1): Julho. 2005.

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 cytolytic 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. *et al*. The histamine releasers crotamine, protamine and compound 48/80 activate specific proteases and phospholipases A2. **Biochemistry and Molecular Biology International**, Marrickville, (42): 1171-1177, 1997.

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.

MAGRO A. J.; DA SILVA, R. J.; RAMOS, P.R.R.; CHERUBINI, A.L.; HATAYDE, M. R. Intraespecific variation in the venom electrophoretic profile of recently captured *Crotalus durissus terrificus* snakes. **J. Venom. Anim. Tox. Incl. Dis**. (7): 276-301, 2001.

MAINERI, M. M. **Avaliação da potencial atividade citotóxica da peçonha de *Caudisona durissa collilineata* em células mononucleares do sangue periférico humano**. 2011, 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia, 2011.

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.

MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. História Natural das Serpentes. In: CARDOSO J. L. C. *et al.* **Animais Peçonhentos no Brasil, Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2^a ed. Ed. Sarvier: São Paulo, 2009.

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.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim Biophys Acta**. 1477(1-2): 146-156, 2000.

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**. 2^a ed. Ed. Sarvier: São Paulo, 2009.

MELO, P. A.; BURNS, C.F.; BLANKEMEYER, J.T.; OWNBY, C.L. Membrane depolarization is the initial action of crotoxin isolated murine skeletal muscle. **Toxicon**. 43(2): 11-119, 2004.

MENEZES, M. C.; FURTADO, M.F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S.R.; CAMARGO, A.C.; SERRANO, S.M. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**. (47): 304-312, 2006.

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-contra-o-cancer&id=3939>. Acessado em 05/07/2011.

MORENO, E.; QUEIROZ-ANDRADE, M.; LIRA-DA-SILVA, R.M.; TAVARES-NETO, J. Características clinicoepidemiológicas dos acidentes ofídicos em Rio Branco, Acre. **Rev Soc Bras de Med Trop**, 38(1): 15 – 21, 2005.

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.

MURILLO, L. A.; LAN, C.Y.; AGABIAN, N.M.; LARIOS, S.; LOMONTE, B. Fungicidal activity of a phospholipase A2 derived synthetic peptide variant against *Candida albicans*. **Revista Espenhola de Quimioterapia**. 20(3): 330-333, 2007.

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.

NEWMANN, D. J & CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**. 70(3): 461-477, 2007.

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

NOGUEIRA, R.M.B; SAKATE, M. Acidentes crotálicos em animais domésticos. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, (31): 47-56, 2004.

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.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G. New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon.** (46): 363-370, 2005.

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 sanguínea.** 2006. 74f. Dissertação (Mestrado em biofísica molecular) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto, 2006.

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.

OLIVEIRA, E. A., LABRA, M. E., BERMUDEZ, J. A produção pública de medicamentos no Brasil: uma visão geral. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, 22(11):2379-2389, Nov, 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.

ORR, Roberts T. **Biologia dos Vertebrados**. 5ª ed. Ed. Roca: São Paulo, 2007

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.

PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BENGOCHEA, J.A.; GORVEL, J.P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom. **Europe Journal of Biochemistry**. 253: 452-461, 1998.

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.

PEICHOTO, M. E., LEIVA, L.C.; MOYÁ, L.E.G.; REY, L.; ACOSTA, O. Muscle and skin necrotizing and edema-forming activities of Duvernoy's gland secretions of the xenodontine colubrid snake *Philodryas patagoiensis* from the north-east of Argentina. **Toxicon**, 44(6): 589 – 596, 2004.

PEICHOTO, M. E.; LEIVA, L.C.; MOYÁ, L.E.G.; REY, L.; ACOSTA, O. Duvernoy's gland secretions of *Philodryas patagoiensis* from the north-east of Argentina: its effects on blood coagulation. **Toxicon**, 45(4): 527 – 534, 2005.

PEREIRA, R., S. **Estudo Comparativo dos efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* adulta e juvenil sobre a junção neuromuscular**. 2004. f. 25. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas. Universidade de Campinas – UNICAMP, Campinas – SP.

PETERS, C. & MAYER, A. Ca^{2+} /calmodulin signals the completions of docking and triggers a late step of vacuole fusion. **Nature**. 396(6711): 575-580, 1998.

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. 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.

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

PINTO, R. N.; SILVA JÚNIOR, N.J.; AIRD, S.D. Human envenomation by the South American opisthoglyph *Clelia Clélia plumbea* (Wied). **Toxicon**, 29(12): 1512 – 1516, 1991.

PIRES, Luciane. S. **Estudos epidemiológicos de acidentes ofídicos na cidade de São João dos Campos (SP) e municípios adjacentes**. 2004. f. 87. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Curso de Ciências Biológicas. Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos – SP.

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

PONCE-SOTO, L. A.; LOMONTE, B.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Biological and Structural Characterization of Crotoxin and New Isoform of Crotoxin B PLA₂ (F6a) from *Crotalus durissus collilineatus* Snake Venom. **The Protein Journal** . 26(4): 221-230, 2006.

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.

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

POUGH, F. Harvey; JANIS, Christine N; HEISER, John B. **A vida dos Vertebrados**. 3ª ed. Ed. Atheneu: São Paulo, 2003

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.

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. Modulation of in vitro and in vivo angiogenesis by alternagin-C, a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus* snake venom and by a peptide derived from its sequence. ***Arch Biochem Biophys***. 461(1):1-6. 2007.

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.

RELLO, S et al. Conservação dos répteis brasileiros: os desafios para um país megadiverso. ***Megadiversidade.***, 1(1): 2005.

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, M. T. Conservação dos répteis brasileiros: os desafios para um país megadiverso. **Megadiversidade.**, 1(1): Julho. 2005.

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.

RUSSEL, F. E *et al.* Toxic effects of animal toxins. In. KLAASSEN, C. D. (Ed). Casarett and Doull's Toxicology – **The Basic Science of Posion**. 5^a Ed. New York: McGraw-Hill, p. 801-839, 1996.

SAKATE, M. Terapêutica das intoxicações. In: ANDRADE, S.F. **Manual de terapêutica veterinária**. São Paulo: Roca, 2002.

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.

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-crotalico 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.ccuec.unicamp.br/revista/infotec/artigos/silveira.html>.

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.

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

SCHENBERG, Ana Clara Guerrini. Biotecnologia e desenvolvimento sustentável. **Estud. av.**, São Paulo, 24(70): 2010 .

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.

SELISTRE, H. S.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (Jararaca ilhoa). **Toxicon**, Elmsford, (25): 1135-1144, 1987.

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, M. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Brasil, Ministério do Meio Ambiente, 2001.

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, M. *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. et al. Cytokine profile of Ehrlich ascites tumor treated with *Bothrops jararaca* venom. **Mediators Inflamm**. (11): 197-201, 2002.

SILVA, S. H. de O. **Efeito farmacológico de novos componentes da crotoxina de (*Crotalus durissus terrificus*) e suas isoformas sobre a junção neuromuscular.**

2001. f. 35. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas. Universidade de Campinas – UNICAMP, Campinas – SP.

SILVA, S. T., *et al.* **Escorpiões, aranhas e serpentes : aspectos gerais e espécies de interesse médico no Estado de Alagoas.** Ed. EDUFAL: Maceió, 2005. 54p. : il. – (Conversando sobre ciências em Alagoas)

SILVA, V.X., **Revisão sistemática do complexo *Bothrops neuwiedi*** (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) [Tese de Doutorado]. Universidade de São Paulo, 2000.

SILVEIRA, J. *et al.* **Evolução recente da biotecnologia no Brasil.** Campinas – SP: Instituto de Economia. Universidade Estadual de Campinas, Texto para Discussão, IE/UNICAMP, n. 114, Fev. 2004. Disponível em:

<http://www.eco.unicamp.br/Downloads/Publicacoes/TextosDiscussao/texto114.pdf>.

Acessado em: 10/01/2011.

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.; 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.

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.

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.

SOERENSEN, B. **Animais Peçonhentos – Reconhecimento, distribuição geográfica, produção de soros, clínica, tratamento dos envenenamentos**. Ed. Atheneu: São Paulo, 1990. P. 47 – 75.

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.

SOUZA, W. Biotecnologia no Brasil. **Jornal da Ciência**. 2011. Disponível em: <http://www.jornaldaciencia.org.br>. Acessado em: 20/02/2011.

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.

STOCKER, K. Composition of snake venom, p. 33-56. In: K. F. Stocker. **Medical Use of Snake Venom Proteins**. CRC Press, Boca Raton. 280 p. 1990.

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.

STORER, T. I. *et al.* **Zoologia Geral**. 6ª ed. Ed. Companhia Editora Nacional: São Paulo, 2002

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 hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochem Biophys Res Commun**; 280(3):620-4, 2001.

TERRUGGI, C. H. B. **Estudo do efeito da Alternagina – C, uma desintegrina do veneno de Bothrops alternatus, sobre a adesão de células normais e tumorais. Avaliação do seu potencial como agente anti – metastático.** 2004. f. 24. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Curso de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade de São Carlos, São Carlos – SP.

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.

TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V. A importância dos Acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. **Pesq.Vet. Bras.** 26(2): 55 – 68, abr./jun. 2006.

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.

UETZ, P. & HALLERMAN, J. 2009. The TIGR Reptile Database. <http://www.reptile-database.org> (último acesso em 20/11/2010).

VALLE, M. G. **O sistema nacional de inovação em biotecnologia no Brasil: possíveis cenários**. 2005. 249 f. Tese (Doutorado em Política Científica e Tecnologia) – Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

VALLE, M. G.; SANTOS, M. S. A biotecnologia como instrumento de desenvolvimento econômico e social. **Univ. Rel. Int.**, Brasília, 6 (1): 79-89, Jan/Jun. 2008.

VARELLA, Marcelo Dias. Biodiversidade: o Brasil e o quadro internacional. **Rev. Bras. Polít. Int.**, Brasília, 40(1):123-141. Jun, 1997.

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. 6ª ed. Rio de

VIZOTTO, L. D. **Serpentes: Lendas, Mitos, Superstições e Crendices**. Ed. Plêiade: São Paulo, 2003.

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

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.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e Fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fititerápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, 24(1): 147-152, 2001.

ZHANG, Y. J.; WANG, J.H.; LEE, W.H.; WANG, Q.; ZHENG, Y.T. Molecular characterization of *Trimerisurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. 309: 598-604, 2003.

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: Na 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 ____/____/____