

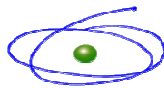


MESTRADO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE

**Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Coordenação de Pós-Graduação Stricto Sensu
Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde**

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

Fernanda de Oliveira Feitosa de Castro



Goiânia – Goiás

2011



**Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Coordenação de Pós-Graduação Stricto Sensu
Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde**

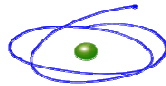
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NÃO CITOTÓXICA DO VENENO DA
COBRA *BOTHRUPS PAULOENSIS* EM CÉLULAS
MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO**

Fernanda de Oliveira Feitosa de Castro

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimmer

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



**GOIÂNIA
2011**

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para o seu próprio prazer pessoal e para o proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.

Albert Einstein

Dedicatória

Dedico este trabalho especialmente

*À minha mãe **Loide** e ao meu pai **Caub (in memoriam)** pela
dedicação, exemplo de vida, sacrifício, incentivo sempre pela busca
da intelectualidade*

*À meu querido marido **Thiago** pela paciência e motivação em sempre
acreditar no melhor*

*À minha sempre amiga **Dra Marilucia**
Pela amizade e estímulo de nunca desistir*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer

À **Profa Dra. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer**, pela confiança, apoio e dedicação. Pelos exemplos de ética, caráter, respeito e perseverança. Pelo reconhecimento investido no nosso trabalho, mesmo com todas as limitações.

Ao **José Vitélio** e **Aislan Sena**, verdadeiros parceiros, pela luta constante, apoio mútuo e por sempre terem acreditado no Projeto.

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

Ao **Prof. Dr. Luiz Mário Janini**, pelos ensinamentos e sugestões no Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo.

Aos colegas do Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) pela cooperação e paciência nas várias horas de trabalho e ensinamento no laboratório: **Wagner Alkimim, Michel Soane e Michele Camargo**.

Às amigas **Mariana Leão de Lima** e **Maria Clara Bizinoto** pela grande receptividade e exemplos de solidariedade.

Ao **Luciano Nunes da Silva** e **Carlos Eduardo Lopes** pelo apoio no Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO) pelas doações de amostra para a execução da pesquisa:
Larissa Viandeli, Arthur Antonucci Vieira Moraes, Eliabe Lopes Cavalcante, Flávio Cavalcante de Assis e Maryanne Mota de Faria.

RESUMO

Os venenos de serpentes são misturas complexas compostas por proteínas e peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, lipídios e carboidratos que apresentam importantes atividades biológicas como citotoxicidade, neurotoxicidade, miólise sistêmica, cardiotoxicidade, danos renais, desordens hematológicas entre outras. Essas moléculas têm-se mostrado como potenciais componentes farmacológicos com potente ação contra a atividade de bactérias, vírus e fungos. O presente trabalho visou avaliar a atividade não citotóxica do veneno bruto da cobra *Bothrops pauloensis* em células mononucleares (CMN) do sangue periférico humano. Após a padronização da obtenção de CMN do sangue periférico e da concentração ideal de fitohemaglutinina (PHA) e interleucina-2 (IL-2) para cultivo celular, foi realizada a avaliação do efeito não citotóxico de diferentes concentrações do veneno bruto da *Bothrops pauloensis* no cultivo celular. As células mononucleares do sangue periférico foram separadas por meio gradiente de densidade e cultivadas em meio de cultura. A avaliação da atividade citotóxica do veneno foi realizada pela visualização da placa após 24, 48 e 72 horas. A concentração 0,05 µg/ml não apresentou atividade citotóxica, sugerindo a possibilidade de utilização em ensaio com CMN infectadas por vírus, bactérias e fungos.

Palavras-chave: *Bothrops pauloensis*, células mononucleares, citotoxicidade, veneno ofídico.

ABSTRACT

Snake's venoms are complexes mixtures of proteins and peptides, aminoacids, nucleotides, lipids and carbohydrates, that shows importants biologicals activities like cytotoxicity, neurotoxicity, systemic myolysis, cardiotoxicity, kidney damage, hematologic disorders, like others. These molecules has shown pharmacological potential components with potent action against bacterias, virus and fungis. This present work aimed assed no cytotoxic effect of the crude venom of the snake *Bothrops pauloensis* in the culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). After standardization of obtaining PBMC and evaluation of ideal concentration of fitohemagglutinin (PHA) and interleukin-2 (IL-2) for the cell culture was performed the evaluation of no citotoxic effect on CMN by different doses of crude venom of *Bothrops pauloensis*. The CMN was separated by density gradient, posterior being cultured. The evaluation of the no cytotoxic activity of the venom was performer by the visualization of the plate after 24, 48 and 72 hours. The concentration 0,05 mg/ml did not appear citotoxic activity, suggesting the possibility of using in testing with CMN infected by viruses, bacteria and fungi.

Key-words: *Bothrops pauloensis*, mononuclear cells, citotoxicity and snake venoms.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	IV
AGRADECIMENTOS	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT	VIII
SUMÁRIO	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
1.INTRODUÇÃO	14
1.1 Características gerais das serpentes	16
1.2 Aspectos gerais dos venenos ofídicos	17
1.3 Componentes de venenos do gênero <i>Bothrops</i>	19
1.3.1 Metaloproteases.....	19
1.3.2 Serinoproteases	20
1.3.3 Fosfolipases	20
1.3.3.1 Miotoxinas e neurotoxinas.....	21
1.3.4 Desintegrinas	23
1.4 Ação terapêutica e uso diagnóstico dos venenos ofídicos	23
1.5 Ação antibacteriana e parasitária dos venenos ofídicos.....	25
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Protocolo geral	29
3.2 Extração do veneno	31
3.3 Casuística.....	31
3.4 Obtenção de CMN do sangue periférico	31
3.4.1 Teste da viabilidade celular	32
3.4.2 Grau de pureza	32
3.4.3 Grau de recuperação.....	33

3.4.4 Padronização da concentração ideal de fitohemaglutinina (PHA) e..... interleucina-2 (IL-2) para utilização no cultivo celular	33
3.4.5 Condições de cultivo das CMN	34
3.4.6 Citotoxicidade.....	35
3.5 Análise de dados.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 Padronização da obtenção de CMN do sangue periférico	37
4.1.1 Variação intra e inter-observador na contagem de leucócitos totais	37
4.1.2 Avaliação da separação de CMN em meio gradiente de densidade.....	40
4.1.3 Análise de recuperação e composição celular (CMN) após separação celular.	40
4.1.4 Avaliação da concentração ideal de PHA e IL-2 para serem acrescidas ao cultivo celular	42
4.2 Avaliação do ensaio de atividade não citotóxica do veneno da <i>Bothrops pauloensis</i> em CMN do sangue periférico	44
5. Perspectivas Futuras.....	48
6. CONCLUSÕES	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

APÊNDICES

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 01: Fluxograma da separação celular para obtenção de células mononucleares para utilização em cultivo celular.....página 29

FIGURA 02: Fluxograma do ensaio de citotoxicidade do veneno bruto da *Bothrops pauloensis* em células mononucleares do sangue periférico para avaliação da concentração mínima não citotóxica.....página 30

FIGURA 03: Associação inter-observador das leituras realizadas de um mesmo ensaio.....página 38

FIGURA 04: Associação intra-observador das leituras realizadas de um mesmo ensaio.....página 39

FIGURA 05: Análise da recuperação, viabilidade, contagem diferencial e grau de pureza após separação de CMN do sangue venoso de doadores saudáveis.página 42

FIGURA 06: Análise do crescimento celular induzido pelas concentrações de PHA e/ou IL-2 durante 72 horas.....página 44

FIGURA 07: Atividade citotóxica de diferentes concentrações do veneno de *Bothrops pauloensis* em CMN nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas.....página 46

LISTA DE ABREVIATURAS

Anti-HBc	Anticorpos contra o antígeno “core” da Hepatite B
Anti-HCV	Anticorpos contra o vírus da Hepatite C
Anti-HIV 1	Anticorpos contra o HIV-1
Anti-HIV 2	Anticorpos contra o HIV-1
Anti-HTLV 1	Anticorpos contra o vírus linfotrópico humano tipo 1
Anti-HTLV 2	Anticorpos contra o vírus linfotrópico humano tipo 2
BjarLAO	L- amino-oxidase da <i>Bothrops jararaca</i>
BPP	Peptídeo potencializador de bradicinina
CMN	Células Mononucleares
CO ₂	Dióxido de Carbono
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
ACV	Veneno da <i>Agkistrodon contortrix</i>
HBS–Ag	Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B
IL-2	Interleucina 2
IRA	Insuficiência renal aguda
LAO	Enzima L-aminoacido Oxidase
PHA	Fitohemaglutinina
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio de cultura celular (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
SFB	Soro Fetal Bovino
SVMPs	Metaloproteinases de veneno de serpentes
TCLE	Termo de Consentimento de Livre Esclarecimento

TSV-LAO	L-amino-oxidase da <i>Trimeresurus stejnegeri</i>
VDRL	Teste não treponêmico (<i>Venereal Diseases Research Laboratory</i>)
µg/mL	Micrograma por mililitro

1.Introdução

O Brasil apresenta uma rica biodiversidade, importante fonte de riqueza, com grande potencial natural para inovações da biotecnologia e para o descobrimento de novas biomoléculas com atividade farmacológica. Atualmente, é o segundo colocado em relação ao número total de répteis, sendo que mais de um terço da fauna de répteis só ocorre em território brasileiro (Nogueira *et al.*, 2003; França *et al.*, 2006; Bérnils, 2010).

O maior problema é o desconhecimento sobre a biologia e a distribuição dos répteis brasileiros, pois não existem programas de monitoramento para avaliação do tamanho das populações e seu estado de conservação. Sabe-se ainda, que as principais fontes ameaçadoras para sobrevivência desses animais são: poluição, doenças, uso insustentável, mudanças climáticas globais, perda e degradação de habitats e introdução de espécies invasoras (Gibbons *et al.*, 2000)

O gênero *Bothrops* compreende aproximadamente 30 espécies, distribuídas por todo o território nacional. As espécies mais conhecidas são *Bothrops atrox*, *Bothrops erythromelas*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops alternatus* e *Bothrops neuwiedi* (Pinho & Pereira, 2001; FUNASA, 2001).

A *Bothrops pauloensis*, cujo veneno é o objeto deste estudo, foi descrita por Amaral em 1925 como *Bothrops neuwiedi pauloensis* constituinte das 12 subespécies de *Bothrops neuwiedi*. Após revisão sistemática, reconhecida pela Sociedade Brasileira de Herpetologia, as 12 subespécies passaram a ser consideradas doze espécies distintas. A *Bothrops pauloensis* tem sido encontrada no Brasil nos Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato do Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo (Bérnils, 2010). As serpentes dessa espécie habitam principalmente zonas rurais e periferias de grandes cidades, com preferência para

ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas, campo aberto e locais onde haja proliferação de roedores. Apresentam hábitos noturnos ou crepusculares (Borges & Araújo, 1998; FUNASA, 2001; Valle & Brites, 2008).

Os casos de picadas por cobra constituem problema de saúde pública devido à gravidade e às sequelas deixadas no paciente. Entretanto, a conservação das serpentes venenosas brasileiras é de extrema importância para preservar o potencial socioeconômico e farmacêutico de seus venenos, uma vez que já originaram medicamentos como analgésico 600 vezes mais poderoso que a morfina e anti-hipertensivos (Martins & Barros, 2008).

1.1 Características gerais das serpentes

As serpentes também chamadas de ofídios são répteis poiquilotérmicos, sem patas, da ordem *Squamata* e subordem *Ofidea* e classe *Reptilia*. Existem no mundo mais de 3000 espécies de serpentes sendo 14% espécies peçonhentas, estas pertencem à superfamília *Colubroidea* e são classificadas de acordo com as características morfológicas, compreendendo quatro famílias: *Viperidae*, *Elapidae*, *Hydrophiidae* e *Colubridae*. As serpentes venenosas presentes no Brasil são da família *Viperidae*, composta pelos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* (Resende *et al.*, 1989; Junqueira, 2005).

As serpentes possuem a pele recoberta por escamas, variando no tamanho e a cor. Elas trocam de pele durante a fase do crescimento. As escamas tem função de proteção devido ao seu movimento de rastejar em ambientes com obstáculos. A coloração da pele está relacionada ao ambiente que vivem, apresentando variações entre indivíduos da mesma espécie (Pough & Groves, 1983).

O órgão de Jacobson localizado na parte anterior do palato da serpente desempenha função semelhante ao olfato sendo formado por duas câmaras sensitivas. Ele recebe informações por um ducto que o liga a língua bífida da serpente responsável pela captação de odores. A serpente usa o olfato para localização de presas, predadores e parceiros sexuais. (Hoge & Romano-Hoge, 1979; Pough & Groves, 1983).

Algumas espécies de serpentes são capazes de produzir o veneno, mas nem todas são capazes de o inocularem, sendo denominadas de acordo com essas características, peçonhentas ou não peçonhentas. As serpentes peçonhentas possuem uma estrutura especializada (presas) localizada na porção

posterior da boca, conectadas às glândulas secretoras de veneno, responsável pela inoculação do veneno (Zug *et al.*, 2000; Fry *et al.*, 2009).

1.2 Aspectos gerais dos venenos ofídicos

Os venenos ofídicos são uma complexa mistura composta por proteínas e peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, lipídios e carboidratos que apresentam atividade farmacológica (Warrell, 2010). Eles desempenham importante papel na imobilização e incapacitação da presa, assim como na sua digestão. Os constituintes do veneno de cobra podem apresentar diferentes atividades fisiológicas, hematológicas e neurotransmissoras no homem. O estudo desses fatores tem contribuído para a descoberta de vários mecanismos moleculares envolvidos nesse processo fisiológico e no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de doenças cardiovasculares e hematológicas (Kini, 2006).

As várias enzimas constituintes dos venenos botrópicos produzem duas atividades principais: proteolítica ou necrosante, que determina edema inflamatório na região da picada, e coagulante, que atua através de uma ou mais ações semelhantes às atividades da trombina (Ribeiro & Jorge, 1997).

Os envenenamentos por serpentes da família dos viperídeos caracterizam-se por efeitos locais (mionecrose, hemorragia, edema, dor) e, em casos moderados e graves, alterações sistêmicas como coagulopatias, hemorragias, choque cardiovascular e insuficiência renal aguda (Koh & Armugam, 2006). Os efeitos locais induzidos por venenos de viperídeos afetam drasticamente o tecido muscular, os vasos sanguíneos e a pele e induzem lesões com seqüelas que podem se complicar com infecções dificultando o manejo

clínico. Em alguns casos, é necessária a cirurgia de retirada do tecido já necrosado e outras terapias complementares (Gutierrez & Lomonte, 2003; Soto, 2005). Em relação às reações fisiopatológicas devido ao envenenamento por algumas cascavéis, como a *Crotalus durissus terrificus*, apresentam alterações irrelevantes no local da picada, mas observam-se potentes atividades neurotóxicas e miotóxicas sistêmicas (Gutierrez & Lomonte, 2003).

Existe diferença nas reações do envenenamento devido ao estágio de crescimento da serpente. O estudo comparativo realizado entre os venenos de *Bothrops jararaca* adultas e recém nascidas demonstrou diferença nas atividades biológicas desses venenos. O veneno das cobras adultas apresentou maior letalidade em ratos enquanto que o veneno das cobras recém nascidas apresentou baixa atividade proteolítica e hemorrágica (Antunes *et al.*, 2010).

A insuficiência renal aguda (IRA) é uma complicação grave dos envenenamentos botrópico e crotálico (Simões *et al.*, 2008). As lesões renais causadoras desta complicação são a glomerulonefrite aguda, necrose tubular e necrose cortical renal (Amaral *et al.*, 1986). Deve-se ressaltar que no envenenamento por *Crotalus* temos maior incidência de casos classificados como graves e também maior ocorrência de IRA. A IRA é considerada a principal causa de óbito, tanto no acidente botrópico como no crotálico (Pinho & Pereira, 2001). O veneno da *Bothrops marajoensis* induz alterações fisiológicas no sistema renal: diminuição da perfusão pressórica, da resistência renal e vascular, diminuição das taxas de filtração glomerular e do fluxo urinário. Além disso, apresentou alteração cardiovascular com indução de hipotensão e bradicardia (Evangelista *et al.*, 2010).

1.3 Componentes de venenos do gênero *Bothrops*

1.3.1 Metaloproteinases

As metaloproteases de veneno de serpentes (SVMPs) compreendem uma subfamília de enzimas zinco-dependentes de massa molecular variável responsáveis pela mionecrose no local da picada, hemorragias e reações inflamatórias (Gutiérrez & Lomonte, 1989). Elas são classificadas em quatro grupos conforme seus domínios estruturais: P-I, P-II, P-III e P-IV. O grupo P-I apresenta somente o domínio metaloprotease, com cerca de 24 KDa de massa molecular e pouca ou nenhuma atividade hemorrágica. O grupo P-II apresenta além do domínio metaloprotease, o domínio desintegrina. O grupo P-III é considerado como o de maior atividade hemorrágica, apresentando domínio tipo desintegrina e um domínio rico em cisteína e finalmente, o grupo P-IV com os domínios tipo desintegrina, rico em cisteína e lectina tipo-C (Bjarnason & Fox, 1994; Fox & Serrano, 2005)

As SVMPs têm como alvo de suas atividades proteolíticas as proteínas da coagulação sanguínea como o fibrinogênio e o fator de von Willebrand. Elas apresentam o mecanismo de degradação enzimática da membrana basal e efeito direto sobre as células endoteliais dos capilares considerados como os principais mecanismos de ação indutores de hemorragia (Gutierrez & Rucavado, 2000).

A *neuwiedase* é uma metaloprotease purificada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, membro da família das metzincinas, capaz de induzir hemorragia local ou hemorragia pulmonar dependendo da via de administração, intramuscular ou intravenosa, respectivamente (Rodrigues *et al.*, 2001; Baldo *et al.*, 2007). A *neuwiedase* é capaz de induzir reações inflamatórias e mionecrose quando

administrada em altas doses. Ela pode degradar componentes da matriz extracelular como a fibronectina e o colágeno tipo I agravando o quadro da hemorragia (Rodrigues *et al.*, 2000). A *neuwiedase* atua na degradação de proteínas expressas pelos fibroblastos responsáveis pela formação da laminina, que auxilia no processo de invasão do *Toxoplasma gondii* e taquizoítos em fibroblastos. Como a laminina atua como ponte de fixação do *T. gondii* e o taquizoíto reconhece receptores de laminina durante a sua fixação nas células alvo, a *neuwiedase* pode impedir que a laminina seja usada como meio para adesão do parasita, diminuindo a infecção (Bastos, 2008).

1.3.2 Serinoproteases

As serinoproteases apresentam diversas ações no organismo dos seres vivos como auxiliar no processo de digestão de proteínas da dieta alimentar, em algumas vias de sinalização, diferenciação e desenvolvimento celular e participação da cascata de coagulação. As serinoproteases presentes no veneno botrópico são caracterizadas como enzimas que tem atividade do tipo trombina pela ativação dos componentes sanguíneos envolvidos no processo de coagulação, fibrinólise e agregação plaquetária, que afetam a cascata da coagulação (Serrano & Maroum, 2005).

1.3.3 Fosfolipases

As fosfolipases (PLA₂) dos venenos de cobras são classificadas em dois grupos de acordo com suas estruturas primárias. No grupo I estão incluídas as fosfolipases A₂ dos venenos de serpentes pertencentes à família *Elapidae* e no

grupo II estão classificadas as PLA₂ dos venenos de serpentes da família *Viperidae* (Dennis, 1994; Páramo *et al.*, 1998).

As PLA₂ iniciam a cascata inflamatória pelo aumento da permeabilidade microvascular com recrutamento de leucócitos para os tecidos e liberação de mediadores inflamatórios, iniciando desordens inflamatórias locais e sistêmicas em humanos. As PLA₂ modificam a microviscosidade da fase lipídica da bicamada hidrofóbica de membranas, afetando a atividade funcional de enzimas ligadas à membrana (Koh & Armugam, 2006).

As PLA₂ presentes nos venenos de serpentes apresentam diversos efeitos fisiológicos como neurotoxicidade, miotoxicidade, hipotensão e hemorragia interna, atividade antiplaquetária, anticoagulante e inflamatória. No entanto, nem todas as fosfolipases apresentam todos esses efeitos (Masuda *et al.*, 2005). Elas catalisam a hidrólise na ligação 2-acil éster de fosfolipídios, liberando como produtos os lisofosfolipídios e ácidos graxos livres (Six & Dennis, 2000). Esse processo resulta na liberação do ácido araquidônico, precursor de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, iniciando uma série de reações inflamatórias (Kini & Evans, 1989). As PLA₂ apresentam efeito anticoagulante pela hidrólise e destruição da superfície de membrana necessária para a formação do complexo de coagulação (Kini, 2006).

1.3.3.1 Miotoxinas e Neurotoxinas

A mionecrose presente na picada de cobra pode ser causa direta da ação de PLA₂ miotóxicas em membranas plasmáticas das células musculares ou causa indireta da ação de metaloproteinases hemorrágicas que degeneram vasos e causam isquemia (Rodrigues *et al.*, 2004). Elas desorganizam os fosfolipídeos e

induzem o influxo de Ca^{2+} agindo na membrana sarcoplasmática (Diaz *et al.*, 1992).

As miotoxinas isoladas dos venenos de cobras pertencem ao grupo IIA das PLA_2 e podem ser subdivididas no grupo das miotoxinas Asp49 com atividade enzimática baixa ou moderada e no grupo das miotoxinas Lys49 que não apresentam atividade hidrolítica. A Lys 49 do veneno Botrópico demonstrou atividade neuromuscular *in vitro* (Gallacce & Cavalcante, 2010).

Páramo *et al.* (1998) em um estudo com duas miotoxinas (Lys49 e Asp49) isoladas do veneno da *Bothrops asper*, pertencentes ao grupo II das PLA_2 , demonstraram a atividade dessas contra bactérias gram-negativas e gram-positivas.

As neurotoxinas presentes no veneno da cobra são responsáveis pelos efeitos no sistema nervoso central. A principal ação das neurotoxinas é a capacidade de bloqueio da transmissão neural, pela ligação competitiva, com os receptores pós-sinápticos das membranas do músculo esquelético e neurônios, impedindo a transmissão neuromuscular e causando morte por asfixia (Tsetlin & Hucho, 2004). Cambraia *et al.* (2003) demonstrou que as PLA_2 básicas miotóxicas (BnpTX-I e II) derivadas da *Bothrops paulbensis* induzem miotoxidade *in vivo* e citotoxicidade *in vitro*, apresentando atividade neurotóxica em ensaios com camundongo. Assim, como as neurotoxinas encontradas em outras espécies de cobra, principalmente no veneno da cobra *Dendroaspis angusticeps* (Mamba verde), apresentam bloqueadores altamente potentes dos canais de potássio nos neurônios (Harvey & Robertson, 2004).

1.3.4. Desintegrinas

As desintegrinas derivadas do veneno de cobra são peptídeos de baixo peso molecular, que se ligam às integrinas, proteínas de superfície celular responsáveis pela proliferação, diferenciação e ativação celular. Nesse contexto, as desintegrinas bloqueiam as integrinas para se ligarem a outras células, podendo bloquear o principal receptor de fibrinogênio (GPII/IIIa), mediador da agregação plaquetária (Rojnuckarin, 2008). Os venenos das cobras *Agkistrondon rhodostama* e *Trimeresurus gramineus* apresentam uma proteína que apresenta potente ação inibitória da agregação plaquetária (Dennis *et al.*, 1989).

1.4 Ação terapêutica e uso diagnóstico dos venenos ofídicos

Os componentes do veneno de cobra têm resultado na produção de vários medicamentos usados para o tratamento das doenças hematológicas como as doenças do sistema de coagulação e também para as doenças cardiovasculares. Além disso, têm sido implementados em alguns *kits* laboratoriais para diagnóstico de doenças da coagulação sanguínea (Gawade, 2007). As enzimas de veneno de cobra semelhantes à trombina (SVTLEs) por não sofrerem ação inibitória da heparina são usadas em testes com amostras sanguíneas heparinizadas. Um dos testes sanguíneos utilizado nesses casos é o Reptilase Time (RT) para a detecção de deficiência ou anormalidades do fibrinogênio (Funk *et al.*, 1971). O batroxobin é uma proteína do veneno da *Bothrops atrox moojeni* usado no tratamento de trombose vascular e também para monitorar os níveis de fibrinogênio em pacientes em terapia com a heparina (Bell, 1997).

As cobras *Oxyuranus scutellatus scutellatus* têm seus venenos constituídos por uma elevada proporção de enzimas sendo utilizados no teste de protrombina (Marsh., 2001; Rao & Kini, 2002). O veneno da *Agkistrodon contortrix* (ACV) é usado como um potente ativador da proteína C em ensaios laboratoriais (teste ACV) para avaliação da coagulação (Klein & Walker, 1986; Robert *et al.*, 1996; Kirschbaum *et al.*, 1999).

A metaloproteinase isolada do veneno da *Echis carinatus* denominada ecarin e, o textarin extraído do veneno da *Pseudonaja textilis* são usados em laboratório para detecção da doença de von Willebrand. O BotrocetinTM é uma proteína agregante plaquetária, extraída do veneno da *Bothrops jararaca*, utilizada nos ensaios para estudo do fator de von Willebrand. As enzimas RVV-X e RVV-V isoladas do veneno da cobra *Vipera russelli* são usadas no diagnóstico laboratorial para detectar a doença de von Willebrand (Rosing *et al.*, 2001; Tans & Rosing, 2001). Ancrod é uma enzima proteolítica extraída do veneno da cobra *Agkistrodon rhodostoma* utilizado como anticoagulante nas formas graves de insuficiência arterial periférica (Gawade, 2007)

A medicação para tratamento de hipertensão, denominada captopril, foi descoberta após pesquisas sobre a ação de um peptídeo potencializador da bradicinina do veneno da *Bothrops jararaca* denominado BPP5a que é efetivo na diminuição da pressão sanguínea. A partir desse medicamento foram desenvolvidas outras classes de inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) específicos como o enalapril e o lisinopril (Cushman & Ondetti, 1991; Bailey & Wilce, 2001).

1.5 Ação antimicrobiana e parasitária dos venenos ofídicos

Os venenos das serpentes também têm-se apresentado como potentes antibacterianos. Foi observado que a cavidade oral e os dentes das serpentes apresentam a presença de bactérias patogênicas e a baixa incidência de infecções bacterianas no envenenamento levou ao desenvolvimento de estudos para avaliar a presença de moléculas antimicrobianas nos venenos (Talan *et al.*, 1991).

O estudo das miotoxinas II (Lys49) e III (Asp49), isoformas constituintes do grupo II da PLA₂ do veneno da *Bothrops asper* mostrou que elas são letais para uma grande variedade de bactérias (Páramo *et al.*, 1998). A fosfolipase básica denominada BnpTX-I derivada da *Bothrops pauloensis* apresentou atividade bactericida sobre *Eschericia coli* e *Staphylococcus aureus* (Cabraia *et al.*, 2003). Outro estudo realizado com a fração Bp-LAAO da *Bothrops pauloensis* também demonstrou atividade de supressão do crescimento dose dependente sobre bactérias gram-negativas e gram-positivas (Rodrigues *et al.*, 2008). A LAO da *Bothrops marajoensis* apresentou atividade inibitória dose dependente no crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, e *Staphylococcus aureus* e das formas promastigotas da *Leishmania chagasi* e *amazonensis* (Torres *et al.*, 2010). Já foi identificada atividade antibacteriana em 30 diferentes venenos de serpentes asiáticas, africanas, australianas e norte-americanas (Stiles *et al.*, 1991).

Borkow & Ovadia (1999) demonstraram o efeito de dois venenos de cobra (*Naja atra* e *Naja nigricollis*) sobre células infectadas com o vírus Sendai. O teste foi realizado em três etapas. Na primeira etapa o vírus Sendai foi pré-tratado

com o veneno antes da adição aos eritrócitos humanos; na segunda o vírus não tratado foi colocado em contato com os eritrócitos já previamente tratados com o veneno e, na terceira o veneno foi adicionado aos eritrócitos pré-infectados com o vírus Sendai. O resultado demonstrou maior ação hemolítica dos venenos das duas cobras na terceira etapa.

Pesquisadores da Academia de Ciências da China avaliaram a atividade contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 do ácido LAO do veneno da cobra *Trimeresurus stejnegeri* (TSV-LAO) utilizando a técnica de ELISA para captura de antígeno p24 do HIV-1. Além disso, avaliaram o efeito da TSV-LAO na infectividade do HIV pela inibição na formação de sincício em linhagens celulares C8166 e H9. O TSV-LAO mostrou significativo poder citotóxico celular, revelado pelo ensaio do MTT na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Os resultados identificaram que a atividade anti-HIV-1 da TSV-LAO está ligada à produção da catalase. O MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) é uma substância colorimétrica utilizada para avaliação de citotoxicidade celular com a redução dos anéis de tetrazolium em formazina pela succinil desidrogenase mitocondrial de células viáveis. A ação do TSV-LAO ocorre pela ligação na membrana celular e juntamente com a peroxidase inicia algumas reações sinalizadoras de atividade celular do hospedeiro resultando na inibição da infecção e/ou replicação do HIV (Zhang *et al.*, 2003)

Alguns estudos com peptídeos derivados de venenos de cobra demonstraram ação na inibição da infecção pelo HIV. A *immunokine* derivada do veneno da cobra *Naja naja siamensis* demonstrou ação inibitória da infecção de linfócitos pelo HIV e pelo vírus da imunodeficiência felina. (Meenakshisundaram *et al.*, 2009).

A pesquisa com o veneno da cobra *Crotalus durissus terrificus* em células de rim de macaco (VERO) tratadas com diferentes concentrações do veneno e infectadas com o vírus do sarampo apresentou um efeito inibidor da adsorção do vírus às células VERO (Petricevich & Mendonça, 2003).

As propriedades do ácido LAO do veneno da cobra *Bothrops jararaca* (BjarLAAO-1) foram estudadas quanto a sua ação antiviral (vírus da dengue tipo 3) e antiparasitária (*Trypanossoma cruzi* Y e *Leishmania* sp). Em relação ao vírus da dengue tipo 3 as células infectadas com as concentrações padronizadas das cepas virais e previamente tratadas com o veneno mostraram diminuição do título viral quando comparadas com as células infectadas com o vírus não tratadas. A adição do ácido L-amino oxidase diretamente nas formas promastigotas de *Leishmania* sp e *Trypanossoma cruzi* mostrou morte parasitária dose dependente (Sant'ana *et al.*, 2008).

A LAO derivada do veneno da *Bothrops pauloensis*, em concentrações dose dependente, induziu a citotoxicidade em células SKBR-3 (células mamárias), Jukart (células derivadas da leucemia aguda de células T) e linhagens celulares do tumor ascítico de Erlich (Rodrigues *et al.*, 2008).

2. Objetivos

2.1. Geral

Avaliar a atividade não citotóxica do veneno da cobra *Bothrops pauloensis* em CMN do sangue periférico humano.

2.1.2. Específicos

- Padronizar a obtenção de CMN do sangue periférico para cultivo celular
- Identificar as concentrações ideais de fitohemaglutinina e/ou interleucina-2 que deverão ser acrescentadas ao cultivo celular
- Identificar a concentração não citotóxica do veneno da *Bothrops pauloensis* sobre as CMN do sangue periférico

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Protocolo Geral

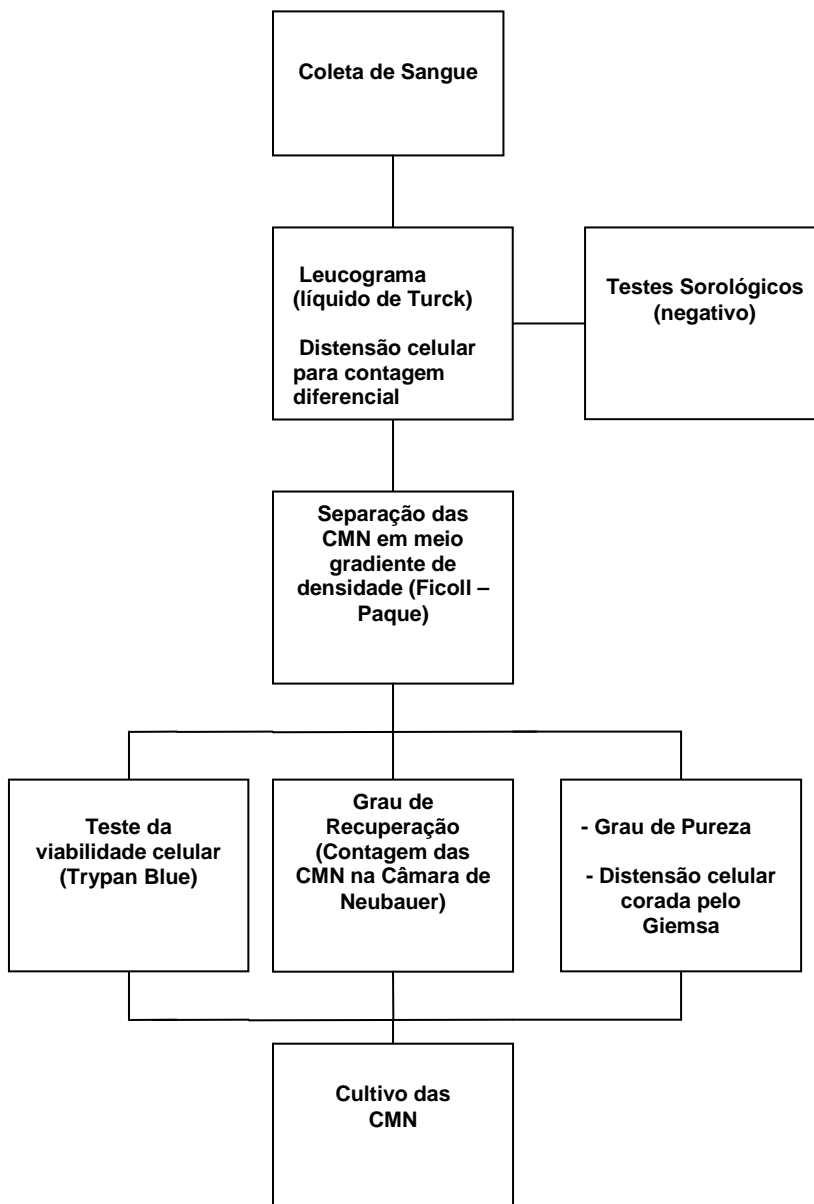


Figura 1 - Fluxograma da separação celular para obtenção de células mononucleares para utilização em cultivo celular.

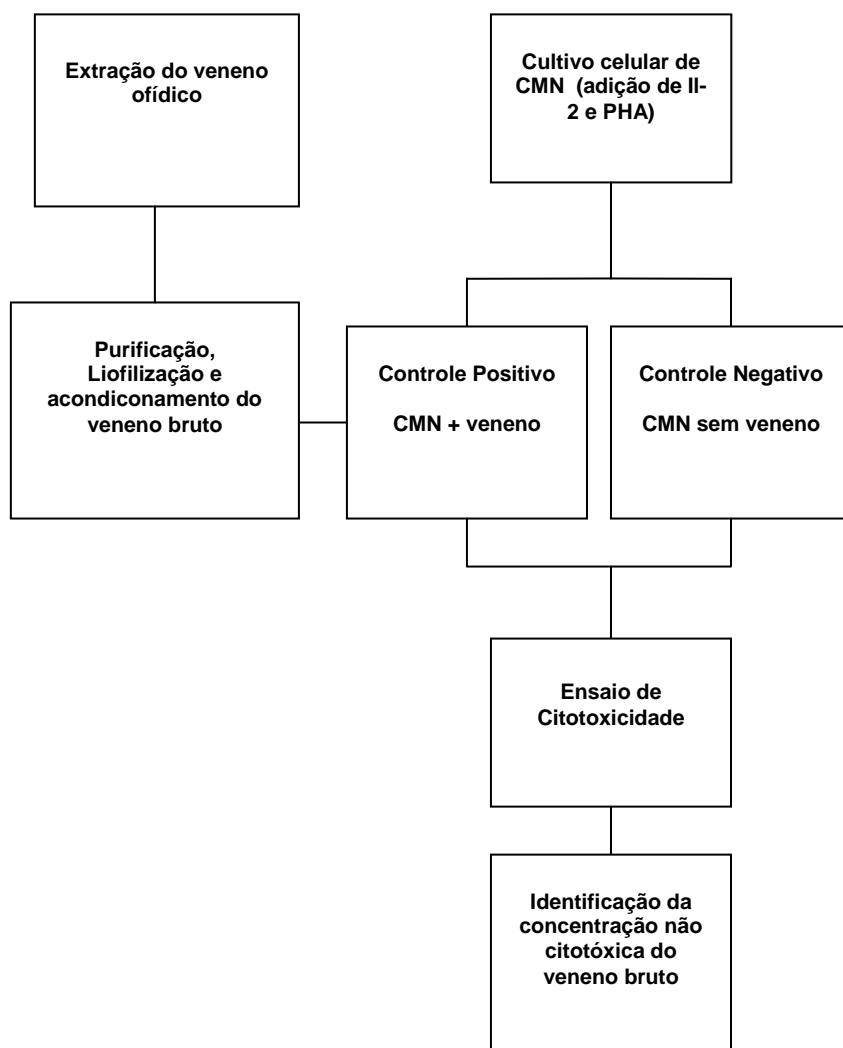


Figura 2 – Fluxograma do ensaio de citotoxicidade do veneno bruto da *Bothrops pauloensis* em células mononucleares do sangue periférico para avaliação da concentração mínima não citotóxica.

3.2. Extração do veneno

Os venenos das serpentes, mantidas no serpentário do Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, foram extraídos 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, esterilizados por filtração, liofilizados e mantidos sob ultracongelamento a -86°C.

3.3. Casuística

Participaram do estudo 12 indivíduos saudáveis de ambos os sexos, com faixa etária de 20 a 30 anos. Após o esclarecimento sobre a pesquisa e assinatura do Termo de Consentimento de Livre Esclarecimento (TCLE) (Apêndice 2) foram colhidos 20 mL de sangue venoso para obtenção das CMN e realização da sorologia. O Projeto de Pesquisa foi analisado e liberado com parecer favorável (Apêndice 1) para o desenvolvimento dos trabalhos pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo (CEP 0308/10).

3.4. Obtenção de células mononucleares (CMN) de sangue periférico

As CMN foram obtidas a partir de 12 indivíduos doadores saudáveis. Foram utilizadas apenas as amostras de sangue negativas para todos os testes de triagem. Os testes sorológicos de triagem realizados foram: Anti-HBc, HBS-Ag, Anti-HCV, Anti-HIV 1 e 2, Anti-HTLV 1 e 2, VDRL e Doença de Chagas. Foram extraídos 20 mL de sangue em tubo heparinizado. Após a coleta foram utilizados 20 µL de sangue total para contagem de leucócitos totais com diluição de 20 vezes em líquido de Turck.

As CMN foram isoladas através da técnica de separação celular por gradiente de densidade (Ficoll-paque, $d=1077$ g/L, Amersham). O sangue total heparinizado foi centrifugado por 10 minutos a 2000 rpm para formação do creme leucocitário. O creme leucocitário foi retirado e suspenso até o volume de 10 mL em salina tamponada (PBS) e posteriormente aplicado sobre o meio gradiente de densidade. Essa solução foi centrifugada por 20 minutos (3000 rpm) a 18°C. As células da interface foram retiradas com auxílio de pipeta Pasteur e lavadas em tampão PBS por três vezes (10 minutos a 2000 rpm a 18°C). As células foram contadas em câmara de Neubauer e mantidas em meio RPMI 1640 com 20 mM de HEPES (Gibco-BRL™, Grand Island, NY, EUA) acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (SFB), 2mM de L-glutamina (Gibco-BRL™).

3.4.1 Teste da viabilidade celular

O teste de viabilidade celular utilizado foi o corante de exclusão Trypan Blue realizado antes e após o cultivo celular. Foram retirados 20µL da suspensão das CMN para diluição com o corante Trypan blue a 0,1% em PBS. As CMN foram avaliadas em relação a sua viabilidade, utilizando-se no experimento as suspensões celulares que apresentaram o grau de viabilidade maior ou igual a 95%.

3.4.2 Grau de Pureza

O grau de pureza foi determinado a partir da porcentagem de CMN na suspensão, após a separação, em relação a presença de polimorfonucleares. Foi realizada uma distensão celular com a suspensão das CMN obtidas utilizando-se a coloração de Giemsa, com leitura em microscopia ótica comum. Foram

contadas 200 células para quantificação percentual de CMN. A porcentagem aceitável para a realização dos experimentos subsequentes foi maior ou igual a 90%.

3.4.3 Grau de Recuperação

O grau de recuperação foi avaliado correlacionando o número de células mononucleares presentes no esfregaço sanguíneo do sangue total, com o número de células mononucleares presentes na suspensão após a separação celular. Foram separados 20 μ L da amostra de sangue heparinizado, imediatamente após a coleta, para contagem total de leucócitos diluídos 20 vezes em líquido de Turck. Posteriormente, foi realizada a leucometria em câmara de Neubauer. No momento da coleta de sangue total e no final da técnica para obtenção de CMN foi realizado um esfregaço, corado pelo método de Giemsa, visualizado em microscopia óptica comum. No final da separação foi realizada a contagem de CMN na câmara de Neubauer. O grau de recuperação foi determinado com a relação da porcentagem de CMN antes e após a separação celular. Foi utilizado para a análise de dados o teste de correlação de Spearman das leituras de uma mesma amostra por diferentes observadores ou por um único observador, para verificar se ocorreram variações intra e inter-observadores.

3.4.4. Padronização da concentração ideal de fitohemaglutinina (PHA) e interleucina-2 (IL-2) para utilização no cultivo celular

A padronização da concentração ideal de PHA e IL-2 foi realizada após separação celular utilizando-se 200 μ L da solução com concentração celular 2×10^5 CMN em cada poço da placa de cultivo celular. Foram adicionados 10 μ L da

dosagem ótima e sub-ótima da PHA e 1µL de IL-2 da dose ótima e subótima nos poços, em conjunto e separadamente.

Para o preparo da concentração ótima de PHA foi realizada a diluição de 90 µL de solução estoque de PHA diluída em 810 µL de meio RPMI e para a concentração de PHA subótima foi utilizado 2375 µL RPMI com 125 µL de solução de estoque de PHA.

A concentração ótima da IL-2 foi testada utilizando-se 9 µl da solução estoque de IL-2 diluída em 81 µL de RPMI e na dosagem subótima utilizou-se 12,5 µL da solução estoque de IL-2 em 237,5 µL de meio RMI. Essas soluções foram adicionadas em triplicata aos poços da placa de cultivo celular contendo 2×10^5 células/ml em meio RPMI acrescido de 10% SFB. Durante 72 horas foram observados os resultados.

3.4.5. Condições de cultivo das CMN

2×10^5 células/ml, em cada poço da placa de cultivo celular, foram ativadas com PHA e IL-2 por 72 horas, mantidas em meio RPMI 1640 (Gibco-BRL™, Grand Island, NY, EUA) acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado, 2 mM de L-glutamina (Gibco-BRL™), por 72 horas, com ou sem o veneno bruto. As placas de cultura foram monitoradas diariamente quanto à contaminação com agentes microbianos tais como bactérias, fungos filamentosos e leveduras em microscópio óptico de luz invertida. O cultivo celular foi mantido por até 72 horas à temperatura de 35-37°C e 5% de CO₂.

3.4.6 Citotoxicidade

O teste de viabilidade foi realizado utilizando-se o corante vital Trypan Blue nas soluções com diferentes concentrações do veneno de *Bothrops pauloensis*. O veneno liofilizado foi diluído em meio RPMI a 10% de soro fetal bovino. As concentrações testadas do veneno foram 5 µg/ml, 0,5 µg/ml e 0,05 µg/ml. A concentração celular utilizada foi 2×10^5 células/mL em cada poço dos testes da placa de cultivo celular. Os testes de cada concentração foram realizados em triplicata. A avaliação da atividade citotóxica do veneno em CMN foi realizada pela visualização da placa após 24, 48 e 72 horas.

O Trypan Blue é um corante de exclusão de morte celular para determinação do número de células viáveis presentes na suspensão celular. As células vivas possuem a membrana celular intacta que não são coradas pelo Trypan Blue, enquanto as células mortas são coradas apresentando uma coloração azul em seu citoplasma. A quantificação de morte celular foi realizada com a contagem de células coradas na câmara de Neubauer após os períodos de 24, 48 e 72 horas, retirando-se 10µL da suspensão para diluição em Trypan Blue a 4% para análise da viabilidade celular.

3.5 Análise dos dados

Para verificar a correlação intra e inter-observador, foi usado o coeficiente de correlação de Spearman, sendo significativo quando $p \leq 0,05$. Enquanto que, para analisar se houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de PHA e/ou IL-2 adicionados no cultivo celular, foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA), assumindo que a diferença foi significativa sempre que $p \leq$

0,05. Já para a análise da recuperação, viabilidade, contagem diferencial e grau de pureza das CMN foi feita uma análise descritiva dos dados, apresentando em tabela as frequências simples, médias e desvios-padrões. Os dados referentes às análises das concentrações não citotóxicas do veneno foram plotados em um gráfico de linha para melhor visualização do resultado. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Bioestat versão 5.0 (Ayres *et al.*, 2007).

4. Resultados e Discussão

4.1 Padronização da obtenção de CMN do sangue periférico

Para a realização dos cultivos celulares é fundamental a padronização da obtenção de CMN sendo que para esse procedimento são realizadas várias contagens de células em câmara de Neubauer.

4.1.1 Variação intra e inter-observador na contagem de leucócitos totais

Foi realizada a avaliação da variação intra e inter-observador das leituras para contagem de leucócitos totais como forma de tornar o experimento o mais fidedigno em todo seu processo.

Na figura 3 observamos que existiu associação forte e altamente significativa quando as duas leituras de um mesmo experimento foram efetuadas por observadores diferentes ($r = 0,996$; $P < 0,001$, correlação de Spearman), indicando que não ocorreu diferença significativa entre as leituras.

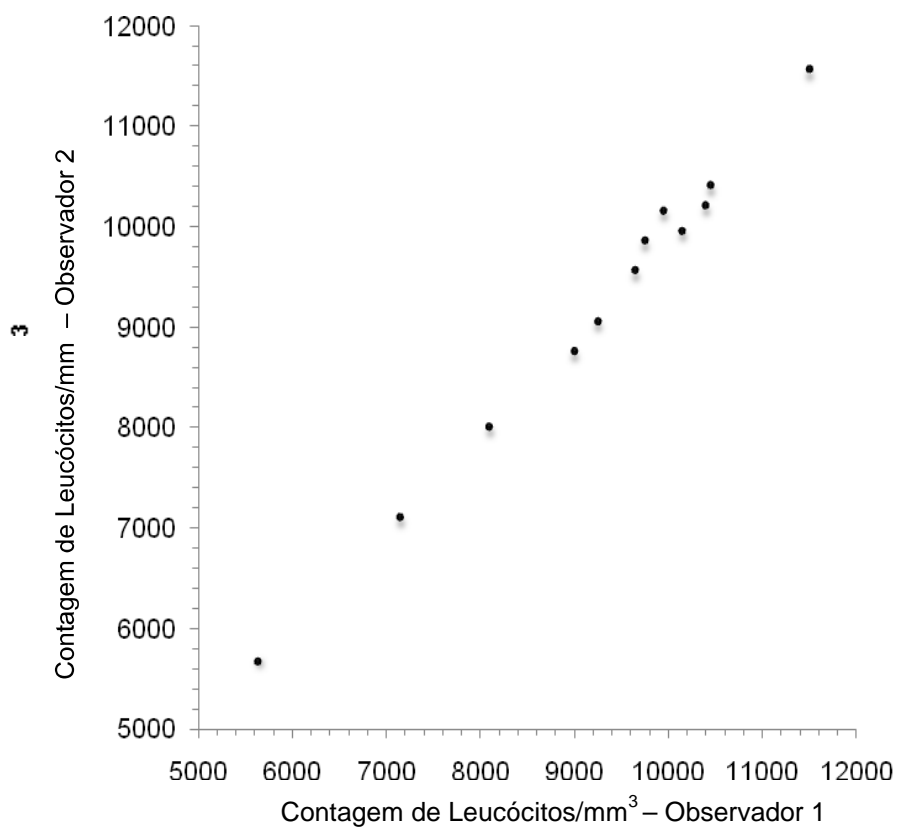


Figura 3. Leituras referentes à contagem de leucócitos realizadas em câmara de Neubauer de um mesmo ensaio por observadores distintos ($r = 0,996$; $P < 0,001$, correlação de Spearman).

Na figura 4 observa-se a associação forte e altamente significativa ($r = 0,997$, correlação de Spearman; $P < 0,001$) existente entre diferentes leituras de um mesmo experimento pelo mesmo observador, indicando que não ocorreu diferença significativa entre as leituras.

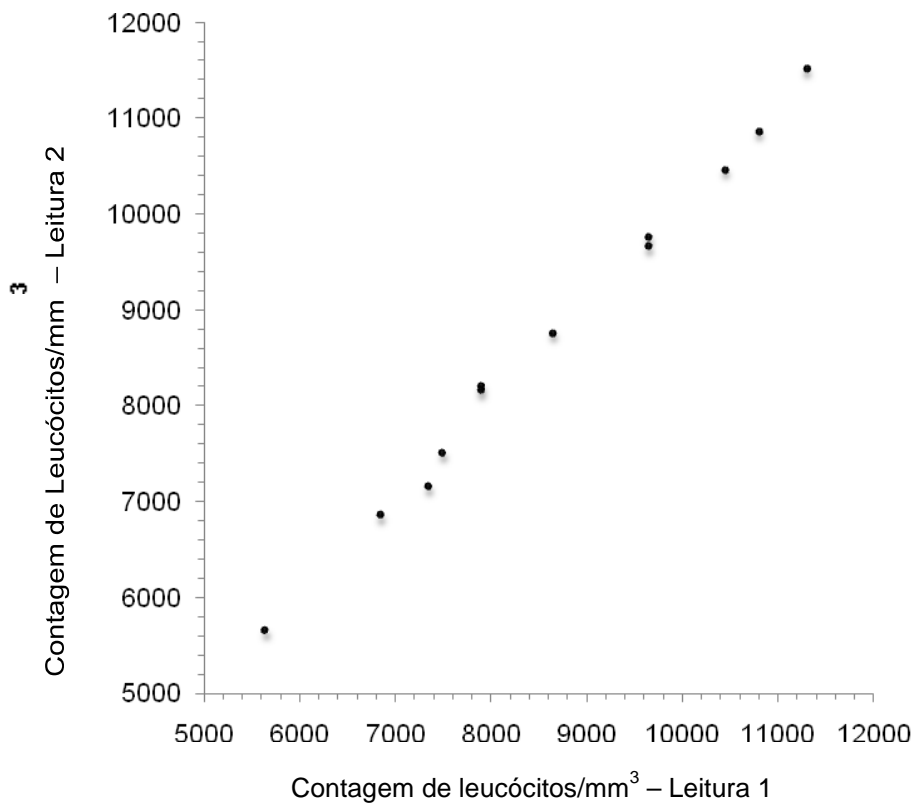


Figura 4. Leituras referentes à contagem de leucócitos realizadas em câmara de Neubauer de um mesmo ensaio por um único observador ($r = 0,997$; $P < 0,001$, correlação de Spearman).

A leitura na câmara de Neubauer exige capacidade técnica do observador para contagem celular o que pode levar ao aparecimento de variações nos resultados encontrados. Contudo, verificamos com a análise de dados que as leituras intra e inter-observador (Figura 3 e 4) na contagem de leucócitos totais não apresentaram variações significativas, que poderiam ocorrer durante o experimento interferindo nos resultados e na quantidade real de CMN recuperadas após separação e mantidas em cultivo.

4.1.2 Avaliação da separação de CMN em meio gradiente de densidade

Após a separação das CMN em meio gradiente de densidade (Ficoll-paque) das amostras de sangue heparinizado coletadas de doadores foi avaliado o grau de pureza, recuperação e viabilidade celular. Conforme representado na Tabela 1 a porcentagem representativa de recuperação celular foi crescente e o grau de viabilidade sempre com porcentagem maior ou igual a 95%.

4.1.3 Análise de recuperação e composição celular (CMN) após separação celular

A análise de recuperação e composição celular foi realizada, após separação de CMN obtidas pela centrifugação em meio gradiente de densidade (Ficoll-paque), para determinar a quantidade real de células mononucleares recuperadas após o processo de separação avaliando a porcentagem de pureza da solução. O valor aceitável do grau de recuperação utilizado para o cultivo celular foi maior ou igual a 86% e da viabilidade celular maior ou igual a 95%. A média das porcentagens da recuperação de CMN, em relação às doze amostras colhidas e utilizadas no cultivo celular, foi de 67,3%. A média para o grau de pureza das amostras foi de 96% (Tabela 1). Samato *et al.* (2009) no estudo com células mononucleares realizou técnica de separação celular utilizando o ficoll-paque e o teste de Trypan blue na avaliação da viabilidade celular com resultados da porcentagem aproximadamente de 98%, semelhante ao desta pesquisa.

Observa-se que na padronização da obtenção de CMN do sangue periférico humano obteve-se aumento gradativo no percentual de recuperação celular, que foi de 40 a 86% (Tabela 01). Essa melhora na recuperação celular deve-se ao aumento da habilidade técnica dos pesquisadores em retirar o anel leucocitário do sangue total e na coleta de CMN após centrifugação do sangue

em Ficoll-paque, aumentando a quantidade de células recuperadas no final do procedimento. Além disso, as condições fisiológicas individuais dos doadores podem levar às diferenças na porcentagem do grau de pureza da separação celular, uma vez que avalia-se a qualidade celular.

Embora outras metodologias pudessem ser utilizadas para avaliação da viabilidade celular, como o método colorimétrico MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium) Alamar Blue e a coloração por cristal violeta, o teste utilizado na pesquisa para avaliação da viabilidade celular foi o Trypan Blue por ser um reagente barato e de fácil manejo e apresentando resultado ideal para o experimento.

O Trypan Blue é utilizado em vários estudos da avaliação da viabilidade/citotoxicidade de compostos sobre a proliferação celular. Esse corante foi utilizado com essa finalidade na pesquisa de Stábeli *et al.* (2006) na avaliação da citotoxicidade de PLA₂ do veneno da *Bothrops moojeni* em células tumorais e na pesquisa de Petricevich & Mendonça (2003) para análise da viabilidade celular de células VERO tratadas com diferentes concentrações do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Bastos (2006) determinou a citotoxicidade da subunidade ácida (crotapotina) do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em CMN humanas utilizando a coloração Trypan Blue. A metodologia e os padrões de viabilidade utilizados, igual ou superior a 90%, foram semelhantes aos desta pesquisa. Ayres (2010) em sua pesquisa para avaliar a ação do veneno de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops pirajai* na modulação de eventos da imunidade humoral e celular utilizou a mesma coloração para determinação da viabilidade das CMN.

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

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

4.1.4 Avaliação da concentração ideal de PHA e IL-2 para serem acrescentadas ao cultivo celular.

Foi realizada a análise da utilização de IL-2 e PHA no cultivo celular, objetivando verificar o melhor resultado da replicação celular nas dosagens ótima e subótima, em conjunto e separadamente.

Depois de realizada a Análise de Variância (ANOVA), verificou-se que houve diferença significativa entre as condições de PHA e IL-2 ($p= 0,0002$), sendo que a diferença foi significativa entre as seguintes condições 1 e 2 ($p<0,05$), 1 e 6

($p < 0,05$), 2 e 5 ($p < 0,01$), 2 e 7 ($p < 0,01$), 4 e 7 ($p < 0,05$), 5 e 6 ($p < 0,01$) e 6 e 7 ($p < 0,01$).

A condição 6 foi selecionada para o uso no experimento devido ter apresentado uma média alta e a quantidade de células presentes no cultivo apresentar um aumento durante o período de 72 horas. Considerando os resultados do crescimento celular da condição 2 não pode-se dizer que seria a melhor alternativa, pois ocorreu um decaimento celular entre os períodos das leituras e além disso, foi observado diminuição da qualidade celular. A qualidade celular no cultivo transcorridos 72 horas, na dose subótima de IL2 e PHA conjuntamente, é um parâmetro na avaliação da citotoxicidade do veneno, pois na ocorrência de citotoxicidade, se houver, ocorrerá pela presença de veneno e não pelas condições não ideais de crescimento da cultura. Portanto, a condição 6 foi utilizada na pesquisa por ter apresentado quantidade e qualidade celular elevada, requisitos necessários para a etapa de avaliação da citotoxicidade do veneno (Tabela 2).

A PHA é uma lectina mitogênica que apresenta atividade sobre os linfócitos, aumentando a síntese de DNA e potente atividade aglutinadora sobre os eritrócitos. Por isso, vem sendo utilizada na investigação científica para avaliação de diversos sistemas biológicos (Johnson & Roberts, 1964; Sell & Costa, 2000).

A IL-2 é a principal citocina necessária ao desenvolvimento de células T durante a resposta imune, pois é responsável pela expressão de marcadores de superfície celular para o processo de diferenciação celular. Devido a essa

atividade, dependendo da sua concentração no cultivo celular, pode ocorrer inibição do processo proliferativo (Souza, 2006).

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

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

4.2. Avaliação do ensaio de atividade não citotóxica do veneno da *Bothrops pauloensis* em CMN do sangue periférico

Foi utilizado o veneno liofilizado da espécie de serpente *Bothrops pauloensis* com diluição nas concentrações 5 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,05 µg/mL para avaliação da citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico. Os testes de cada concentração foram realizados em triplicata.

A avaliação da atividade citotóxica do veneno foi realizada pela visualização da placa após 24, 48 e 72 horas. A concentração 0,05 µg/mL não apresentou atividade citotóxica, pois após a leitura no período de 72 horas de cultivo celular na câmara de Neubauer foram visualizadas células viáveis. As concentrações 5 µg/mL e 0,5 µg/mL após 24 e 48 horas, respectivamente,

apresentaram atividade citotóxica tornando as células do cultivo celular totalmente inviáveis (Figura 07).

Os estudos com o veneno das *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*, utilizando a mesma metodologia e diferentes concentrações de veneno bruto, demonstraram que o veneno da *Bothrops jararacussu* apresenta citotoxicidade nas concentrações de 0,5 e 5 µg/mL o que não ocorre na concentração de 0,05 µg/mL e o veneno da *Bothrops moojeni* não apresentou citotoxicidade nas concentrações de 0,05 e 0,5 µg/mL (Rivero, 2010; Stival, 2011). Pode-se dizer que o veneno da *Bothrops moojeni* no cultivo celular apresenta menor atividade citotóxica para as CMN.

Na literatura existem estudos com resultados da atividade enzimática e biológica de venenos de serpentes pertencentes ao mesmo gênero e espécie que apresentam diferenças na sua capacidade de induzir alterações fisiológicas. No estudo de Ribeiro & Jorge (1990) comparou-se a atividade dos venenos de *B. jararaca* recém-nascidas e adultas após a picada. Sabe-se que os pacientes envenenados por serpentes de *B. jararaca* recém-nascidas não apresentam os mesmos sinais clínicos que pacientes envenenados por *B. jararaca* adultas. Os envenenamentos pelos espécimes adultos mostraram maior capacidade de apresentarem lesão no local da picada como bolhas e edema enquanto as serpentes recém-nascidas causaram mais frequentemente o prolongamento do tempo de coagulação sanguínea. Bustillo *et al.* (2009) analisou a atividade citotóxica induzida por venenos de cobras do gênero *Bothrops*. O veneno da *Bothrops diparus* demonstrou maior citotoxicidade do que o da *Bothrops alternatus*.

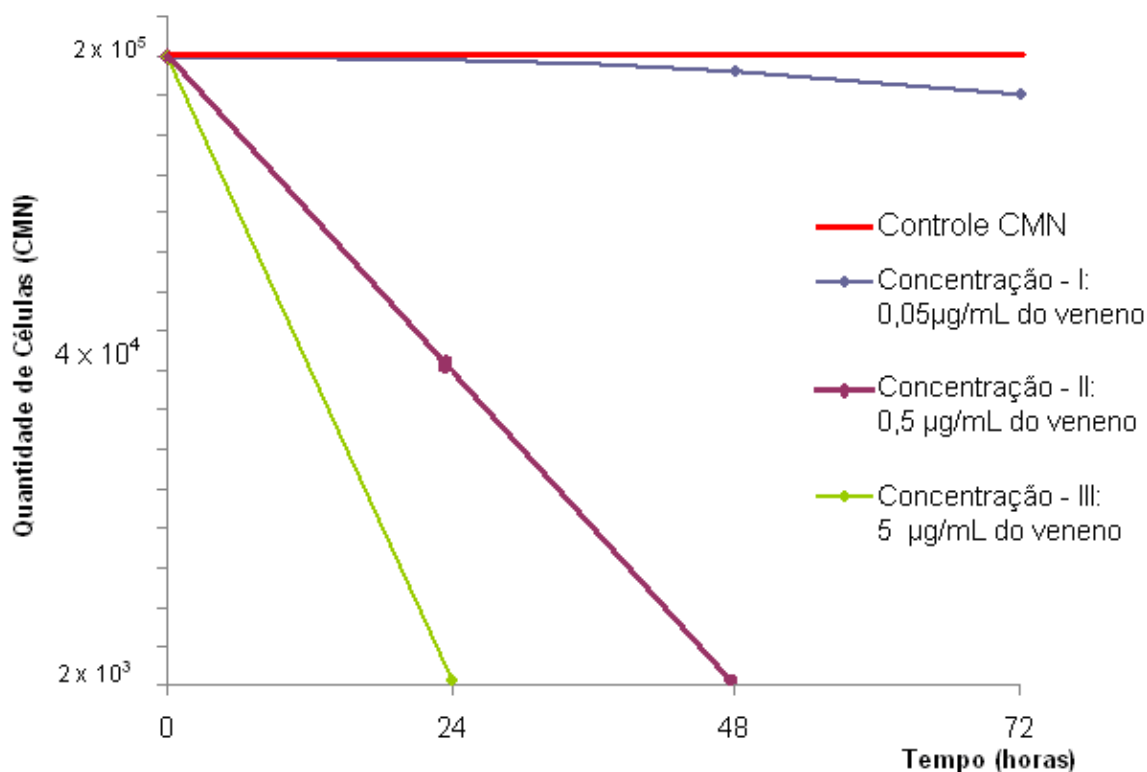


Figura 07. Atividade citotóxica de diferentes concentrações do veneno de *Bothrops pauloensis* em CMN nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas.

Como os venenos são substâncias citotóxicas, existe a necessidade de avaliação dessa ação, conforme realizado neste estudo, com a definição da concentração não citotóxica para posteriores testes de ação sobre células infectadas com vírus, bactérias e fungos.

Utilizou-se amostras sanguíneas de doadores saudáveis, coletadas no momento do experimento para não haver diminuição da recuperação celular. Os pesquisadores costumam utilizar antibióticos, gentamicina, penicilina ou streptomina, no cultivo celular para evitar o crescimento de contaminantes (bactérias e fungos). No entanto, nessa pesquisa conseguimos realizar o cultivo celular sem a presença de antibióticos e sem contaminação. É habitual a

utilização de antibióticos e antifúngicos nos cultivos. Entretanto, estes poderiam interferir na ação do veneno ofídico sinergizando ou inibindo o seu efeito.

Já foi descrito na literatura a existência de veneno bruto e frações de veneno de cobras com atividade antimicrobiana e antiviral, tornando-se assim de grande interesse para estudos em pesquisas. Por isso, podem ser considerados como agentes com grande potencial para fabricação de novos medicamentos para tratamento de algumas doenças (Stiles *et al.*, 1991; Buckland & Wilton, 2000).

A morte celular ocorrida durante o período de incubação nas concentrações citotóxicas não indica um mecanismo de morte celular específica, mas poderia ser explicada como ocorrência de um processo apoptótico. A apoptose é um processo de colapso celular caracterizado por alterações celulares funcionais devido a fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos (Anazeti & Melo, 2007). Ali *et al.* (2000) avaliaram a ação da LAO do veneno da *Eristocophis macmahoni* em cultivo celular. Estes autores demonstraram por meio da eletroforese em gel de agarose que ocorreu fragmentação do DNA, característica típica do padrão da apoptose celular. Esse fenômeno também foi encontrado no estudo de Suhr & Kim (1996) que identificaram a LAO como responsável pelo efeito apoptótico em cultura celular. Nesse trabalho utilizou-se a técnica de eletroforese em gel de agarose para avaliação da ocorrência de mecanismos de apoptose, utilizando-se das amostras de cultivo celular de CMN na presença das concentrações de 5 µg/mL e 50 µg/mL do veneno bruto da *Bothrops pauloensis* após incubação nos períodos de 06 e 24 horas. Verificou-se que não ocorreu morte celular devido ao processo de apoptose, conforme resultado demonstrado nas figuras 8 e 9 (Apêndice 3). No gel de agarose não

houve formação de arraste na região central que indicaria degradação de material genético indicativo de processo apoptótico.

5. Perspectivas futuras

Diferentes concentrações do veneno bruto da *Bothrops pauloensis* foram testadas para identificar a concentração não citotóxica em células mononucleares, tentando reproduzir o que ocorre *in vivo*, sendo que a concentração não citotóxica poderá ser utilizada em estudos futuros, como por exemplo, em células infectadas com HIV. Entretanto, deverá ser realizada também a avaliação do efeito das frações desse veneno, em diferentes concentrações e nas mesmas condições de cultivo celular. Portanto, os resultados deste estudo podem ser utilizados em outra fase da pesquisa na avaliação da atividade antiviral, antibacteriana e antifúngica do veneno bruto e frações da *Bothrops pauloensis*.

6. Conclusões

1. A avaliação da associação intra e inter-observadores das leituras de leucócitos totais apresentou uma correlação positiva altamente significativa.
2. A fitohemaglutinina e a interleucina-2, utilizadas simultaneamente no cultivo celular, na dosagem subótima, apresentaram ação sinérgica no estímulo da proliferação das células mononucleares do sangue periférico.
3. O veneno bruto da *Bothrops pauloensis* na concentração de 0,05 µg/mL não apresentou atividade citotóxica nas células mononucleares do sangue periférico, sugerindo a possibilidade de utilização em ensaio com CMN infectadas por microorganismos.

7. Referências Bibliográficas:

- Ali, A. S.; Stoeva, S.; Abbasi, A.; Alam, M. J.; Faigle, M.; Neumeister, B. & Voelter, W. (2000). Isolation, Structural, and Functional Characterization of an Apoptosis-Inducing L-Amino Acid Oxidase from Leaf-Nosed Viper (*Eristocophis macmahoni*) Snake Venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 384: 216-226
- Amaral, S. F. C.; Rezende, A. N.; Silva, A. O.; Ribeiro, F. M. M.; Magalhães, A. R.; Reis, J. R.; Carneiro, G. J. & Castro, S. R. J. (1986). Insuficiência Renal Aguda Secundária a Acidentes Ofídicos Botrópico e Crotálico. Análise de 63 casos. *Revista Instituto de Medicina Tropical* 4:220-227
- Anazeti, C. M. & Melo, S. P. (2007). Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocampo Pesquisa* 01:37-58.
- Antunes, C. T.; Yamashita, M. K.; Bárbaro, C. K., Saiki, M. & Santoro, L. M. (2010). Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon* 56: 1443-1458.
- Ayres, R. L. (2010) *Modulação de eventos da imunidade humoral e celular por venenos brutos e componentes dos venenos de Bothrops jararacussu e Bothrops pirajai*. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo; 97p.
- Baldo, C.; Tanjoni, I.; León, R. I.; Batista, C. F. I.; Della-Casa, S. M.; Clissa, B. P.; Weinlich, R.; Lopes-Ferreira, M.; Lebrun, I.; Amarante-Mendes, P. G.; Rodrigues M. V.; Perales, J.; Valente, H. R. & Moura-da-Silva, M. (2007). BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. *Toxicon*. 1:54-65.

- Bailey, P. & Wilce, J. (2001). Venom as a source of useful biologically active molecular. *Emergency Medicine*. 13: 28-36.
- Bastos, M. L.; Viera, U. C.; Júnior, O. J. R.; Homs-Brandeburgo, I. M.; Rodrigues, M. V.; Teixeira, S. N. D. & Hamaguchi, A. (2008). Neuwiedase estimula a produção in vitro de citocinas e quimiocinas inflamatórias por células mononucleares do sangue periférico humano. Universidade Federal de Uberlândia.
- Bastos, M. L. (2008) *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*. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia; 116p.
- Bastos, A. M. C. (2006) *Ação da peçonha de Crotalus durissus terrificus (SERPENTES: Viperidae) sobre a agregação plaquetária, parâmetros inflamatórios e proliferação celular*. Tese de mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 46p.
- Bell, W.R. Jr. (1997). De-dibrigenating enzymes . *Drugs*. 54:18-31.
- Bérnils, R. S. (org.). 2010. Brazilian reptiles – List of species. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br/>. *Sociedade Brasileira de Herpetologia*.
- Bjarnason, B. J. & Fox W. J. (1994). Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacology Therapy* 62:325-372.
- Borcow, G. & Ovadia, M. (1999). Selective Lysis of Virus-Infected Cells by Cobra Snake Cytotoxins: A Sendai Virus, Human Erythrocytes, and Cytotoxin Model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 264:63-68.

- Borges, C. R. & Araújo, A. F. B. (1998) Seleção de Habitat em Duas Espécies de Jararaca (*Bothrops moojeni* Hoge e *B. neuwiedi* Wagler) (Serpentes, *Viperidae*). *Revista Brasileira de Biologia*. 48:591-601.
- Buckland, A. G. & Wilton, D. C. (2000). The antibacterial properties of secreted phospholipases A2. *Biochimica et Biophysica Acta* 1488:71-82.
- Bustillo, S.; Lucero, H; Leiva, L. C.; Acosta, O.; Kier Joffé, E. B. & Gorodner, J. O. (2009). Citotoxicity and morphological analysis of cell death induced by *Bothrops* venomns from the northeast of Argentina. *Journal of Venom Animals Toxins*. 15: 28-42.
- Cambraia, S. R.; Rodrigues, M. V.; Malta-Neto, R. N.; Marcussi, S.; SANT'ANA, D. C.; Araújo, L. A.; Silveira, B. L.; Ferro, V. A. E.; Giglio, R. J.; Homs-Brandeburgo, I. M. & Soares, M. A. (2003) Atividade Bactericida e Neurotóxica de duas fosfolipases A2 miotóxicas isoladas do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. Publicações BioVenom acessada em <http://www.biovenom.net>.
- Cushman, D.W. & Ondetti, M.A. (1991). History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension Journal of the American Heart Association*. 17:589-592.
- Dennis, A. E. (1994). Diversity of Group Types, Regulation, and Function of Phospholipase A2. *The Journal of Biological Chemistry*. 18:13057-13060.
- Dennis, S. M.; Henzel, J. W.; Pitti, M. R.; Lipari, T. M.; Napier, A. M.; Deisher, A. T.; Bunting, S. & Lazarus, A. R. (1989). Platelet glycoprotein IIb-IIIa protein antagonists from snake venoms: Evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87:2471-2475

- Díaz, C.; Gutiérrez, M. J. & Lomonte, B. (1992). Isolation and Characterization of basic myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops godmani* (Godman's pit viper) snake venom. *Archives of Biochemistry Biophysics* 3:1202-1206.
- Evangelista, L. I.; Martins, C. M. A.; Nascimento, F. R. N.; Haut, A.; Evangelista, M. A. S. J.; Norões, S. B. T.; Toyama, H. M.; Diz-Filho, B. E.; Toyama, O. D.; Fonteles, C. M. & Monteiro, A. S. H. (2010). Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A₂. *Toxicon* 55: 1061-1070.
- Fox, W. J. & Serrano, T. M. S. (2005). Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45:969-985.
- França, F. G. R.; Mesquita, D. O. & Colli, G. R. (2006). A checklist of snakes from Amazonian savannas in Brazil, housed in the Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília, with new distribution records. University of Oklahoma, Norman Oklahoma. 17:1–13.
- Fry, G. B.; Vidal, N.; van der Weerd, L.; Kochva, E. & Renjifo, C. (2009). Evolution and diversification of the Toxicofera reptile venom system. *Journal of Proteomics*. 72: 127-136.
- FUNASA. (2001) Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Vigilância Epidemiológica, Ministério da Saúde.
- Funk, C.; Gmur, J.; Herold, R. & Straub, P. W. (1971). Reptilase – R a new reagent in blood coagulation. *British Journal of Haematology* 21:43-52.
- Gallacce, M. & Cavalcante, G. L. W. (2010). Understanding the *in vitro* neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A₂ homologues. *Toxicon* 55: 1-11.

- Gawade, P.S. (2007). Therapeutic alternatives from venoms and toxins. *Indian Journal of Pharmacology*. 39:260-264.
- Gibbons, J. W.; Scott, D. E., Avis, T. R.; Ryan, J.; Buhlmann, K. A.; Acey, T. R.; Tuberville, D.; Metts, B. S.; Greene, J. L.; Mills, T.; Leiden, Y.; Poppy, S. & Winne, C. T. (2000). The global decline of reptiles, déjà vu amphibians. *BioScience*. 8(50):653-666.
- Gutiérrez, J. M. & Lomonte, B. (1989). Local tissue damage induced by Bothrops snake venoms: a review. *Memórias do Instituto Butantan* 51: 211-223.
- Gutiérrez, J. M. & Rucavado, A. (2000). Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*. 82:841-850.
- Gutierrez, J.M. & Lomonte, B. (2003). Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en America Latina - *ANIMAIS PEÇONHENTOS NO BRASIL: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. 310-323.
- Harvey, A. L. & Robertson B. (2004). Dendrotoxins: structure-activity relationships and effects on potassium ion channels. *Current Medical Chemistry* 11: 3065-3072.
- Hoge, A. R & Romano-Hoge. (1979). Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Memorial Instituto Butantan*: 42/43:373-496.
- Junqueira, M. R. (2005). *Aplicação de técnicas proteômicas na caracterização do veneno da serpente Bothrops insularis (Viperidae)*. Tese de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro; 63 p.
- Johnson, R. F. & Roberts, B. K. (1964). The growth and division of human small lymphocytes in tissue culture: an electron microscopic study. *Journal of Anatomy London*. 98: 303-3011

- Kini, M. R. (2006). Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *Biochemical Journal* 397:377-387.
- Kini, M. R.. & Evans, J. H. (1989). A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon* 06:613-635.
- Kirschbaum, A.; Junker, R.; Koch, G. H., Vielhaber, H. & Nowak-Gottl, U. (1999). Anticoagulant response to *Agkistrodon contortrix* venom (ACV) in infants and children with genetic defects in the protein C anticoagulant pathway. *European Journal of Pediatrics* 158(15):203-204.
- Klein, J. D. & Walker, F. J. (1986). Purification of a protein C activator from the venom of the southern copperhead snake (*Agkistrodon contortrix contortrix*). *Biochemistry* 25(15):4175-4179.
- Koh, D. C. I. & Armugam, A, J. (2006). Snake Venom components and their applications in biomedicine. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63:3030-3041.
- Martins, M. & Barros, M. F. (2008). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção Volume II. Ministério do Meio Ambiente – MMA. *Biodiversidade*. Brasília, DF – pp. 327-373.
- Marsh, A. N. (2001). Diagnostic Uses of Snake Venom. *Haemostasis* 31: 211-217
- Masuda, S.; Murakami, M.; Ishikawa, Y.; Ishii, T. & Kudo, I.. (2005). Diverse cellular localizations of secretory phospholipase A₂ enzymes in several human tissues. *Biochimica et Biophysica Acta* 1736:200-210
- Meenakshisundaram, R.; Sweni, S. & Thirumalaikolundusubramanian, P. (2009). Hypothesis of snake and insect venoms against Human Immunodeficiency Virus: a review. *Aids Research and Therapy* 6:25-29.

- Nogueira, C.; Sawaya, R. J. & Martins, M. (2003). Ecology of the Pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. *Journal of Herpetology* 37:653-659.
- Páramo, L.; Lomonte, B.; Pizarro-Cerdá, J.; Bengoechea, J-A.; Gorvel, J-P. & Moreno, E. (1998). Bactericidal activity of Lys49 and Asp 49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom. *European Journal of Biochemistry* 253:452-461.
- Petricevich, L. V. & Mendonça, Z. R..(2003). Inhibitory potential of *Crotalus durissus terrificus* venom on measles virus growth. *Toxicon* 42:143-153.
- Pinho, O. M. F. & Pereira, I. D. (2001). Ofidismo. *Revista da Associação Médica Brasileira* 47:24-29.
- Pough, F.H. & Groves J.D. (1983). Specialization of the body form and food habits of snake. *American Zoologist*. 23:443-454.
- Rao, V.S. & Kini, M. R. (2002). Pseutarin C, a prothrombin activator from *Pseudonaja textiles* venom: Its structural and functional similarity to mammalian coagulation factor Xa-Va complex. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 88:611-619
- Resende, C. C.; Araújo, F. A. A. & Sallenave, R. N. U. R. (1989). Análise epidemiológica dos acidentes ofídicos. *Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. Brasília.*
- Ribeiro, A. L. & Jorge, T. M. (1990). Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpentes adultas e filhotes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 32:436-442.
- Ribeiro, A. L. & Jorge, T. M. (1997). Acidente por Serpentes do Gênero *Bothrops*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 30:475-480

- Rivero, R. V. J. (2010) Avaliação da atividade não citotóxica do veneno da cobra *Bothrops jararacuçu* em células mononucleares do sangue periférico humano. Tese de Mestrado Pontifícia Universidade Católica de Goiás.
- Robert, A.; Eschwege, V.; Hameg, H.; Drouet, I. & Aillaud, M. F. (1996). Anticoagulant response to *Agkistrodon contortrix* venom (ACV test): A new global test to screen for defects in the anticoagulant protein C pathway. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 75: 562-566.
- Rodrigues, S. R.; Silva, F. J.; França, B. J.; Fonseca, P. P. F.; Otaviano, R. A.; Silva, H. F.; Hamaguchi, A.; Magro, J. A.; Braz, K. S. A.; Santos, I. J.; Homsibrandeburgo, I. M.; Fonte, M. R. M.; Fuly, L. A.; Soares, M. A. & Rodrigues, M. V. (2008). Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Biochemie* 91:490-501
- Rodrigues, M. V.; Marcussi, S.; Cambraia, S. R.; Araújo, L. A.; Malta-Neto, R. N.; Hamaguchi, A.; Ferro, V. A. E.; Homsibrandeburgo, I. M.; Giglio, R. J. & Soares, M. A. (2004). Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A_2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. *Toxicon* 44:305-314.
- Rodrigues, M. V.; Soares, M. A.; Andrião-Escarso, H. S.; Franceschi, M. A.; Rucavado, A.; Gutiérrez, M. J. & Giglio, R. J. (2001). Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Biochemie* 83:471-479.
- Rodrigues, M. V.; Soares, M. A.; Guerra-Sá, R.; Rodrigues, V.; Fontes, R. M. & Giglio, R. J. (2000). Structural and functional characterization of Neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops*

neuwiedi snake venom. *Archives of Biochemistry and Biophysic.* 381:213-224.

Rojnuckarin, Ponlapat. (2008). Snake Venom and Haemostasis – An Overview. *Thrombosis and Haemostasis*.1: 93-96

Rosing, J.; Govers-Riemslog, P. W. J.; Yukelson, L. & Tans, G. (2001). Fator V Activation and Inactivation by Venom Proteases. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 31:241-246.

Samoto, Y. V.; Branco, R. E.; Ferreira, C. B. J. G.; Cabral, M. R.; Gregore, B. G.; Sousa, S. L. A.; Dohman, R. F. H.; Silva, A. S.; Takiya, M. C.; Rossi, D. I. M.; Borojevic, R. & Miglino, A. M. (2009) Distribuição de células mononucleares de medula óssea em tecido cardíaco sadio por diferentes vias de infusão. *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva.* 17(2): 220-226.

Sant'ana, D. C.; Menaldo, L. D.; Costa, R. T.; Godoy, H.; Muller, M. D. V.; Aquino, H. V.; Albuquerque, S.; Sampaio, V. S.; Monteiro, C. M.; Stábeli, G. R. & Soares, M. A. (2008). Antiviral and antiparasite properties of an L-amino acid oxidase from the Snake *Bothrops jararaca*: Cloning and identification of a complete cDNA sequence. *Biochemical Pharmacology* 76:279-288.

Sell, M. A. & Costa, P. C. (2000). Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. *Acta Scientiarum* 22:297:303.

Serrano, S. M. & Maroun, R. C. (2005). Snake venom serine proteinase: sequence homology vs substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*:(45):1115-1132.

Simões, R.; Cury, Y.; Ara, C. S. L. A.; Bonarnim, V. L. & Bernardi, M. M. (2008). Efeitos embriotóxicos do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*. *Revista do Instituto de Ciências da Saúde.* 26(3): 315-319.

- Six, D. A. & Dennis, E. A. (2000). Expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1488:1-19.
- Soto, P. A. L. (2005). *Estudos Estrutura-Função de neurotoxinas isoladas de veneno crotálico e botrópico Análise comparativa da neurotoxicidade e miotoxicidade*. Tese de Doutorado Universidade Estadual de Campinas. São Paulo 131p
- Souza, J. O. L. (2006). *IL-2 e a Sobrevida de Neurônios Centrais*. Dissertação de Mestrado Universidade Federal Fluminense. Niterói 48p
- Stábeli, G. R.; Amui, F. S.; San'tana, D. C.; Pires, G. M.; Nomizo, A.; Monteiro, C. M.; Romão, T. R. P.; Guerra-Sá, R.; Vieira, A. C.; Giglio, R. J.; Fonte, M. R. M. & Soares, M. A. (2006). *Bothrops Moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: An example of functional versatility of snake venom proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology* 142: 371-381
- Stiles, B. G.; Sexton, F. W. & Weinstein, S. A. (1991). Effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian King Brown or Mulgen snake) venom. *Toxicon* 29:1129-1141.
- Stival, S. A. (2011). Avaliação da atividade não citotóxica do veneno bruto da *Bothrops moojeni* em células mononucleares do sangue periférico humano. Tese de Mestrado Pontifícia Universidade Católica de Goiás 62p
- Suhr, S-M. & Kim, D-S. (1996). Identification of the Snake Venom Substance that Induces Apoptosis. *Biochemical and Biophysica Research Communications*. 224:134-139

- Tans, G. & Rosing, J. (2001). Snake Venom Activator of Factor X: An Overview. *Haemostasis* 31:225-233
- Talan, D. A.; Citron, D. M.; Overturf, G. D.; Singer, B.; Froman, P. & Goldstein, E. J. (1991). Antibacterial activity of crotalid venoms against oral snake flora and other clinical bacteria. *Journal of Infectious Diseases* 164: 195-198.
- Torres, C. F. A.; Datans, T. R.; Toyama, H. M.; Diz-Filho, E.; Zara, J. F.; Queiroz, R. G. M.; Nogueira, P. A. N.; Oliveira, R. M.; Toyama, O. D.; Monteiro, A. S. H. & M. C. M. A. (2010). Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. *Toxicon* 55: 795-804.
- Tsetlin, V. I. & Hucho, F. (2004). Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *FEBS Letters*. 557:9-13.
- Valle, L. A. & Brites, C. L. V. (2008). Nomes populares e aspectos ecológicos de *Bothrops pauloensis* (Amaral 1925) em áreas antropizadas do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Zootecias*. 10:155-161
- Warrell, D. A. (2010) Snake Bite. *Lancet*. 375: 77-88.
- Zhang, YJ.; Wang, JH.; Lee, WH.; Wang, Q. & Zheng, YT. (2003). Molecular characterization of *Trimerisurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 309:598-604.
- Zug, G. R.; Vitt, L. J. & Caldwell, J. P.(2000). Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles, Second Edition (Hardcover). *Academic Press, USA*.

APÊNDICES

Apêndice 1



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

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 Cecilia Araripe Sucupira; Ricardo Sobhie Diaz (orientador)

Disciplina/Departamento: Infectologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: CAPES.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

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

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

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

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

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

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

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

TCLE: Apresentado adequadamente. Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162



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 ____/____/____

Apêndice 3

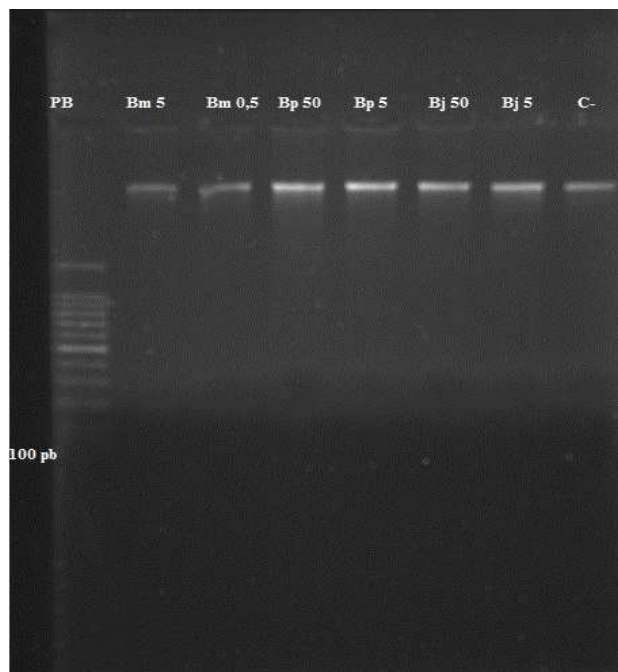


Figura 8. Gel de eletroforese da extração do DNA do cultivo celular de CMN após o tratamento com o veneno da *Bothrops pauloensis* nas concentrações 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Bp50 e Bp5) por 06 horas.

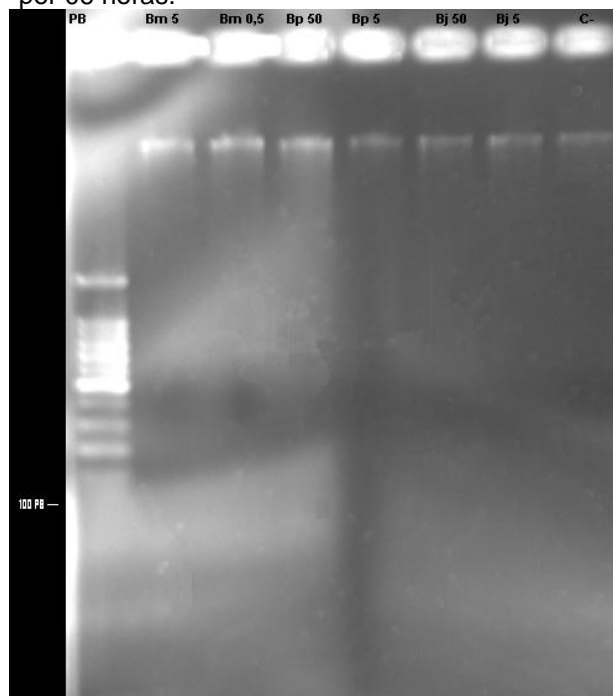


Figura 9. Gel de eletroforese da extração do DNA do cultivo celular de CMN após o tratamento com o veneno da *Bothrops pauloensis* nas concentrações 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Bp50 e Bp5) por 24 horas.