



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA CROTOXINA SÍMILE DO
VENENO DE *Crotalus vegrandis* COM ATIVIDADE ANTITUMORAL.**

Paula Juliana Nishimura

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na
Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações

Orientador:

Prof. Dr. Patrick Jack Spencer

São Paulo
2016

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA CROTOXINA SÍMILE DO
VENENO DE *Crotalus vegrandis* COM ATIVIDADE ANTITUMORAL.**

Paula Juliana Nishimura

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na
Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações

Orientador:
Prof. Dr. Patrick Jack Spencer

Versão Corrigida

Versão original disponível no IPEN

São Paulo
2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem ele nada do que fiz até hoje seria possível. Deus me deu direção e fortalecimento ao longo de mais essa jornada que foi o mestrado. Sem Deus não teria forças para superar cada uma das adversidades que surgiram. Graças a sua misericórdia e seu amor inesgotável e incondicional, o que antes parecia um sonho inalcançável, ele tornou em uma conquista inigualável.

A minha mãe, Julivia Borges Godinho, um exemplo de mulher. Desde os tempos da infância estive ao meu lado ensinando e me auxiliando nas primeiras letras, nos primeiros recortes me mostrando o valor e o encanto do conhecimento e do saber mesmo sem ter tido a oportunidade de desfrutá-los. Seu zelo, carinho, amor e sabedoria sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos e circunstâncias. Por me ensinar a buscar e valorizar as coisas mais valiosas que tenho a fé e o conhecimento.

Ao meu grande amor Roni por todo apoio, suporte, conversas, companheirismo e por me completar.

A toda minha família primos, primas, tios e tias, por sempre estarem ao meu lado, por terem me proporcionado momentos incríveis e uma convivência maravilhosa.

A todos meus amigos da Ponte, pelo carinho, amor, compreensão e pelas meditações direcionadas a minha vida que foram fundamentais para que eu pudesse chegar aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Patrick Jack Spencer, por ter aberto as portas da pós-graduação, por ter aceitado enfrentar essa jornada do mestrado e ter caminhado junto comigo para que pudéssemos chegar até o fim. Pela ajuda na elaboração e desenvolvimento de todo esse projeto, pela orientação e auxílio em todos os momentos. Por trazer seu espírito de pai para o laboratório e tornar todos esses anos um período de excelente convivência e grande aprendizagem;

Obrigada, por todas as discussões, comentários e idéias sempre enriquecedoras.

E me receber com muito respeito e carinho, pela confiança em mim depositada, pelo profissionalismo e pelo amor em ensinar;

À docente Dra. Nanci Nascimento, por toda a sua ajuda e empenho, por seus comentários, idéias e sugestões sempre construtivas, por sua prontidão em me receber e conversar sempre com um sorriso e uma alegria contagiantes. Por toda ajuda empenhada, pelo apoio, compreensão, carinho e pelo seu imenso profissionalismo e competência;

À Dra. Valquiria e Dra. Ana Leonor e aos alunos do laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, Lucas (um grande amigo e irmão, sempre presente em todos os momentos da minha vida, meu companheiro de aventuras na pós-graduação, sem sua ajuda e carinho não teria vivido tantos momentos bons), Adriana Nascimento (Dri Morena) foi uma pessoa fundamental para que eu chegasse onde estou hoje, abriu as portas para que realizasse minha Iniciação Científica no Instituto Butantan, Adriana Mezini (Dri loira), Renan grande amigo, Andria, Adnan, Ana Leticia (Lê), Jessica, Mariana (Mari), Luciana (Luh), Marlos, Eduardo, Tati, Vanessa (Van) uma pessoa muito especial e que se não fosse ela este trabalho estaria incompleto, meu anjo da guarda, Dr. Daniel Pimenta, Dra. Ruth pessoa muito importante para meu aprendizado com o manuseio com cultura de células. Muito obrigada a todos pelo apoio, pela ajuda, pela divisão de conhecimento e pela excepcional oportunidade de ter conhecido todos vocês.

A todos os meus professores de graduação, mas em especial a professora Dra. Sandra Penteado, ao professor Dr. Carlos Francischini, ao professor Dr. Victor Proença, professora Dra. Marília Patrão, professor Fabio Moreira e professor Franco Bonetti ao longo da caminhada da graduação vocês me despertaram o interesse e o

amor pela pesquisa, pela ciência, além de serem grandes exemplos de profissionais e acadêmicos me incentivaram e foram fundamentais para que chegasse a esse momento.

Aos colegas da minha turma de pós-graduação, meus companheiros nessa aventura do mestrado Fernando, Luciana, Ellen (grande amiga e companheira), Bruno, Ed Carlos e Mariana El Corab (Mari). Aos professores Rogero, Nanci, Daniel Perez, Renato Semmler.

Foi uma honra e um privilégio conhecer e conviver com todos vocês, muito obrigada a todos pelo apoio, carinho, pelos debates científicos e pelas conversas nos momentos mais oportunos, foram momentos incríveis de convivência;

A toda equipe de apoios técnico do Laboratório do Centro de Biotecnologia (CB), Rute, Arlete, Jonny, Miriam, Zé Maria, Neide (Neidinha), Dra. Olga, Dra. Ligia. Por terem sempre empenhado o melhor de vocês em cuidar dos e manter toda a estrutura do laboratório em ordem para que pudesse realizar os experimentos, pelo apoio técnico durante os experimentos, sem o empenho de vocês esse trabalho não teria sido realizado;

Muito obrigada pela forma com que me receberam e o carinho e respeito.

As secretárias da pós-graduação, Ana Caudia, Bruna, presentes ao longo desses dois anos do mestrado, sempre prontas para ajudar, esclarecer dúvidas e resolver os problemas e as burocracias, a vocês meu muito obrigada;

Aos Amigos (Equipe) Tamara (Tamarinda) minha grande amiga, parceira, professora obrigada por sempre estar ao meu lado em todos os experimentos realizados, Ed Carlos amigo de anos, Samuel grande amigo e companheiro de laboratório, Mariana, Marcela, Fernanda, Bruno, Rodrigo, Podé, Gabi, Mila, Ellen, Marina, Dani, Vincent obrigada por me passar todo conhecimento sobre venenos, Fernando, Larissa, Eliane, Nadja, Karina, Alisson e Patricia, despertei um carinho muito grande por vocês, obrigada por nossas conversas, risadas, companheirismo, amizade, apoio.

Ao meu amigo de infância Tiago Pastore (Ti) obrigada por momentos de desabafo, risadas, companheirismo.

À minha grande amiga Jéssica Santos, pessoa muito especial que me apoiou nessa fase da pós graduação, obrigada pela ajuda, risadas, companheirismo, nos exercícios físicos no Cepeusp, em seus conselhos e na grande ajuda em meu trabalho.

A todos os funcionários do IPEN, pela organização e manutenção do centro.
Ao IPEN pelo fornecimento da infra-estrutura necessária para o desenvolvimento desse trabalho.

A CAPES pelo financiamento do projeto.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Muito Obrigada!!!

“Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser uma pessoa de sucesso.
O sucesso é consequência.”

Albert Einstein

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei
para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas
Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Marthin Luther King

“O sucesso é a capacidade de ir de fracasso em fracasso sem perder o
entusiasmo.”

Winston Churchill

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA CROTOXINA SÍMILE DO VENENO DE *Crotalus vegrandis* COM ATIVIDADE ANTITUMORAL.

Paula Juliana Nishimura

RESUMO

Diversos estudos de serpentes têm mostrado que algumas substâncias componentes de seus venenos possuem eficiência na atividade antitumoral nos ensaios realizados em laboratório em células *in vitro* e *in vivo*. O veneno da cascavel *Crotalus vegrandis* possuem atividades neurotóxica, miotóxica e hemorrágica. A crotoxina símile é um importante componente desse veneno sendo formada por uma proteína que possui uma unidade ácida (Crotapotina) ligada a uma subunidade básica (PLA₂). Devido ao fato de existirem poucos estudos relativos ao veneno de *Crotalus vegrandis*, torna-se necessário o isolamento e a caracterização de suas biomoléculas e uma maior investigação do seu potencial e sua eficácia como agente terapêutico contra células tumorais. No presente trabalho, foi realizado o isolamento e a caracterização da crotoxina símile de *Crotalus vegrandis*, bem como seu efeito citotóxico em células L929 e B16F10. Realizou-se o cultivo dessas células em placas com 96 poços, para, então, serem colocadas em contato direto com diferentes frações do veneno purificado de *Crotalus vegrandis* por um tempo total de 48 horas. Para efeitos de comparação realizou-se o mesmo ensaio com frações do veneno purificado da cascavel brasileira *Crotalus durissus terrificus*. Para a avaliação da viabilidade celular o tratamento com as frações do veneno purificado de *Crotalus vegrandis* e *Crotalus durissus terrificus*, realizou-se os ensaios com MTT. Os resultados mostraram uma atividade de grande toxicidade para ambos os venenos em células tumorais B16F10 e pouca toxicidade para as células normais L929. Ainda nos ensaios comparativos com os dois venenos, verificou-se que, para uma dada concentração, as frações do veneno de *Crotalus vegrandis* possuem uma maior eficiência que qualquer concentração do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, havendo uma maior especificidade para as células B16F10. A crotoxina símile isolada do veneno de *Crotalus vegrandis* apresentou atividade citotóxica mais preponderante na linhagem celular tumoral B16F10, após 48 horas concentrações de 250 e 125 ug/mL.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CROTOXIN LIKE *Crotalus vegrandis* WITH ANTITUMOR ACTIVITY.

Paula Juliana Nishimura

ABSTRACT

Several studies have shown that some snake venom components have efficient antitumor activity *in vitro* and *in vivo*. The venom of the rattlesnake *Crotalus vegrandis* has neurotoxic, myotoxic and hemorrhagic activities. The crotoxin-like is an important component of this venom and is formed by an acidic protein (crotopotin) combined to a basic subunit (PLA₂). As there are few studies on *Crotalus vegrandis* venom, the isolation and characterization of its components and an investigation of their potential and efficacy as a therapeutic agent against tumor cells would be of great value. In this study, we carried out the isolation and characterization of the crotoxin-like of *Crotalus vegrandis* and assayed its cytotoxicity on L929 and B16F10 cells. We carried out the cultivation of these cells in 96 well plates, to then be placed in direct contact with the different purified fractions *Crotalus vegrandis* venom for a total time of 48 hours. For comparison, we carried out the same test with the purified fractions of *Crotalus durissus terrificus* venom. The MTT assay was used to assess the cell viability after treatment with fractions of *Crotalus vegrandis* and *Crotalus durissus terrificus* venoms. The results showed a high cytotoxic activity for both venoms in B16F10 tumor cells and little toxicity to normal L929 cells. Also in comparative tests with both venoms, we observed that for a given concentration, the fractions of the venom of *Crotalus vegrandis* had higher cytotoxic effect than the *Crotalus durissus terrificus* venom, with greater specificity for B16F10 cells.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Câncer	16
1.2 Ciclo Celular	18
1.3 Morte celular	19
1.4 Necrose	19
1.5 Apoptose	20
1.6 Câncer de Pele	21
1.7 Células B16F10	22
1.8 Venenos de serpentes.....	23
1.9 Veneno de Serpentes e Câncer	24
1.10 Veneno da <i>Crotalus durissus terrificus</i>	24
1.11 Veneno da <i>Crotalus Vegrandis</i>	25
1.12 Crotoxina.....	26
1.13 Efeitos da crotoxina em células.....	27
2. OBJETIVO GERAL	29
2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	29
3. MATERIAIS E METÓDOS	30
3.1 Identificação de proteína crotoxina símile- Dot Blot.....	30
3.2 Fracionamento do veneno	30
3.2.1 Exclusão Molecular.....	31
3.2.2 Cromatografia Troca Aniônica.....	31
3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	31
3.4 Dosagem de proteínas por Bradford	32
3.5 Dosagem de proteínas por Nanodrop	32
3.6 Cultura celular	33
3.6.1 Linhagens L929 e B16F10.....	33
3.6.2 Congelamento.....	33
3.6.3 Descongelamento.....	34
3.6.4 Plaqueamento.....	34
3.6.5 Tripsinização e repique.....	34

3.7 Citotoxicidade e atividade proliferativa.....	35
3.8 Avaliação de viabilidade celular.....	35
3.9 Western Blot	36
3.10 Análise Estatística	37
4. RESULTADOS	38
4.1 Dot Blot.....	38
4.2 Fracionamento do veneno de <i>Crotalus vegrandis</i>	41
4.2.1 Gel filtração	41
4.3 SDS PAGE	42
4.4 Western Blot	44
4.5 Troca aniônica	45
4.6 SDS PAGE	46
4.7 Fracionamento do veneno de <i>Crotalus vegrandis</i>	47
4.7.1 Gel Filtração.....	47
4.8 SDS PAGE.....	48
4.9 Fracionamento do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	49
4.9.1 Gel filtração.....	49
4.10 Quantificação protéica.....	50
4.11 Ensaio de citotoxicidade.....	51
4.11.1 Veneno de <i>Crotalus vegrandis</i>	51
4.11.2 Veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	52
4.11.3 Avaliação de viabilidade celular.....	53
4.11.4 Ensaios de viabilidade celular com veneno bruto de <i>Crotalus vegrandis</i> ...	54
4.12 Cromatografia.....	56
4.12.1 Etapa para o ensaio de fracionamento do veneno total de <i>Crotalus vegrandis</i>	56
4.13 Cromatografia de troca aniônica e gel SDS PAGE 15%.....	57
4.13.1 Fracionamento do Pico I obtido da exclusão molecular.....	57
4.14 SDS PAGE 15%.....	58
4.14.1 Análise de pureza e tamanho molecular.....	58
4.15 Ensaio de viabilidade celular da fração coletada na coluna Mono-Q.....	59
4.15.1 Análise de viabilidade celular da crotoxina símile do veneno de <i>Crotalus vegrandis</i>	59
4.15.2 Avaliação da viabilidade celular.....	60

4.15.2.1 Sensibilidade das células B16F10 e L929 frente à crotoxina símile do veneno de <i>Crotalus vegrandis</i>	60
5.DISSCUSSÃO	61
6.CONCLUSÃO	67
7.BIBLIOGRAFIA	68

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Dot Blot utilizando anticorpos policlonais contra a crotoxina sendo: A- controle negativo (PBS), B- controle positivo (*Crotalus durissus terrificus*), C- *Crotalus vegrandis*, D- crotoxina (*Crotalus durissus terrificus*), realizado em triplicata 1,2 e 3..... 38
- Figura 2** - Dot Blot utilizando anticorpos policlonais contra a porção acida, sendo: A- controle negativo (PBS), B- controle positivo (*Crotalus durissus terrificus*), C- *Crotalus vegrandis*, D- crotoxina (*Crotalus durissus terrificus*), realizado em triplicata 1,2 e 3..... 39
- Figura 3** - Dot Blot utilizando anticorpos policlonais contra a porção básica, sendo: A- controle negativo (PBS), B- controle positivo (*Crotalus durissus terrificus*), C- *Crotalus vegrandis*, D- crotoxina (*Crotalus durissus terrificus*), realizado em triplicata 1,2 e 3..... 40
- Figura 4** – Primeiro passo para o isolamento da crotoxina símile: Perfil cromatográfico do veneno total de *Crotalus vegrandis* (20 mg/mL) em coluna Superdex 75 10/300 GL, previamente equilibrada com Formiato de amônio 100 mM em pH 3,0. A absorbância foi determinada em 280 nm em fluxo de 0,8 mL/min. Foram obtidos os seguintes picos: I, II, III, IV(Crotoxina símile), V, VI e VII..... 41
- Figura 5** - SDS-PAGE 15% com picos fracionados na gel filtração. Foram aplicados 10 µL/poço de amostra em concentração de 0,3 mg/mL. P= Padrão de massa molecular em KDa e VT= Veneno total..... 42
- Figura 6**- SDS-PAGE 15% com picos fracionados na gel filtração. Foram aplicados 10 µL/poço de amostra em concentração de 0,3 mg/mL. P= Padrão de massa molecular em KDa e VT= Veneno total..... 43

Figura 7 - Western Blot dos picos da Gel filtração incubados com anticorpo policlonal anti-crotoxina. Foi aplicado 10 uL/poço de amostra. Como controle positivo foi utilizado veneno de *Crotalus durissus terrificus*..... 44

Figura 8 - Segunda etapa troca aniônica: Perfil cromatográfico do pico IV(referente a crotoxina símile) obtido na Gel filtração em coluna Mono Q previamente equilibrada com Tris/HCl 50mM em pH 8,2. A absorbância foi determinada em 280 nm em fluxo de 0,8 mL/min. Foram Obtidos os seguintes picos: IV-I, IV-II, IV-III(Crotoxina), IV-IV e IV-V. 45

Figura 9 - Gel SDS PAGE 15% das frações coletadas na troca aniônica. Foram aplicados 10 µl/poço. P= Padrão de massa molecular em KDa. Utilizou-se veneno total de *Crotalus vegrandis* = VT. E os picos correspondentes da troca aniônica de IV-I a IV-V. Evidenciando a fosfolipase A2 no pico IV-III, confirmando na troca aniônica o pico majoritário..... 46

Figura 10 - Perfil cromatográfico do veneno total de *Crotalus vegrandis* (15 mg/mL) em coluna Superdex 75 10/300 GL, previamente equilibrada com PBS pH 7,5 47

Figura 11 - Gel SDS PAGE 15% com os picos fracionados em coluna de Gel Filtração. Foi aplicado 25 µL/poço de amostra. 48

Figura 12 - Perfil cromatográfico do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* (15 mg/mL) em coluna Superdex 75 10/300 GL, previamente equilibrada com PBS pH 7,5..... 49

Figura 13 - Ensaio citotóxico com veneno de *Crotalus vegrandis* em células L929 e B16F10 expostas por 48 horas aos picos coletados após cromatografia em coluna Superdex 75 10/300 GL. 500 ug/mL de toxina com 1×10^4 células por poço. Como controle positivo foi utilizado veneno de *Bothrops jararaca* na concentração de 100 µg/100 µL. 51

Figura 14 - Ensaio citotóxico com veveno de *Crotalus durissus terrificus* em células L929 e B16F10 expostas por 48 horas aos picos coletados após cromatografia em

coluna Superdex 75 10/300 GL. 500 ug/mL de toxina com 1×10^4 células por poço. Como controle positivo foi utilizado veneno de *Bothrops jararaca* na concentração de 100 µg/100 µL. 52

Figura 15- Gráfico de viabilidade celular(%) pelo logaritmo da concentração (µg/mL) em células L929 e B16F10 relativo ao pico II dos venenos de *Crotalus vegrandis* e *Crotalus durissus terrificus* 53

Figura 16- Gráfico de viabilidade celular(%) pelo logaritmo da concentração (µg/mL) em células L929 e B16F10 relativo ao pico III dos venenos de *Crotalus vegrandis* e *Crotalus durissus terrificus*..... 53

Figura 17- Viabilidade das células L929 após incubação com veneno de *Crotalus vegrandis*, ensaio com MTS após 24 horas. A maior citotoxicidade foi evidenciada na concentração de veneno de 6,3 µg/poço. (OriginPro 7.0)..... 54

Figura 18- Micrografias de fibroblastos L929 e após o tratamento com veneno de *Crotalus vegrandis* (aumento de 200X) por 24 horas. A- controle negativo B- 200 µg/poço, C- 12,5 µg/poço e D-1,6 µg/poço..... 55

Figura 19- Isolamento da crotoxina símile: Perfil cromatográfico do veneno total de *Crotalus vegrandis* (20 mg/mL) em coluna Superdex 75 10/300 GL, previamente equilibrada Tris/HCl 50mM em pH 8,2. A absorbância foi determinada em 280 nm em fluxo de 0,8 mL/min. Foram obtidos os seguintes picos: I, II e III..... 56

Figura 20- Fracionamento do pico II do veneno de *Crotalus vegrandis* em coluna Mono-Q. Previamente equilibrada Tris/HCl 50mM em pH 8,2. A absorbância foi determinada em 280 nm em fluxo de 0,8 mL/min. Os picos obtidos foram I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX..... 57

Figura 21- Gel SDS PAGE 15% do pico II coletado na troca anônica. Foram aplicados 20 µL/poço de amostra. Seguindo a sequência P=Padrão, Veneno *Crotalus vegrandis* e o Pico II..... 58

Figura 22- Atividade citotóxica da crotoxina símile purificada a partir do veneno de *Crotalus vegrandis* para as linhagens B16F10 (melanoma murino) e L929 (fibroblasto murino). Expostas por 48 horas..... 59

Figura 23- Curva de inibição de crescimento celular causado pela crotoxina símile purificada do veneno de *Crotalus vegrandis* e as doses mínimas efetivas que matam 50% das células (IC50) para B16F10 e L929..... 60

Lista de tabelas

Tabela 1 Concentrações de proteínas fracionadas com o veneno de *Crotalus*
vegrandis.....50

Tabela 2 Concentrações de proteínas fracionadas com o veneno de *Crotalus*
durissus terrificus.....50

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é uma doença que acomete milhares de pessoas em todo o mundo (Thompson *et al.*, 2008). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer 2013, fatores ambientais, o tabagismo, a obesidade, a alimentação, o sedentarismo, assim como o aumento da expectativa de vida são fatores que contribuem para o crescimento do número de casos de câncer. Segundo o Instituto Nacional de Câncer, pelo menos um terço de novos casos ocorre anualmente no mundo, e poderiam ser prevenidos. No Brasil o câncer é uma importante causa de doença e morte, apresentando um perfil epidemiológico. Desde 2003 constituem-se na segunda causa de morte da população, sendo um dos mais complexos problemas de saúde pública que o sistema de saúde brasileiro enfrenta, dada a sua magnitude epidemiológica, social e econômica. Estima-se um aumento de aproximadamente 50% de novos casos da doença até 2020 (INCA, 2013).

No processo da doença é necessário um agente iniciador que se associa a fatores endógenos e exógenos como agentes químicos, físicos, genéticos e ambientais.

Quando células com um distúrbio genético se reproduzem mais rapidamente do que células normais, isto é, um crescimento anormal de tecidos, o chamamos de tumor, neoplasma ou blastoma, e se este crescimento é acelerado e desorganizado com a produção de metástases, então é denominado como um tumor maligno (Adam *et al.*, 2003., Sarasin, 2003). Certos agentes biológicos, químicos e físicos possuem a capacidade de agressão ao genoma a tal ponto de levar ao desenvolvimento neoplásico.

Certos fatores reguladores da homeostase controlam o processo de divisão celular, porém em algumas circunstâncias este controle pode falhar ocasionando um processo de divisão autônoma dessas células (Abbas *et al.*, 2005).

No início do desenvolvimento da massa tumoral a sua nutrição é feita por meio de difusão a partir dos tecidos vizinhos. Em seguida para não se degenerarem ou entrarem em necrose eles passam a depender de seus próprios vasos sanguíneos (Brasileiro Filho, 2000).

A capacidade de escape do sistema imune e também dos controles de crescimento celular são uma característica das células neoplásicas, que em sua divisão transmitem esta mesma capacidade às células. Há freqüentemente um aumento desta característica conforme o aumento das gerações e das mutações (Abbas *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de uma neoplasia é o processo o qual chamamos de oncogênese, isto ocorre quando há uma interferência nos mecanismos de crescimento celulares normais devido a alterações genéticas, que podem ser herdadas ou adquiridas, possuindo um processo de múltiplos estágios, tanto genótipo quanto fenótipo gerando alterações que se acumulam de geração em geração (Altieri, 2001, Bunz, 2001, Adam *et al.*, 2003).

Os processos de desenvolvimento de uma neoplasia são as deleções ou adições de pares de bases, translocações cromossômicas, formação de heterodímeros, oxidação gerada por radicais livres, ativação de proto-oncogenes, quebra de fita dupla, entre outros. Podendo ocorrer também perda de atividade biológica, ativação de receptores tornando-se uma célula anormal (De Vita, 2005).

As mutações estão ligadas com os processos proto-oncogenes do crescimento celular, que se transformam em oncogenes gerando assim uma célula neoplásica que se torna imortal pela ação da enzima telomerase (Rais *et al.*, 1999). A telomerase é reprimida em células somáticas, porém ela é ativa em células progenitoras, germinativas e tumorais. A ativação desta enzima ocasiona a imortalidade da célula, e a sua repressão leva a morte celular devido à redução contínua do tamanho cromossômico (Yim *et al.*, 2007).

Devido ao estudo dos mecanismos de desenvolvimento das neoplasias no organismo, através da descoberta da transplantabilidade de tumores (Jubb e Kennedy, 1993), foi permitido o desenvolvimento de vários tratamentos quimioterápicos.

Um fármaco eficiente ou ideal no tratamento de tumores é aquele que mata ou incapacita as células tumorais ocasionando poucos danos as células sadias. Nesta situação, a apoptose, deve ser o processo pelo qual ocorre a morte de células tumorais (Vorherr, 1984).

Mesmo havendo um grande número de agentes anti-neoplásicos disponíveis no mercado, devido à toxicidade e também as falhas no tratamento, é grande a importância de novos estudos sobre novos componentes que atuem no ciclo celular

ocasionando a morte por apoptose de células tumorais sem gerar danos excessivos às células saudáveis.

Devido à grande diversidade de estruturas de compostos naturais que são utilizados como agentes farmacológicos pela indústria farmacêutica tais como: Captopril[®], aspirina[®], morfina[®], taxol[®] entre outros, isso mostra o grande potencial de compostos naturais para fins terapêuticos e a necessidade de estudos mais aprofundados em suas propriedades para fins de efeito antitumoral.

1.2 Ciclo Celular

O ciclo inicia-se devido ao ligamento de fatores de crescimento aos receptores da membrana, havendo a ativação de proteínas transdutoras de sinais, que atingem o núcleo, iniciando a transcrição do DNA e finalmente a divisão celular. O ciclo celular se desenvolve nas seguintes fases ou etapas: Na G₀(repouso) as funções em nível basal são mantidas; Na G₁ (gap ou lacuna 1) há um acúmulo de materiais no citoplasma que serão utilizados no desdobramento do DNA. A seguir há uma pausa chamada de ponto R (restrição), quando haverá uma checagem da fita de DNA. Se ocorrer alguma anormalidade na informação genética, esta deverá ser corrigida, caso contrário, a célula não evoluirá; na S (síntese) ocorre a replicação do DNA; Na G₂ (gap₂) ocorre o armazenamento de materiais para a mitose; Na M (mitose) ocorre a divisão celular, onde as duas células filhas possuem o mesmo número de cromossomos da célula mãe e podem ou não recomeçar o ciclo celular. Rais *et al.*, 1999; Sarasin, 2003).

O controle do ciclo celular é realizado por proteínas reguladoras denominadas quinases dependentes de ciclina (CDK), que se ligam as proteínas ciclinas ativadoras, agindo em uma reação de fosforilação, ativando ou inibindo etapas específicas do ciclo celular (Mercetante *et al.*, 2002).

A contagem de número de telômeros induz a célula a se dividir, determinando o número de divisões e posteriormente a senescência e morte celular. Esse é outro processo de controle da divisão celular que sugere a imortalização da célula tumoral (Raiz *et al.*, 1999).

Existe uma programação para cada célula, quando no término de suas funções deve ocorrer a morte celular programada, chamada de apoptose (Lehninger

et al., 2002), controlado geneticamente, atuando na remoção de células indesejáveis em funções fisiológicas e patológicas (Bohm e Schild, 2003).

A célula neoplásica é caracterizada por uma série de fatores, tais como: quando há alterações no número e na forma de cromossomos; perda da função e capacidade de diferenciação; imortalização pela ação da telomerase; perda de controle da divisão e proliferação celular; perda da inibição por contato do movimento e crescimento celular; perda das propriedades adesivas da membrana plasmática não permitindo assim o reconhecimento da célula; capacidade de atingir outros tecidos e formando metástases e induzindo a formação de novos vasos sanguíneos (Blagosklonny, 2003).

1.3 Morte celular

Devido à classificação morfológica e bioquímica sugerida por Kerr em 1972 começou-se a esclarecer a fisiologia do fenômeno de morte celular, que podemos resumir em um processo de morte por necrose e morte celular programada, a apoptose (Bohm e Schild, 2003; Zhivostovsky e Orrenius, 2003).

1.4 Necrose

A necrose é um processo passivo não mediado por ATP, resultante da ação de enzimas sobre a célula lesada de forma letal, que leva a ruptura da membrana citoplasmática, extravasando um material antigênico induzindo a reação inflamatória. Em relação à morfologia ocorrem dois processos: A digestão enzimática, decorrente de uma necrose de liquefação quando a célula é digerida completamente; e a necrose de coagulação, decorrente da desnaturação de proteínas, onde os contornos celulares ficam preservados por certo tempo. Existem três padrões quanto às alterações nucleares: cariólise, diminuição da basofilia da cromatina; picnose, que é o aumento da basofilia e retração nuclear; cariorrexe, que é a fragmentação do núcleo picnótico. Assim em aproximadamente dois dias ocorre o desaparecimento total da célula necrótica (Cotrans *et al.*, 2000; Bohm e Schild, 2003).

1.5 Apoptose

Apoptose é um processo ativo mediado por ATP e pode ser ativada por vias, por exemplo, a de caspases. Quando há ocorrência de danos severos nas células, esses danos inibem a habilidade de produção de ATP ocasionando a necrose. Enquanto que em danos genéticos subletais indicam uma morte celular por apoptose (Leytin e Fredman, 2003), que diferentemente da necrose não há extravasamento de conteúdo para o interstício e conseqüentemente não há inflamação ao redor da célula morta (Moffat *et al.*, 2000; Lowe e Lin., 2000). Podemos considerar quatro componentes genéticos importantes em relação a apoptose: os complexos sinalizadores de morte celular; as caspases; as proteínas da família Bcl-2; e as mitocôndrias (Bohm e Schild, 2003).

Em aproximadamente um ano cada pessoa renova uma quantidade de massa celular igual ao peso do seu corpo inteiro correspondendo cerca de 50 a 70 bilhões de células por dia em um adulto devido a apoptose. Caso haja algum defeito neste processo, acarretará a sobrevivência da célula contribuindo para a expansão de células anormais, criando um ambiente de instabilidade genética e acúmulo de mutações (Andreeff *et al.*, 2000).

As caspases (proteases) são catalisadores, ou seja, são enzimas iniciadoras ou efetoras de processos apoptóticos, e são sintetizadas como pro-enzimas que são ativadas por clivagem ou por outras caspases (Kirkin *et al.*, 2004).

DISCs (Death Inducing Signaling Complexes) são complexos sinalizadores de morte celular, e são formados quando os TNF (fator de necrose tumoral) que são ligantes extracelulares interagem com receptores de superfície de genes receptores com grande número de cisteína, induzindo a destruição celular via apoptose (Shimada *et al.*, 2004).

Os sinais provindos de receptores de lugares danificados ou da superfície da célula chegam à mitocôndria acarretando a permeabilização de suas membranas liberando proteínas relacionadas a apoptose como o citocromo c que ativa as caspases (Gruber *et al.*, 2004).

Certos sinais de estresse tais como radiação, quimioterápicos, choque térmico, falta de fatores de crescimento, níveis aumentados de corticosteróides são detectados pelas mitocôndrias liberando o citocromo c para o citosol dando início ao processo de apoptose (Franklin *et al.*, 2002).

A morte da célula é indispensável à vida, pois faz parte de processos vitais tais como: regulação de células do sistema imune, desenvolvimento embrionário e controle de tumores, devendo, portanto, seguir um plano. Seu equilíbrio é fundamental, pois qualquer distúrbio pode acarretar no surgimento de doenças degenerativas e ao câncer (Reed e Warner, 2002).

1.6 Câncer de Pele

Dividem-se os cânceres de pele em dois grupos principais, os melanóticos e os amelanóticos. Os cânceres amelanóticos possuem crescimento rápido e geralmente não fatal. O melanoma tem origem a partir de melanócitos produtores de melanina, e apesar de aparecerem com menor frequência, sua letalidade é maior (Ricotti *et al.*, 2009).

O desenvolvimento do melanoma ainda não está esclarecido, mas algumas teorias vêm sendo propostas com relação à radiação ultravioleta. O melanoma é uma doença com características genéticas com alterações acumulativas relacionadas à proliferação celular, morte celular programada, angiogênese e expressão de moléculas de adesão (Pomerantz *et al.*, 1998).

Entre os fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma está o histórico familiar, histórico anterior de melanoma, estresse ambiental, entre outros. Esses fatores contribuem para geração de tumor, que se torna perigosa quando começa a avançar para as camadas mais internas da pele, pois aumenta a possibilidade de metástases.

Apesar de se saber que o melanoma é uma doença genética caracterizada por alterações acumulativas dos genes responsáveis ou relacionada à proliferação celular, morte celular programada (apoptose), angiogênese e moléculas de adesão, o mecanismo exato de seu desenvolvimento pela irradiação ultravioleta ainda não está esclarecido (Pomerantz *et al.*, 1998).

A origem do melanoma ocorre na transformação dos melanócitos. A pele, derme e epiderme são separadas por uma membrana basal e os melanócitos posicionam-se na junção epidermal, sendo sua concentração em torno de uma a cada dez células basais. Os melanócitos produzem a melanina que é distribuída para as camadas superiores responsável pela cor da pele e realizando a proteção

do DNA contra a radiação ultravioleta. A proliferação dos melanócitos é altamente controlada e é observada de forma rara em condições fisiológicas basais (Ricotti *et al* 2009).

Ao avançar para as camadas mais internas da pele o melanoma torna-se mais perigoso, pois existe um aumento da possibilidade de metástase (Miller e Mihm, 2006; Rother e Jones, 2009).

São poucos os pacientes que alcançam uma sobrevida de cinco anos após o início do processo de metástase. Existe uma frequência maior de casos desta doença em pessoas com o histórico de exposição solar por períodos longos (Miller e Mihm, 2006; Rother e Jones, 2009).

Mutações na CDKN2A (inibidor de quinase dependente de ciclina 2A) ocorrem em grande parte dos casos de melanoma, com a minoria na quinase que depende ciclina 4 (CDK4). Mudanças genéticas na pele são causadas pela radiação ultravioleta que altera a função imune cutânea e aumenta a produção de fatores de crescimento, induzindo a formação de espécies de oxigênio reativas que danificam o DNA dos queratinócitos e melanócitos (Miller e Mihm, 2006; Rother e Jones, 2009).

1.7 Modelo *in vitro* para estudo do câncer - Células B16F10

Fidler (1973) fez um estudo sobre o potencial de metastatização do melanoma maligno em camundongos C57BL/6. Começou com melanoma murino B16 com baixo potencial de metastatização *in vivo*. Em gerações subsequentes, foram selecionadas sub-populações celulares devido às características de implantação, invasão, sobrevivência e crescimento para formar metástase em pulmão com injeção subcutânea. A linhagem tumoral B16F10 é um modelo biológico útil para o estudo do melanoma *in vitro* em modelo murino, pois possui o mesmo complexo de histocompatibilidade, sendo possível seu uso *in vivo*.

Devido à presença de grande quantidade de melanina, a linhagem B16F10 é um tumor visto facilmente, além de poderem, também, ser facilmente cultivadas *in vitro* e utilizadas em diferentes vias *in vivo*.

Portanto, a linhagem B16F10 é um modelo ideal para se estudar o tratamento de melanoma devido a sua capacidade de invadir a circulação e provocar metástases.

1.8 Venenos de Serpentes

Em relação à sua classificação, os venenos de serpentes podem ser neurotóxicos ou hemorrágicos, conforme o efeito sintomático observado na presa.

São constituídos por uma mistura complexa de substâncias orgânica e inorgânica. As substâncias inorgânicas encontradas são ferro, potássio, íons de cálcio, zinco, manganês, etc. Os compostos orgânicos encontrados são carboidratos, aminas biogênicas, lipídeos, aminoácidos e nucleotídeos (Bjarnason e Fox, 1994), sendo que aproximadamente 90% da massa seca do veneno são formadas por peptídeos e proteínas biologicamente ativos (Markland, 1998).

Na maioria dos venenos de serpentes, ao realizar-se seu fracionamento, identifica-se neurotoxinas, L-aminoácidos oxidases (L-AAOs), fosfolipases A₂, proteases (metalo e serino), toxinas atuantes nos canais iônicos, enzimas atuantes na coagulação e disintegrinas (Monteiro e Zingali, 2002; Santos *et al.*, 2008).

As Neurotoxinas (α -neurotoxinas) se ligam a receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) bloqueando, de forma reversível, a transmissão neuromuscular, trazendo asfixia à presa (Tsetlin e Hucho, 2004). As flavoenzimas L-AAOs catalisam a conversão dos L-aminoácidos em α -cetoácido, produzindo peróxido de hidrogênio e amônia (DU e Clemetson, 2002). Enzimas PLA₂ causam o processo inflamatório quando catalisam a hidrólise de fosfolípidos da membrana, aumentando a permeabilidade microvascular e a formação de edema (Verheij, *et al.*, 1980). Algumas toxinas, por exemplo, mionecróticas (miotoxinas) e cardiotoxinas, apresentam um caráter básico e hidrofóbico sem atividade enzimática, e atuam nos músculos, provocando lesões em suas fibras e perda da excitabilidade dos nervos, causando a despolarização, ligando-se ao retículo sarcoplasmático, alterando a permeabilidade celular (Forouhar *et al.*, 2003; Ownby *et al.*, 1976).

Proteínas tóxicas que interagem com a membrana basal do endotélio, chamadas metaloproteinases, presentes nos venenos de serpentes, são sintetizadas na forma de precursores inativos, processados na glândula da serpente tornando-se enzimas funcionais, sendo que o peptídeo sinal de metaloproteinases possui dezoito aminoácidos servindo como sequência sinal para se determinar sua localização (Shimokawa *et al.*, 1996).

De acordo com seu domínio e massa molecular, as metaloproteinases são classificadas como PI, PII, PIII e PIV. As PI possuem 24 kDa e apenas o domínio metaloproteinases, as de classe PII um domínio catalítico e disintegrina liberado na atividade proteolítica (Yamada *et al.*, 1999), quando algumas (disintegrinas RGD, Arg-Gly-Asp) inibem a adesão celular em células tumorais, reduzindo a metástase (Danen *et. al.*, 1998). As PIII apresentam 50 kDa com domínio disintegrina e cisteína, e uma atividade proteolítica inibidora plaquetária e grande ação hemorrágica. As PIV possuem um domínio lectina-símile com ligações pontes dissulfeto (Bjarnason e Fox, 1994).

Trabalhos recentes vêm mostrando a eficiência do uso de disintegrinas, não somente na inibição de agregação plaquetária, mas também como inibidor do crescimento de células tumorais, angiogênese, adesão e migração (Fucase, 2011).

1.9 Veneno de Serpentes e Câncer

Moléculas de venenos de serpentes já são usadas em tratamentos terapêuticos como, por exemplo, o anti-hipertensivo Captopril® derivado da peçonha de *Bothrops jararaca* (Cushman, 1991). A Batroxobin® e o Ancrod®, utilizados como anticoagulantes em cirurgias cardíacas, e o Enpak®, ainda em fase de estudo, como um potente analgésico isolado do veneno da cascavel brasileira, que é um forte candidato a substituto da morfina (Cury *et al*, 2009).

Diversas substâncias como, por exemplo, as metaloproteinases e PLA₂ são encontradas nos venenos de serpentes e possuem alguma atividade antitumoral (Kamiguti, 1998; Markland, 1998). Devido a essa possibilidade de utilizar estas toxinas como agentes terapêuticos, várias pesquisas trouxeram alternativas de terapias contra o câncer.

1.10 Veneno da *Crotalus durissus terrificus*

A serpente *Crotalus durissus terrificus* conhecida popularmente como cascavel é encontrada no Brasil desde o estado do Rio Grande do Sul até o de Minas Gerais. Os efeitos de seu veneno se manifestam amplamente no organismo

humano como, por exemplo, o sistema nervoso autônomo, rins, músculos esqueléticos, sangue e diversos órgãos (Paioli, 2011).

As principais toxinas desse veneno são: giroxina (33 kDa), convulxina (70 kDa), crotamina (4.8 kDa) e crotroxina (23 kDa) (Takeda *et al.*; 1985).

A crotroxina representa aproximadamente 60% do veneno total. Sua atividade é neurotóxica atuando nas terminações nervosas com inibição da acetilcolina (Azevedo Marques *et al.*; 1992).

É composta por uma subunidade ácida (crotapotina) que não possui toxicidade e que potencializa a ação da subunidade básica (fosfolipase) responsável pela atividade neurotóxica da crotroxina (Bon *et al.*; 1979).

1.11 Veneno da *Crotalus vegrandis*

A cascavel *Crotalus vegrandis* é encontrada numa pequena região da Venezuela (Uracoa Monagas). O gênero *Crotalus* é responsável por cerca de 24% dos acidentes com serpentes, e seu veneno gera alterações fisiopatológicas graves nas vítimas (Pulido-Mendes, 1999; Rodriguez-Acosta, 1995). Essa espécie de serpente possui um veneno altamente neurotóxico e miotóxico (Kouyoumdjian, 1986). As causas das mortes dos acidentes com essa serpente são hemorrágicas, locais e sistêmicas, apesar de ocorrer paralisia respiratória (Rodriguez-Acosta, 1996). Existe um grande interesse na investigação do veneno da *Crotalus vegrandis*, pois suas biomoléculas podem exibir uma atividade antitumoral.

Em 1987, Kaiser e Aird estudaram uma importante proteína da toxina do veneno de *Crotalus vegrandis*, sendo analisada por filtração em gel, cromatografia de troca aniônica, e eletroforese em gel de poliacrilamida SDS. A toxina foi separada em várias isoformas por cromatografia de troca iônica e espontaneamente dissociado em subunidades ácidas e básicas livres. Anti-soro de coelho criado contra crotroxina reage fortemente em ensaios de imunoabsorção enzimática com as isoformas intactas da *C. vegrandis* e as suas subunidades. Estes resultados indicam que a toxina da *C. vegrandis* é homóloga a crotroxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Este veneno é de particular interesse, uma vez que sua atividade é extremamente hemorrágica, que é uma condição incomum dos venenos das

Crotalus encontradas na América do Sul, possuindo uma importante relação com as mudanças antropomórficas de seu ambiente (Viala *et al.*, 2015). Poucos trabalhos descrevem as características neurotóxicas e hemorrágicas desse veneno, mas existe uma grande diversidade de toxinas que podem desempenhar um papel importante nessas ações.

Viala e colaboradores fizeram um estudo proteômico do veneno de *Crotalus vegrandis* identificaram um amplo arsenal de toxinas tais como metaloproteases, subunidades da crotoxina, outras fosfolipases, isoformas de serino-proteases, lectinas e L-amino-ácido oxidase bem como outras toxinas menos abundantes.

1.12 Crotoxina

A crotoxina é uma toxina heterodimérica composta por duas subunidades, com uma não tóxica de caráter ácido, chamada Crotapotina (CA) sem atividade enzimática, e a outra de pouca toxicidade e de caráter básico (CB) que apresenta atividade de PLA₂. Sendo formada por três cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto, a Crotapotina é gerada pela clivagem proteolítica do precursor similar às enzimas PLA₂. A subunidade de caráter básico é uma PLA₂ do Grupo II. A subunidade Crotapotina (CA) age como chaperonina impedindo que o caráter básico (CB) se ligue em sítios não específicos aumentando sua potencialidade (Doley e Kini, 2009).

As enzimas PLA₂ (fosfatidil-acil-hidrolases) catalisam a hidrólise de ligações acil – éster de fosfolipídios, dependendo da presença de íons de cálcio (Dennis *et al.*, 1994). Quanto à sua classificação, a PLA₂ pode ser dividida em PLA₂s secretadas (sPLAs), PLA₂ independente de Ca⁺ (iPLA₂), intracelulares (cPLA₂ citosólicas), PLA₂s lisossomais e acetil-hidrolases (PAF-AH) (Schaloske e Dennis, 2006). O grupo fosfolipase mais estudado até o momento é a da PLA₂s secretadas cujos efeitos estão ligados à liberação de lisofosfolipídeos e ácido araquidônico (Rizzo *et al.*, 2000).

As variedades de conseqüências em relação às patologias sistêmicas que essas toxinas causam estão relacionadas às variedades de propriedades fisiológicas e anatômicas das células e tecidos atingidos, e não aos mecanismos de toxicidade (Sampaio *et al.*, 2010).

O uso da crotoxina como agente antitumoral teve início na década de 1970 em dois pacientes com câncer em estágio avançado com resultados promissores (Cura *et al*, 2002). É de grande importância a busca de novos componentes com ação antitumoral com potencial de redução do processo de metastatização uma vez que as terapias hoje disponíveis se beneficiaram de novas drogas com maior especificidade e eficácia.

1.13 Efeitos da crotoxina em células

Na década de 1970 teve início o uso de crotoxina como um agente antitumoral, através de um fármaco chamado VRCTC-310 composto por crotoxina e cardiotoxina provindos do veneno da serpente *Naja naja atra*, havendo resposta positiva na diminuição dos tumores (Costa *et al*, 1998; Paioli, 2011). Posteriormente o uso da crotoxina foi realizado em 26 pessoas no ano de 2002 por Cura *et al*; havendo redução da massa tumoral e das dores por metástase óssea. Os efeitos colaterais desapareceram com o tratamento, exceto nos casos e hipersensibilidade (Paioli, 2011). Newman *et al*, 1993 também utilizou o fármaco VRCTC-310 *in vivo* e *in vitro*, em carcinoma de pulmões de Lewis, demonstrando a especificidade citotóxica desse fármaco (Paioli, 2011).

Em relação a PLA₂ (Fosfolipase A2), apesar do seu mecanismo de ação ainda não ser completamente esclarecido, sua atividade catalítica é importante para o efeito antiproliferativo (Donato *et al*, 1996). Sabe-se que a supressão do crescimento celular foi mais efetiva em linhagens com maiores níveis de EGFr (fator de crescimento epidérmico), expressando uma correlação entre esses fatores e a ação antiproliferativa da crotoxina (Donato *et al*, 1996; Doley e Kini, 2009).

São fundamentais para a proliferação celular os fatores de crescimento, pois na sua ausência, ocorre o abandono do ciclo na fase G1 pelas células que permanecem na fase quiescente (G0), parando o crescimento celular e diminuindo o metabolismo. Se houver um estímulo para o crescimento as células voltam ao ciclo normal. Sabe-se que agentes antineoplásicos agem com especificidade no ciclo celular, e alguns estudos sugerem que o veneno da cascavel seja específico para o ciclo celular (Soares *et al*, 2010; Paioli, 2011).

No ano de 2006, Yan observou a relação entre a autofagia e apoptose celular em linhagens de leucemia mieloide crônica (K562), e também a diminuição da viabilidade celular com aumento da autofagia, e o colapso da membrana mitocondrial liberando citocromo-c e ativando caspase-3, portanto induzindo a apoptose. Posteriormente, no ano de 2007, os autores realizaram os mesmos estudos na linhagem de câncer mamário humano (MCF-7), com deficiência caspase-3, não observando autofagia e a apoptose, porém se observou que a viabilidade celular diminuiu em relação à dose aplicada e o tempo de exposição (Paioli, 2011).

2. OBJETIVO GERAL

Isolar a crotoxina símile do veneno de *Crotalus vegrandis* e avaliar seu potencial antitumoral.

2.1 Objetivos Específicos

- Purificar a toxina crotoxina símile do veneno de *C. vegrandis*..
- Comparar a atividade citotóxica da proteína isolada frente às duas populações celulares (B16F10 e L929).
- Determinar a IC50 da toxina em fibroblastos e células de melanoma.

3. MATERIAIS E METÓDOS

O veneno bruto da cascavel *Crotalus vegrandis* foi disponibilizado pelo Centro de Biotecnologia, doado pelo Dr. Ivan Kaiser da Universidade de Wyoming.

3.1 Identificação da proteína crotoxina símile em ensaio Dot Blot

Este ensaio imunoenzimático foi realizado com o objetivo de identificarmos a presença do homólogo da crotoxina e de suas respectivas subunidades no veneno de *Crotalus vegrandis*.

Para sua realização, a membrana de nitrocelulose previamente hidratada com PBS foi mantida no aparelho de Blot de 96 poços, onde se adicionou 80 µL de cada amostra. Para o controle negativo foi utilizado PBS. Como controle positivo utilizou-se o veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, 2mg/ml de veneno total de *Crotalus vegrandis* e crotoxina (*Crotalus durissus terrificus*). Após a adsorção das mesmas, a membrana foi incubada durante uma hora com solução de bloqueio contendo 5% de leite liofilizado, desnatado (Molico[®], Nestlé[®]). Posteriormente, a membrana foi incubada, overnight a 4°C, em solução de anticorpo primário policlonal de coelho anti-crotoxina. Após a lavagem da membrana com PBS, as mesmas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:5000). Para a revelação, utilizou-se 25 µL de peróxido de hidrogênio 30% e 10 mg de DAB (Diaminobenzidina) diluídos em 50 mL de PBS.

3.2 Fracionamento do veneno

Devido á diversidade de componentes presentes no veneno bruto da serpente, houve a necessidade do fracionamento para o isolamento da crotoxina símile.

3.2.1 Exclusão Molecular

A crotoxina símile foi inicialmente isolada, a partir do veneno bruto de *Crotalus vegrandis* por exclusão molecular, também conhecida como gel filtração, baseia-se na separação de proteínas de acordo com o tamanho das moléculas. Utilizamos em coluna Superdex 75 10/300 GL. Foram pesados 20 mg do veneno total dissolvidos em 1,2 ml de tampão formiato de amônio 100 mM, pH 3,0. Em seguida a solução foi centrifugada a 12.000 G por 5 minutos em uma microcentrífuga. O sobrenadante foi aplicado à coluna de gel filtração, previamente ambientada com o mesmo tampão, com fluxo de 0,8 ml/min. A absorvância do eluato foi monitorada a 280 nm. As frações foram coletadas e separadas em recipientes apropriados e posteriormente congeladas e liofilizadas.

Para o ensaio de citotoxicidade das frações do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e da *Crotalus vegrandis* utilizou-se o mesmo procedimento descrito, mas no lugar do tampão de formiato de amônia utilizou-se o tampão de PBS pH 7,5.

3.2.2 Cromatografia de troca aniônica

A fração correspondente a crotoxina símile obtida na primeira etapa, depois de liofilizada foi suspensa em 1,2 ml de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 (Tampão A) e aplicada em uma coluna de troca aniônica do tipo Mono Q, previamente estabilizada com o mesmo tampão, conectada no sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography). A crotoxina símile adsorvida a coluna foi eluída pela passagem de um gradiente linear de NaCl de 0 a 1 M em tampão idêntico ao A, exceto pela adição de sal. A absorvância foi lida em 280 nm. As frações correspondentes a crotoxina foram coletadas e em seguida congeladas.

3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Sodium Dodecil Sulphate Poliacrilamide Gel Electrophoresis)

A pureza das frações assim como a eficiência dos métodos de fracionamento foi avaliada qualitativamente por eletroforese sob condições

desnaturantes e não redutoras (Laemmli, 1970). O gel de empilhamento foi preparado em uma concentração de 4% de poliacrilamida e para o gel de separação utilizou-se 15% de poliacrilamida.

Agentes catalisadores (persulfato de amônio e TEMED) foram adicionados nos géis para a polimerização dos mesmos.

Após o fracionamento, 50 µl de cada amostra foram diluídos em 10 µl de tampão de amostra não redutor (glicerol, SDS 10%, tris 1M, pH 6,8 e azul de bromofenol) e aquecidas durante aproximadamente 5 minutos a 70°C.

Posteriormente, 10 µl/poço da amostra foram aplicados no gel e submetidos à eletroforese sob uma voltagem constante de 90 V. As amostras foram então coradas utilizando o corante Coomassie Blue G-250.

3.4 Dosagem de proteínas por Bradford

A concentração da crotoxina foi determinada comparando-se uma curva de diluições em duplicata da amostra em questão a uma curva padrão de BSA (Bovine Serum Albumine).

As amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm, descontando o branco. Os valores de densidade óptica obtidos foram analisados estatisticamente no programa OriginPro 7.0 em uma regressão linear para determinar a equação da curva padrão e concentração da amostra de crotoxina.

3.5 Dosagem de proteínas por Nanodrop

É um procedimento operacional padrão para quantificação de ácidos nucléicos.

Foi utilizado para efetuar o branco 2 µL de tampão PBS para quais as amostras foram eluidas.

Assim que foi higienizado o pedestal acrescentamos 2 µL de cada pico dos venenos de *Crotalus vegrandis* e *Crotalus durissus terrificus* onde obtivemos os resultados que podem ser observados nas tabelas 1 e 2.

Ao término da análise dos picos adicionamos 4 μL de água Milli-Q no pedestal e aguardamos 5 minutos para higienizar o equipamento.

Após os 5 minutos secamos o pedestal com lenço.

3.6 Cultura celular

3.6.1 Linhagens L929 e B16F10

As linhagens L929 (fibroblasto murino) e células tumorais B16F10 (melanoma murino). As células B16F10 foram desenvolvidas a partir do melanoma de pele em camundongos da linhagem C57BL/“J. A linhagem celular L929 é proveniente do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos C3H/Na. Ambos os tipos celulares são aderentes. As células foram cultivadas seguindo os métodos tradicionais de cultivo celular e antes de atingirem confluência, foram subcultivadas para ampliação e congelamento em nitrogênio líquido. Sendo mantidas em RPMI com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), 1% (2nM) de L-Glutamina e 1% de antibiótico e antimicótico estreptomicina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), penicilina (50 U/mL), e anfotericina (1,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) GIBCO[®]. As células foram mantidas em estufa a 37°C, atmosfera úmida e com 5% de CO₂.

3.6.2 Congelamento

As células L929 e B16F10 foram congeladas e estocadas em tanques de nitrogênio líquido em alíquotas de 1×10^6 células/mL em frascos criogênicos estéreis de 2 mL com tampa e rosca interna (Corning[®]). Utilizou-se uma solução de meio de congelamento com 10% de DMSO (Dimetilsulfoxido), 60% de meio de cultura RPMI e 30% de SFB.

3.6.3 Decongelamento

Para o descongelamento, o frasco foi retirado do nitrogênio líquido e rapidamente acondicionado em banho-maria a 37°C foi adicionado 1 mL de meio de cultura constituído de meio RPMI suplementado com 10% de SFB, para diluir o DMSO que é tóxico para as células a temperatura ambiente. Este volume foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL com 4 mL de meio de cultura RPMI, o volume total de 5 mL foi centrifugado a 200G durante 5 minutos, suspensas e semeadas na garrafa T75.

3.6.4 Plaqueamento

O plaqueamento de células de fibroblastos normais L929 e B16F10 melanoma murino numa densidade de 5×10^5 em placas de 96 poços. A placa de cultura é então incubada em estufa a 37°C. Após uma confluência de aproximadamente 75% estas células são expostas a concentrações diferentes e posteriormente testadas com a crotoxina símile do veneno de *Crotalus vegrandis*. Incubados por 48 horas. O ensaio realizado com MTT [3-(4,5-dimethy-2-lthiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] (Mosman, 1983) a placa novamente é incubada por mais 3h. Imediatamente após a incubação o cristal formado é solubilizado e a leitura da absorbância realizada em leitor de ELISA (“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”) a 540 nm.

3.6.5 Tripsinização e repique

Quando as células apresentavam aproximadamente 80% de confluência era realizada a lavagem com tampão fosfato e adicionados 4 mL de tripsina-EDTA aquecida a 37°C para o descolamento das células na garrafa, posteriormente foi adicionado 4 mL de meio de cultura RPMI com 10% de SFB e as células foram centrifugadas a 200g e suspensas. Em seguida 5×10^5 células foram transferidas para garrafas novas e adicionou-se 7 mL de meio RPMI.

3.7 Citotoxicidade e atividade proliferativa

Para os ensaios de citotoxicidade com veneno bruto foi utilizada a linhagem celular de fibroblastos normais de camundongo (L929), para os ensaios com toxinas isoladas, além da L929, foi utilizada a linhagem celular melanoma murino (B16F10).

As células, inicialmente mantidas em nitrogênio líquido, passaram por processo de descongelamento sendo colocadas em garrafas de cultura celular de 25 cm² contendo meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 10.000 U/mL de penicilina e 10.000 µg/mL de estreptomicina. As duas linhagens celulares foram então mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂ até a confluência.

Para o tratamento das linhagens celulares com as frações de *Crotalus dirissus terrificus* e *Crotalus vegrandis*, os dois tipos celulares foram plaqueados em uma concentração de 3 x 10⁵ células/mL (3 x 10⁴ células/poço) de meio RPMI-1640 completo em placas de cultivo celular de 96 poços.

Após a aderência das células, as frações foram diluídas de forma que a concentração inicial fosse 500 µg/mL e posteriormente foi feita uma diluição seriada com meio RPMI-1640 e distribuídas em quadruplicata na placa de cultivo. Os ensaios foram feitos com 48 horas de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, sendo repetidos por três vezes. Como controles negativos foram mantidos poços com cultura de células livre de tratamento com o veneno e como controle positivo foi utilizado veneno de *Bothrops jararaca* na concentração de 100 µg/100 µL.

3.8 Avaliação da viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular após tratamento de 24h com o veneno bruto de *Crotalus vegrandis*, foi feita pelo método colorimétrico utilizando corante vital MTS3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) (Malich *et al* 1997).

A avaliação da viabilidade celular após o tratamento de 48h com as frações obtidas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus vegrandis*, foi feita com o ensaio de MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide]

(Mosman, 1983). Este composto é metabolizado nas mitocôndrias pelas células viáveis formando os cristais, ou seja, onde o efeito citotóxico for maior, haverá pouca formação de cristais. Após duas lavagens com tampão fosfato estéril (100 µL/poço), o MTT foi adicionado na concentração de 5 mg/mL, sendo 100 µL/poço, e novo período de incubação por mais 3 horas nas mesmas condições anteriores. A seguir, o MTT foi removido individualmente dos poços com micropipeta e adicionado o mesmo volume de DMSO (dimetilsulfóxido) para diluição dos cristais. Uma vez diluídos os cristais, a leitura da placa foi feita em um leitor de ELISA (Multiskan EX[®]) em comprimento de onda de 540 nm. Os valores, em quadruplicata, da densidade óptica (D.O.) obtidos foram então utilizados para o cálculo da viabilidade celular da seguinte maneira:

$$Viabilidade\ celular = \frac{Média\ DO\ tratamento \times 100}{Média\ DO\ controle}$$

3.9 Western Blot

Após a gel filtração os picos foram separados e transferidos em uma membrana de nitrocelulose durante 1 hora sobre a corrente de 90 V. Para a realização da transferência foi utilizado um tampão contendo 192 mM de glicina, 25 mM de tris, 0,037% de SDS (Sodium Dodecil Silphate) e 10 % de metanol, pH 8,3. Após a lavagem com PBS a membrana foi incubada durante uma hora com solução de bloqueio contendo 5% de leite liofilizado desnatado (Molico, Nestle). Posteriormente seguiu-se o procedimento citado anteriormente e como anticorpo primário utilizou-se anti-crotoxina na diluição (1:2500) e soro anti-crotalico (1:5000) e com o anticorpo secundário anti IgG de coelho e anti IgG de cavalo conjugado com peroxidase (1:5000). Como controle positivo usou-se veneno total de *Crotalus durissus terrificus*.

3.10 Análise Estatística

Para a análise do estudo de viabilidade celular foi utilizado a variância (ANOVA) de duas variáveis, seguida pelo teste de Bonferroni, do software OriginPro 7.0. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,01$. Os testes estatísticos e elaboração dos gráficos foram utilizados o software PrismaGraph Pad 5.0 e software OriginPro 7.0.

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão da média.

4. RESULTADOS

4.1 Dot Blot

Ensaio imunoenzimático realizado para detectar a crotoxina símile pode ser observado na figura 1.

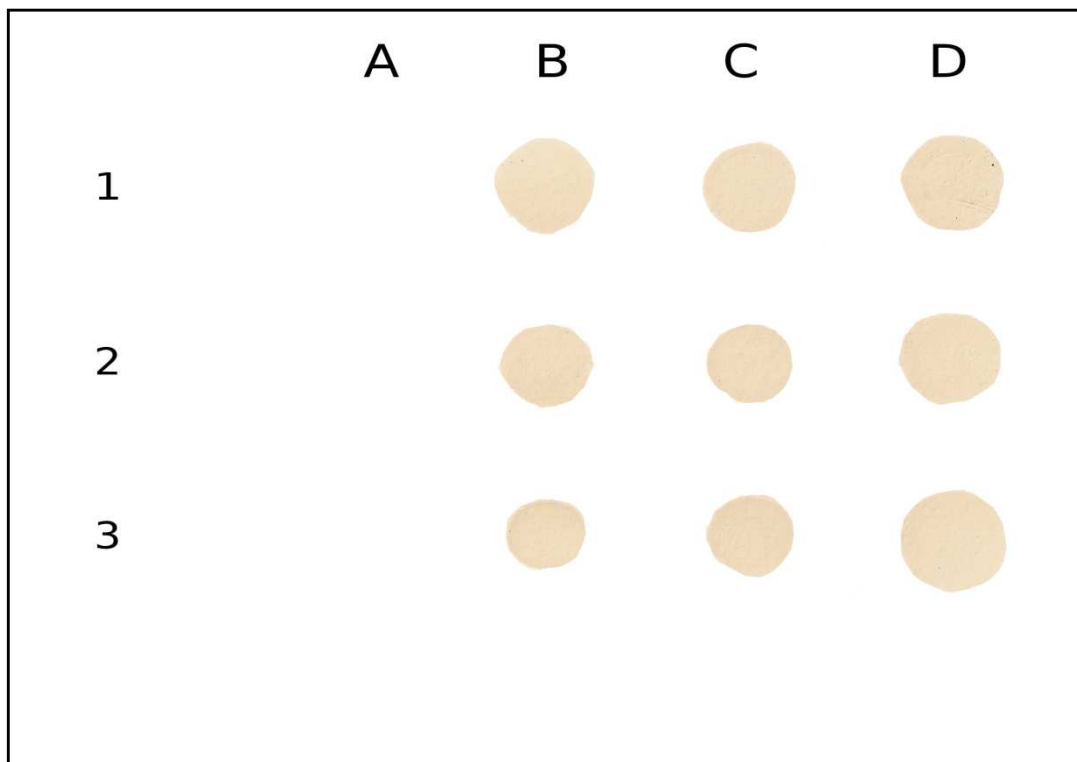


Figura 1 - Dot Blot utilizando anticorpos policlonais contra a crotoxina sendo: A- controle negativo (PBS), B- controle positivo (*Crotalus durissus terrificus*), C- *Crotalus vegrandis*, D- crotoxina (*Crotalus durissus terrificus*), realizado em triplicata 1,2 e 3.

Podemos observar que os componentes de ambos os venenos compartilham identidade imunológica, apesar de induzirem a manifestações clínicas diferentes.

A crotoxina é o principal componente tóxico do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Sampaio *et. al.*, 2004). Formada por duas subunidades: ácida, chamada crotapotina sem atividade de fosfolipase A2, e básica, que apresenta atividade de fosfolipase A2. Para identificação dessas subunidades no veneno de *C. vegrandis* foi realizado o Dot Blot, como pode ser observado nas figuras 1, 2 e 3.

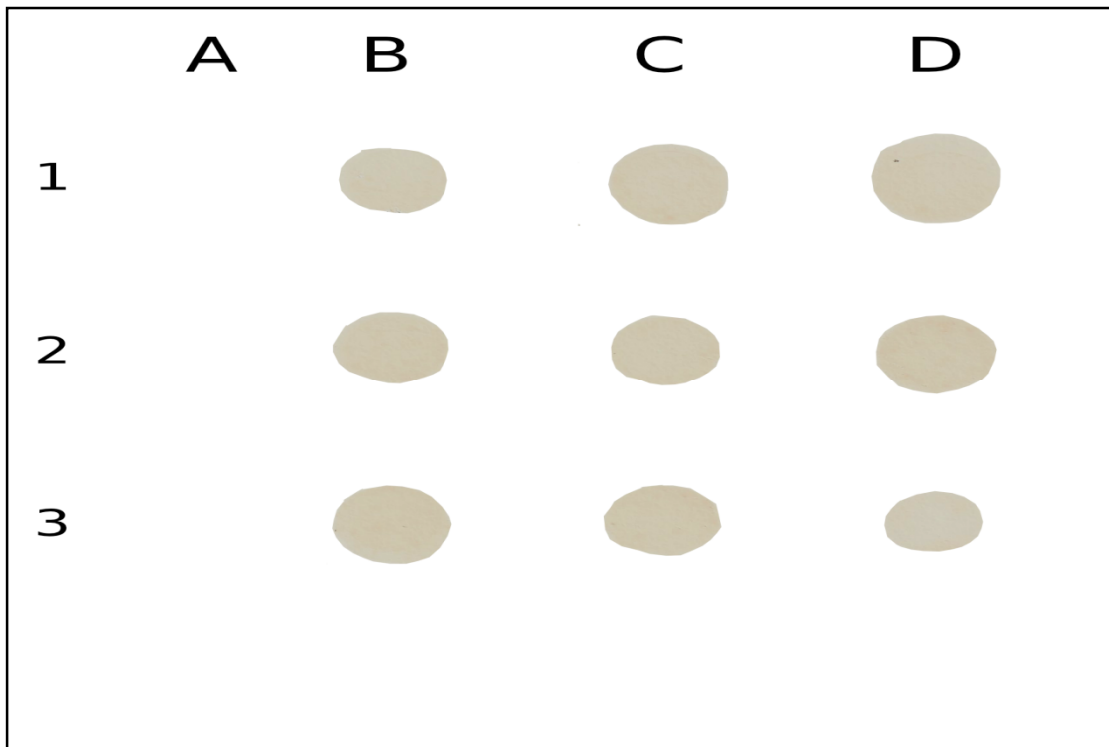


Figura 2 - Dot Blot utilizando anticorpos policlonais contra a porção ácida, sendo: A- controle negativo (PBS), B- controle positivo (*Crotalus durissus terrificus*), C- *Crotalus vegrandis*, D- crotoxina (*Crotalus durissus terrificus*), realizado em triplicata 1,2 e 3.

Podemos observar que foi detectada uma imunorreatividade do veneno com um anticorpo contra a porção ácida (Crotapotina) na no veneno de *Crotalus vegrandis*.

Na figura 3 (abaixo) podemos identificar um componente reativo para anticorpos contra a porção básica (fosfolipase A2) da crotoxina no veneno de *Crotalus vegrandis*.

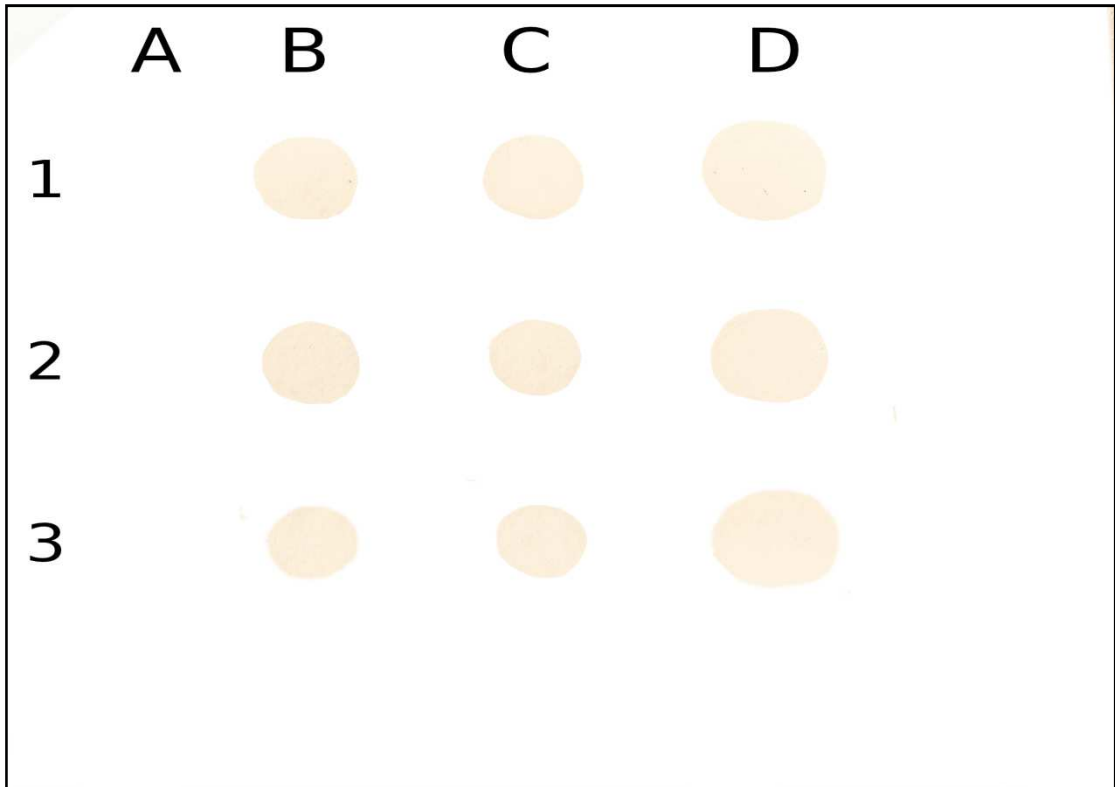


Figura 3 -Dot Blot utilizando anticorpos policlonais contra a porção básica, sendo: A- controle negativo (PBS), B- controle positivo (*Crotalus durissus terrificus*), C- *Crotalus vegrandis*, D- crotoxina (*Crotalus durissus terrificus*), realizado em triplicata 1,2 e 3.

4.2 Fracionamento do veneno de *Crotalus vegrandis*

4.2.1 Gel filtração

Com o objetivo de fracionarmos o veneno de *Crotalus vegrandis* foi realizada a gel filtração em coluna Superdex 75 10/300 GL, como mostrado na figura 4.

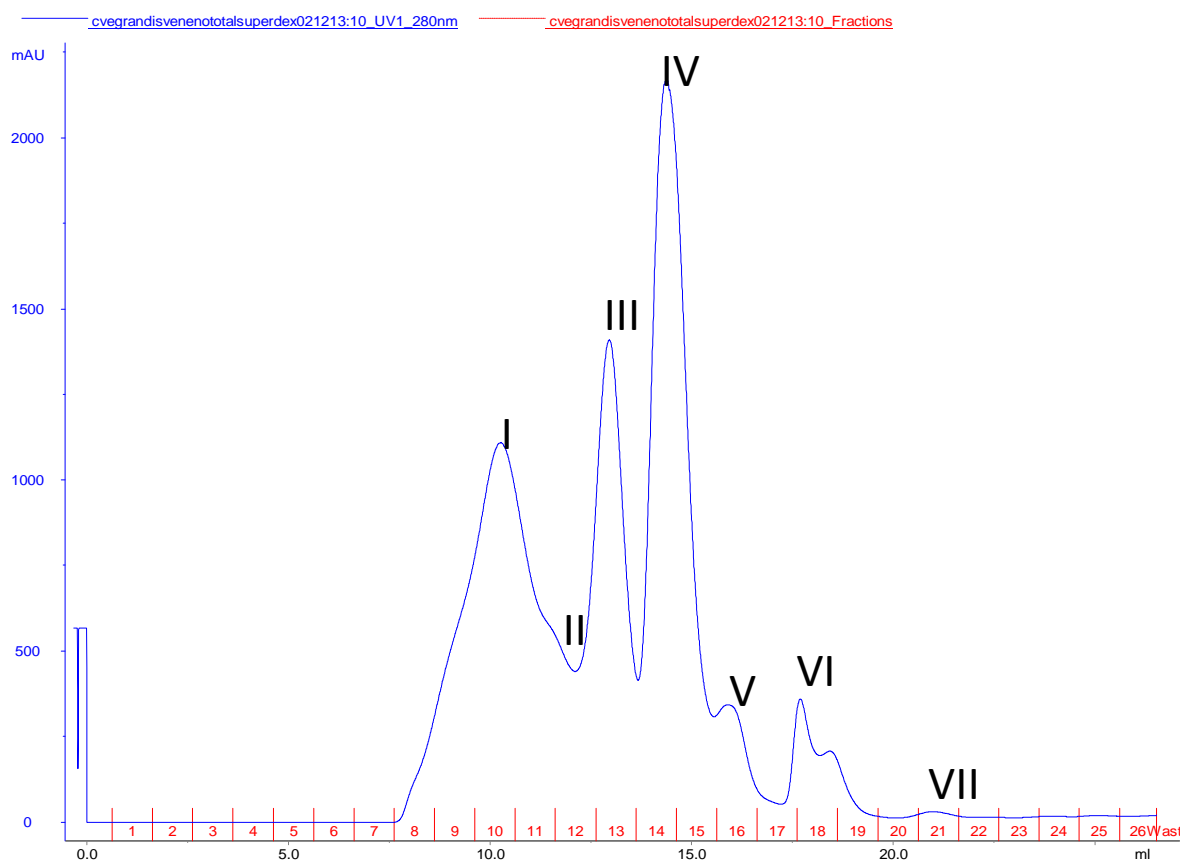


Figura 4 – Primeiro passo para o isolamento da crotoxina símile: Perfil cromatográfico do veneno total de *Crotalus vegrandis* (20 mg/mL) em coluna Superdex 75 10/300 GL, previamente equilibrada com Formiato de amônio 100 mM em pH 3,0. A absorbância foi determinada em 280 nm em fluxo de 0,8 mL/min. Foram obtidos os seguintes picos: I, II, III, IV(Crotoxina símile), V, VI e VII.

Observam-se 7 picos provenientes do veneno de *Crotalus vegrandis*. O pico majoritário (IV) foi considerado o de interesse para realizarmos a segunda etapa de troca aniônica.

4.3 SDS PAGE

Para determinar a pureza e confirmarmos se realmente se tratava da crotoxina símile foi realizado o ensaio de eletroforese em gel de poliacrilamida, na ausência de agente redutor. As amostras aplicadas são referentes aos picos da gel filtração em um volume de 10 μ l/poço (Figura 5).

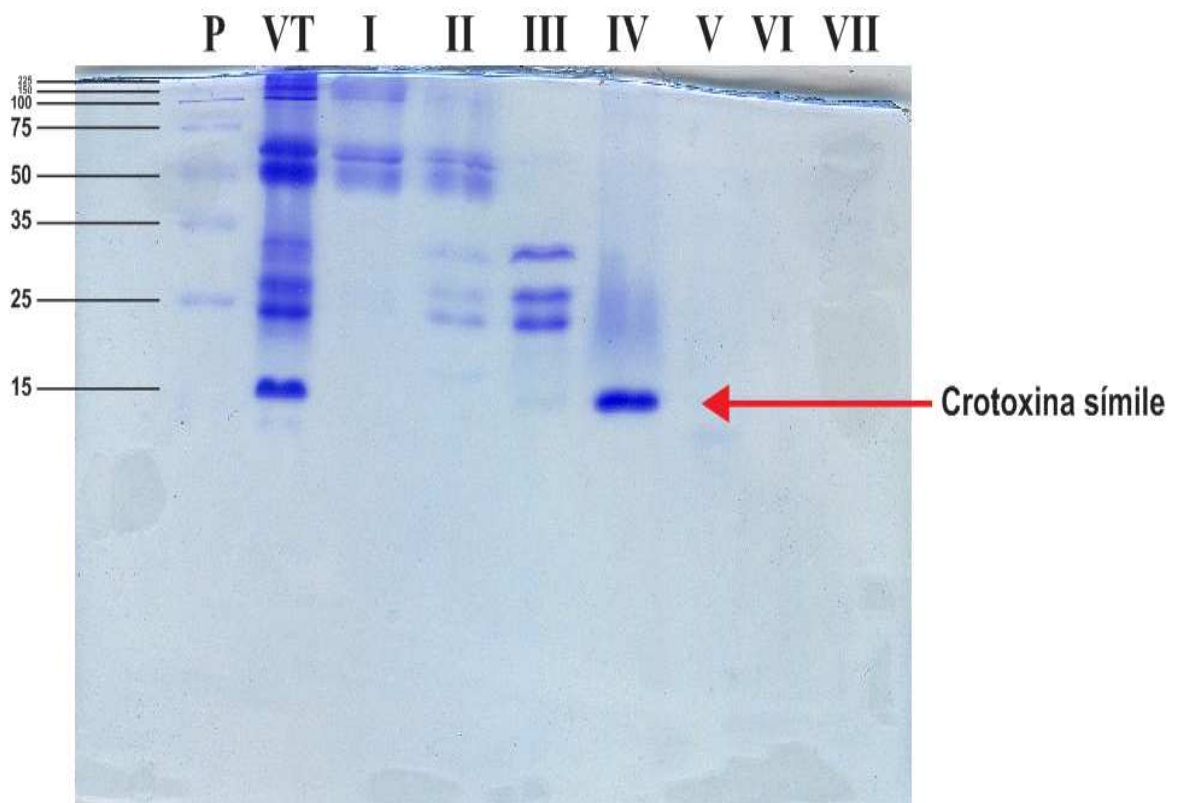


Figura 5- SDS-PAGE 15% com picos fracionados na gel filtração. Foram aplicados 10 μ L/poço de amostra em concentração de 0,3 mg/mL. P= Padrão de massa molecular em kDa e VT= Veneno total.

Foram observadas bandas nos picos de I a VII, sendo evidenciada no pico IV a crotoxina símile com a massa molecular de aproximadamente 14 kDa (Fosfolipase A2) .

Posteriormente, as mesmas amostras foram submetidas a uma nova eletroforese SDS Page sob condições desnaturantes e redutoras (Figura 6).

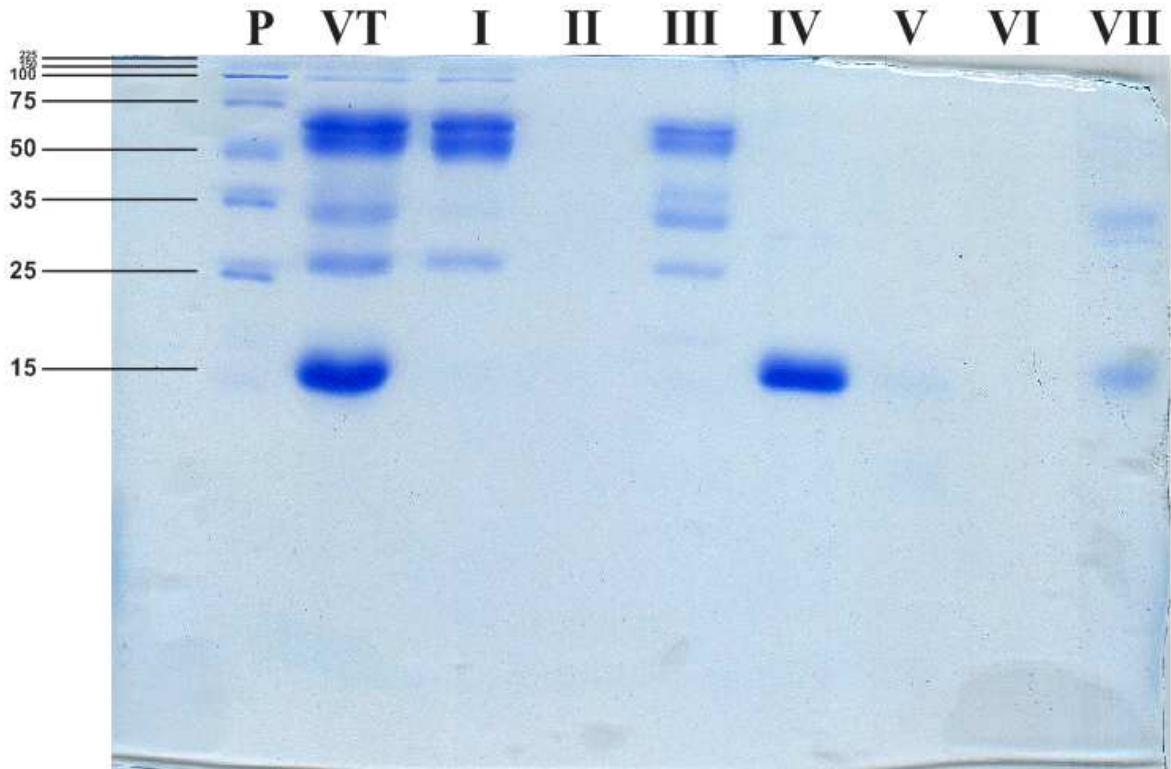


Figura 6- SDS-PAGE 15% com picos fracionados na gel filtração. Foram aplicados 10 μ L/poço de amostra em concentração de 0,3 mg/mL. P= Padrão de massa molecular em kDa e VT= Veneno total.

Foram observadas bandas referentes aos picos de I a VII, sendo evidenciada no pico IV a crotoxina símile com massa molecular de aproximadamente 14 kDa (Fosfolipase A2) .

4.4 Western Blot das proteínas fracionadas por Gel filtração

Outra confirmação para presença de crotoxina símile foi feita a partir de Western Blot, como pode observado na figura 7.

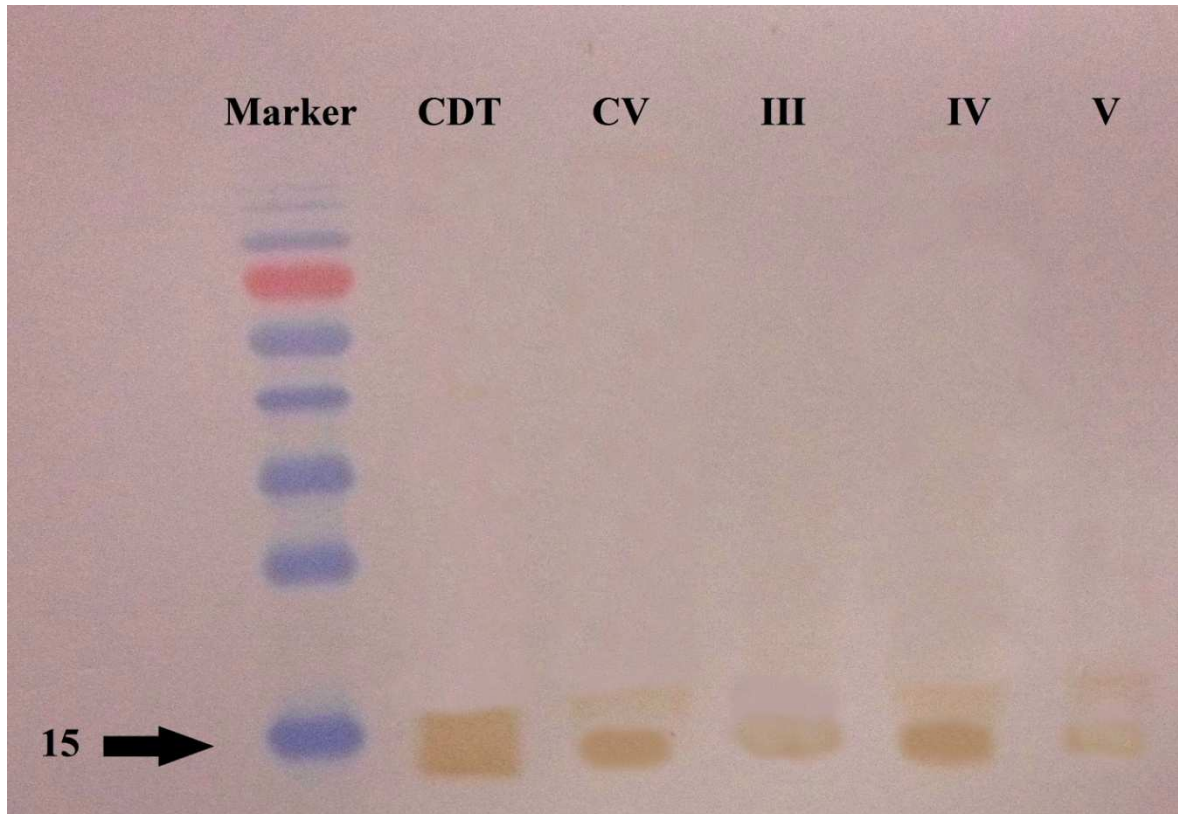


Figura 7 - Western Blot dos picos da Gel filtração(I ao V) incubados com anticorpo policlonal anti-crotoxina. Foi aplicado 10 uL/poço de amostra. Como controle positivo foi utilizado veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Na membrana acima são observadas uma banda reconhecida pelo anticorpo anti-crotoxina com aproximadamente 15 kDa que possivelmente seja da crotoxina símile do veneno de *Crotalus vegrandis*.

4.5 Troca aniônica

Nesta segunda etapa o cromatograma (Figura 8) retrata o pico IV(crotoxina símile) proveniente da gel filtração, em coluna de troca aniônica (Mono Q).

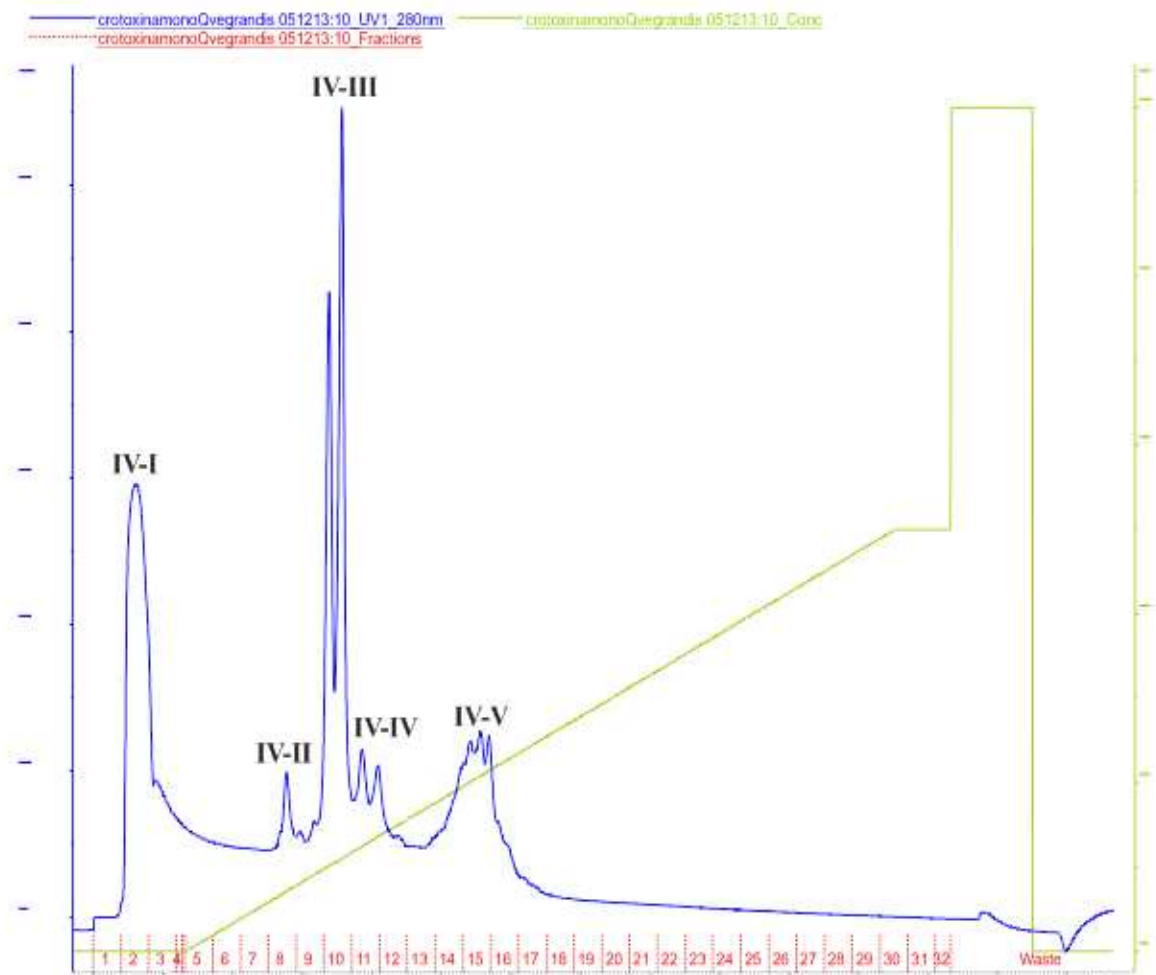


Figura 8- Segunda etapa troca aniônica: Perfil cromatográfico do pico IV(referente a crotoxina símile) obtido na Gel filtração em coluna Mono Q previamente equilibrada com Tris/HCl 50mM em pH 8,2. A absorbância foi determinada em 280 nm em fluxo de 0,8 mL/min. Foram Obtidos os seguintes picos: IV-I, IV-II, IV-III(Crotoxina), IV-IV e IV-V.

O pico IV-III como majoritário reforça o indicio da presença da crotoxina símile.

4.6 SDS PAGE

Na figura 9 podemos observar o gel SDS PAGE 15% das amostras obtidas após a segunda etapa de fracionamento em coluna Mono Q.

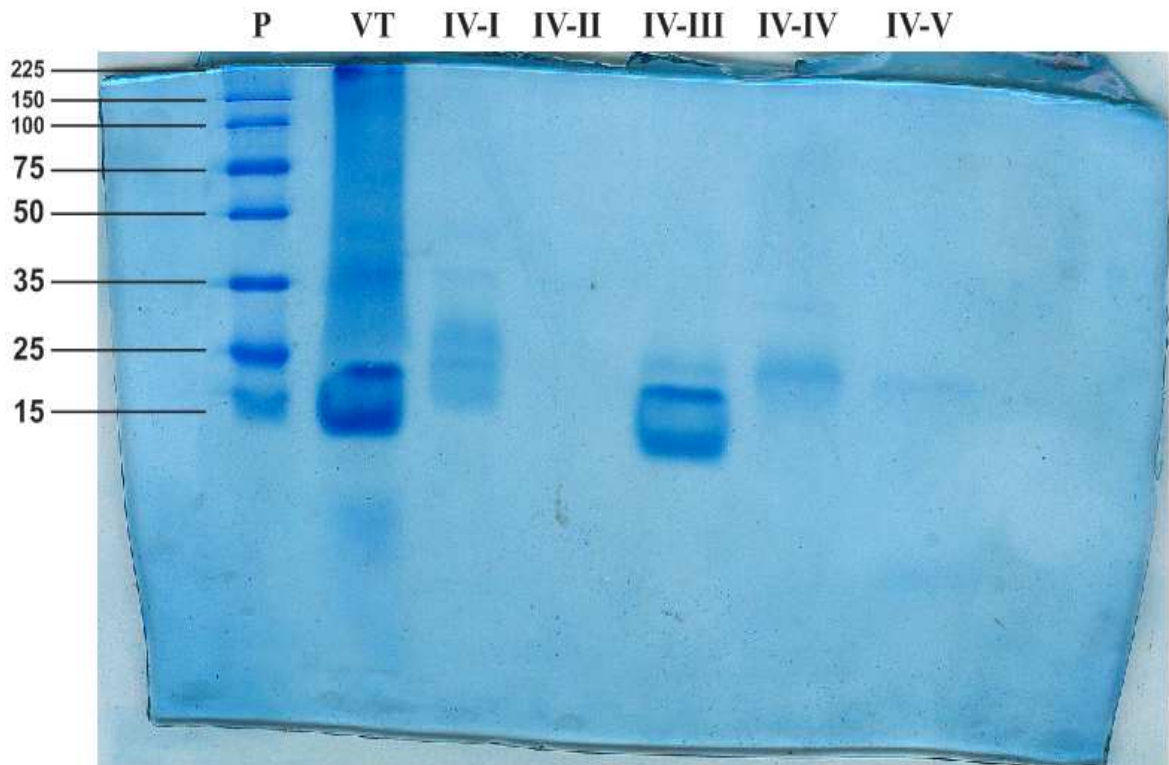


Figura 9- Gel SDS PAGE 15% das frações coletadas na troca aniônica. Foram aplicados 10 μ l/poço. P= Padrão de massa molecular em kDa. Utilizou-se veneno total de *Crotalus vegrandis* = VT. E os picos correspondentes da troca aniônica de IV-I a IV-V. Evidenciando a fosfolipase A2 no pico IV-III, confirmando na troca aniônica o pico majoritário.

O resultado do gel mostra a pureza da crotoxina símile devido o pico IV-III demonstrar o tamanho molecular de 15 kDa.

4.7 Fracionamento do veneno de *Crotalus vegrandis*

4.7.1 Gel filtração

Como alternativa ao método de gel filtração com tampão de formiato de amônio, utilizou-se o tampão PBS pH 7,5, que oferece condições adequadas às células, os resultados deste ensaio pode ser observado na figura 10.

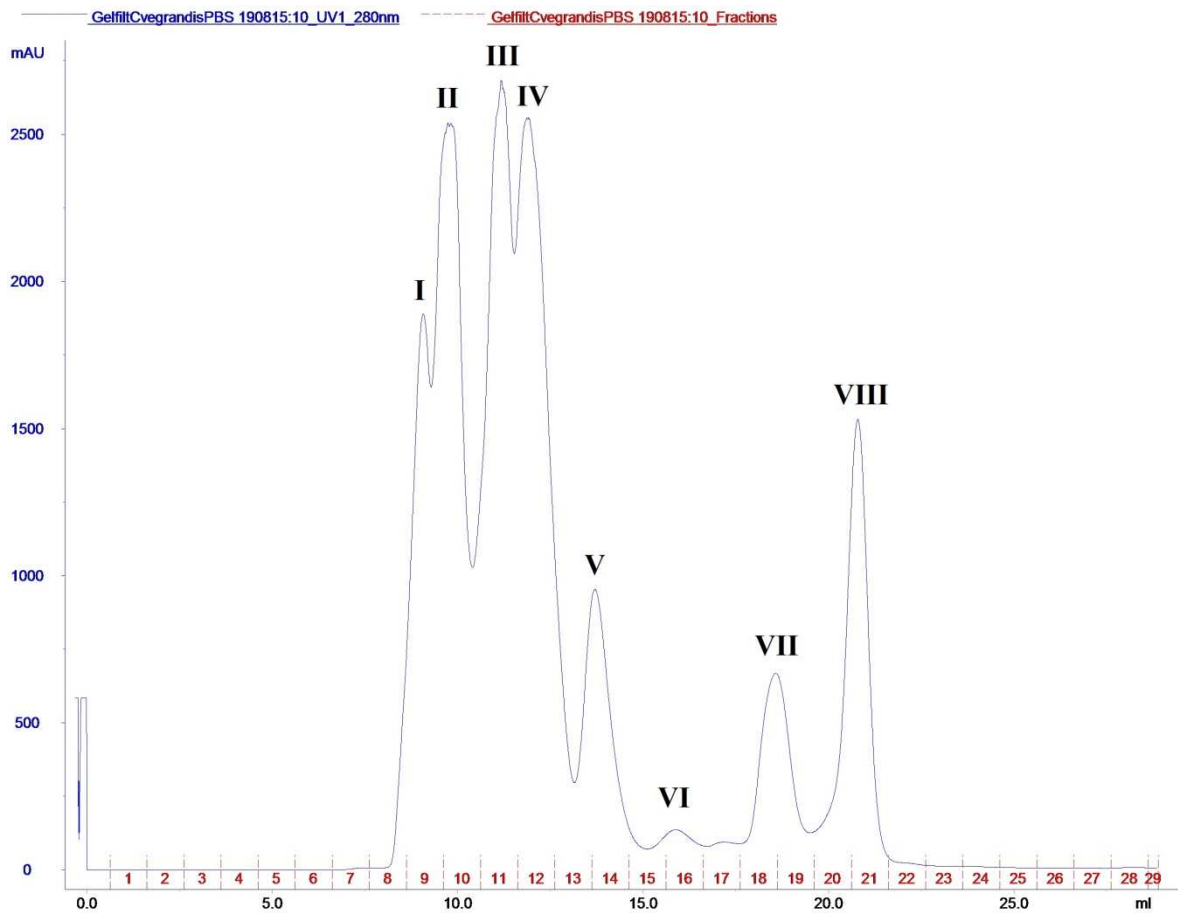


Figura 10- Perfil cromatográfico do veneno total de *Crotalus vegrandis* (15 mg/mL) em coluna Superdex 75 10/300 GL, previamente equilibrada com PBS pH 7,5

Pela mudança de tampão, não se verificou um pico majoritário da crototoxina símile, portanto, foram utilizados, no ensaio com células, os picos majoritários (I, II, III e IV).

4.8 SDS PAGE

Com intuito de identificar a presença de crotoxina símile, foi realizado o SDS PAGE 15% nas amostras do fracionamento em coluna gel filtração ambientada com tampão PBS pH 7,5 (figura 11).

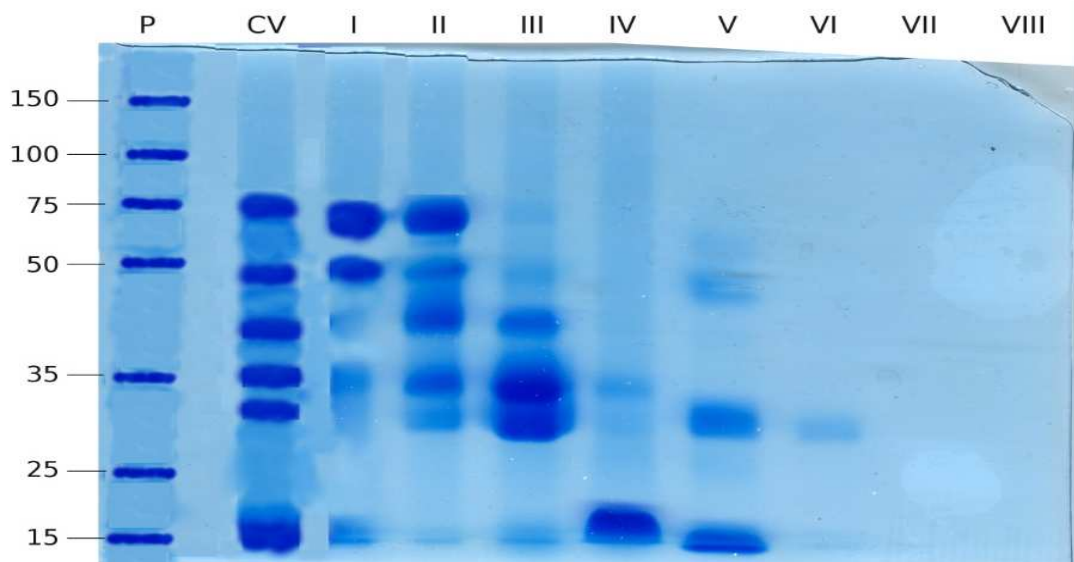


Figura 11 - Gel SDS PAGE 15% com os picos fracionados em coluna de Gel Filtração. Foi aplicado 25 μ L/poço de amostra.

Para a análise de pureza e tamanho molecular foi realizado gel de poliacrilamida 15%. As amostras foram preparadas utilizando tampão não redutor. Observa-se uma significativa quantidade de bandas com variadas massas moleculares como indicado na figura 11.

4.9 Fracionamento do veneno de *Crotalus durissus terrificus*

4.9.1 Gel filtração

A gel filtração com veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Figura 12) foi realizada com o intuito de compará-los com o obtido com a *Crotalus vegrandis*.

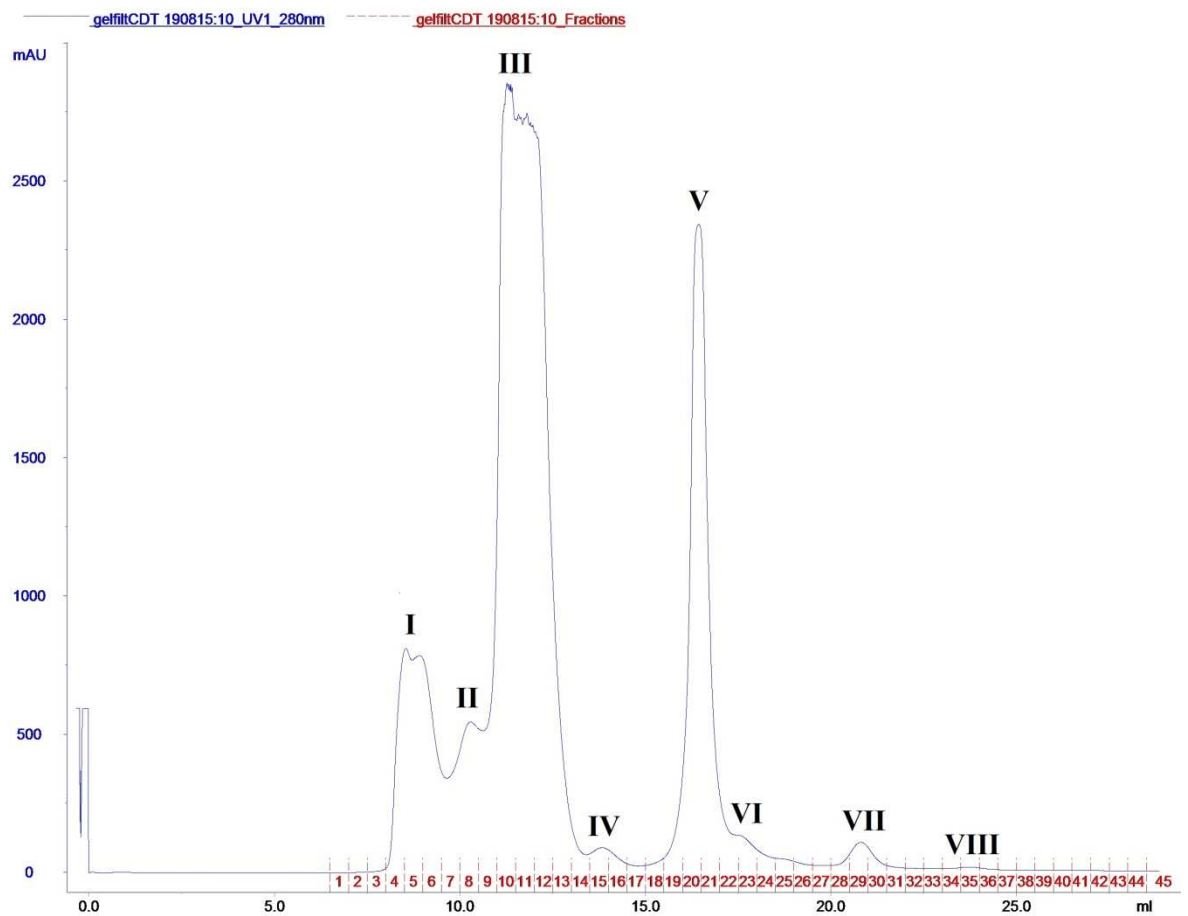


Figura 12-Perfil cromatográfico do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* (15 mg/mL) em coluna Superdex 75 10/300 GL, previamente equilibrada com PBS pH 7,5

Apesar do agrupamento observados nos picos, as concentrações foram próximas às observadas na gel filtração com *Crotalus vegrandis*.

4.10 Quantificação protéica

As tabelas 1 e 2 mostram a dosagem protéica dos picos obtidos da Gel filtração submetidas ao ensaio de citotoxicidade.

Tabela 1 – Concentrações de proteínas fracionadas com o veneno de *Crotalus vegrandis*. Referente a figura 10.

Picos- Gel Filtração Veneno <i>Crotalus vegrandis</i>	Concentração (mg/mL)
I ⁽¹⁾	1,292
II ⁽²⁾	1,556
III ⁽⁴⁾	2,362
IV ⁽³⁾	1,552
V	0,421
VI	0,077
VII	0,268
VIII	0,528

(¹), (²), (⁴) e (³) utilizados em ensaio de citotoxicidade nomeados como Pico I, Pico II, Pico III e Pico IV respectivamente na Figura 10.

Tabela 2 – Concentrações de proteínas fracionadas com o veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Referente à figura 12.

Picos- Gel Filtração Veneno <i>Crotalus durissus terrificus</i>	Concentração (mg/mL)
I ⁽⁴⁾	0,659
II ⁽¹⁾	2,160
III ⁽²⁾	3,958
IV	0,031
V ⁽³⁾	1,017
VI	0,058
VII	0,061
VIII	0,006

(⁴), (¹), (²) e (³) utilizados em ensaio de citotoxicidade nomeados como Pico I, Pico II, Pico III e Pico V respectivamente na Figura 12.

Os valores foram obtidos para que os picos de maior concentração fossem utilizados no ensaio com células. Para o veneno das duas serpentes, os picos I, II e III foram os de maior concentração, demonstrando a similaridade entre os venenos.

4.11 Ensaios de citotoxicidade

4.11.1 Veneno *Crotalus vegrandis*

O ensaio foi realizado em células B16F10 e L929, utilizando os picos coletados na coluna de exclusão molecular (Gel filtração) (figura 13).

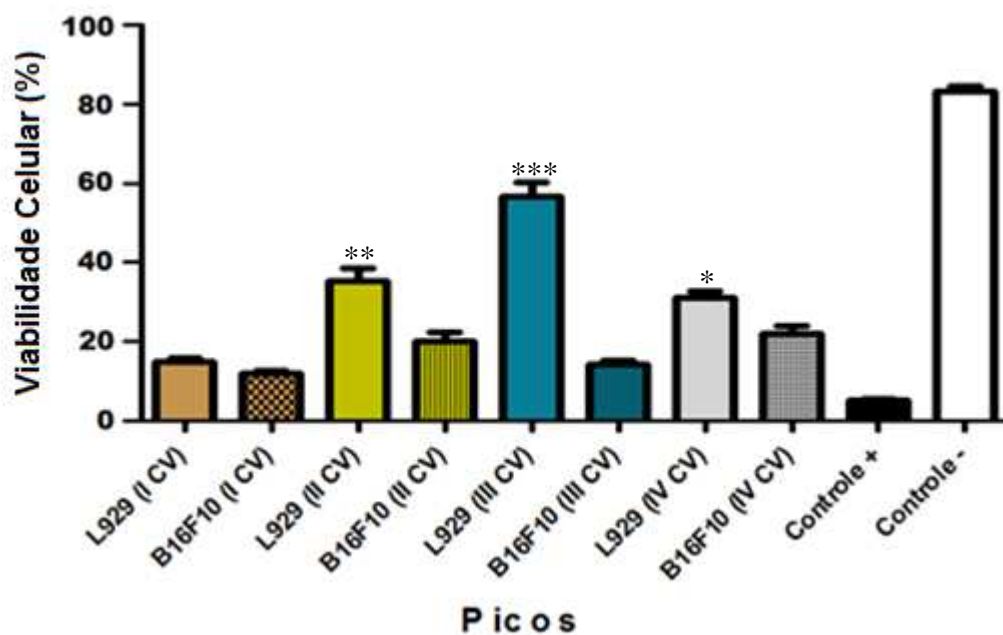


Figura 13- Ensaio citotóxico com veneno de *Crotalus vegrandis* em células L929 e B16F10 expostas por 48 horas aos picos coletados após cromatografia em coluna Superdex 75 10/300 GL. 500 ug/mL de toxina com 1×10^4 células por poço. Houve uma maior inibição no crescimento celular na linhagem tumoral B16F10. (*) diferenças significativas ($p < 0,01$) comparando as concentrações testadas em B16F10 versus L929. Como controle positivo foi utilizado veneno de *Bothrops jararaca* na concentração de 100 $\mu\text{g}/1 \mu\text{L}$.

O pico III mostrou a maior citotoxicidade para células B16F10 e a menor para células L929.

4.11.2 Veneno de *Crotalus durissus terrificus*

O ensaio foi realizado em células B16F10 e L929, utilizando os picos coletados na coluna de exclusão molecular (Gel filtração) (figura 14), com o intuito de comparar os resultados com os obtidos com o veneno de *Crotalus vegrandis*.

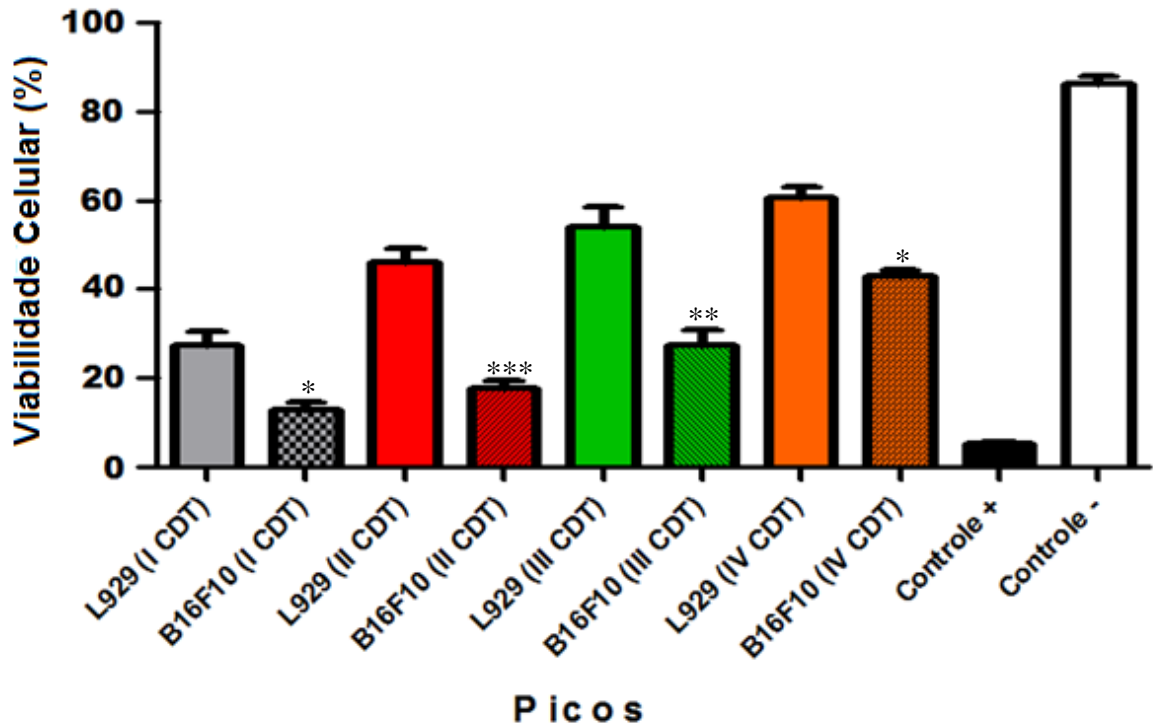


Figura 14- Ensaio citotóxico com veneno de *Crotalus durissus terrificus* em células L929 e B16F10 expostas por 48 horas aos picos coletados após cromatografia em coluna Superdex 75 10/300 GL. 500 µg/mL de toxina com 1×10^4 células por poço. Houve uma maior inibição no crescimento celular na linhagem tumoral B16F10. (*) diferenças significativas ($p < 0,01$) comparando as concentrações testadas em B16F10 versus L929. Como controle positivo foi utilizado veneno de *Bothrops jararaca* na concentração de 100 µg/100 µL.

Os dados obtidos com o pico III apresentaram atividade semelhante ao obtido no experimento anterior com *Crotalus vegrandis*, mas não apresentaram a mesma eficiência para as células B16F10.

4.11.3 Avaliação da viabilidade celular

A sensibilidade das células aos picos de maiores efeitos citotóxicos (pico II e III) estão representados nos gráficos 15 e 16.

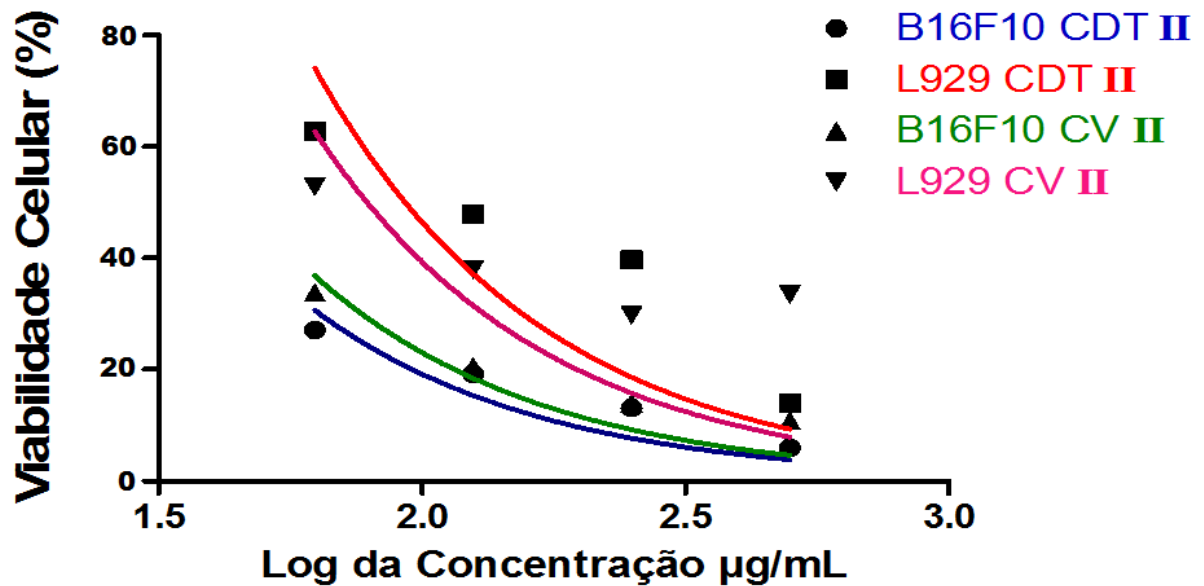


Figura 15- Gráfico de viabilidade celular (%) pelo logaritmo da concentração (µg/mL) em células L929 e B16F10 relativo ao pico II dos venenos de *Crotalus vegrandis* e *Crotalus durissus terrificus*.

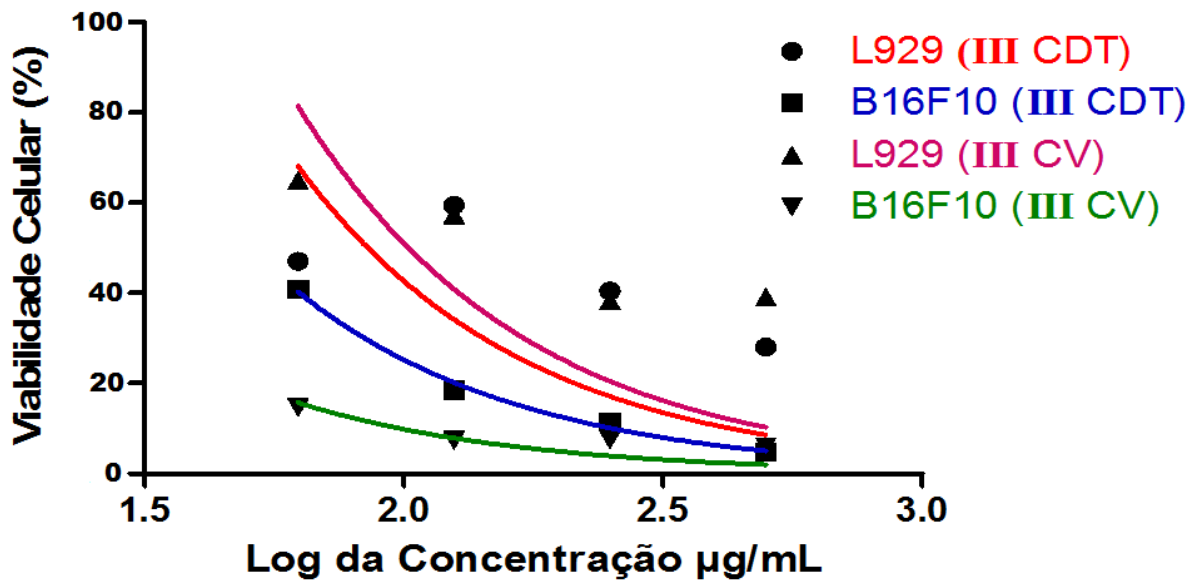


Figura 16- Gráfico de viabilidade celular (%) pelo logaritmo da concentração (µg/mL) em células L929 e B16F10 relativo ao pico III dos venenos de *Crotalus vegrandis* e *Crotalus durissus terrificus*.

Ambos os venenos demonstram a mesma tendência quanto á viabilidade celular, porém, em ambos os picos é reforçada a maior efetividade citotóxica do veneno de *Crotalus vegrandis* sobre células tumorais (B16F10) e menor ação sobre células normais (L929). (Figuras 15 e 16).

4.11.4 Ensaios de Viabilidade celular com veneno bruto

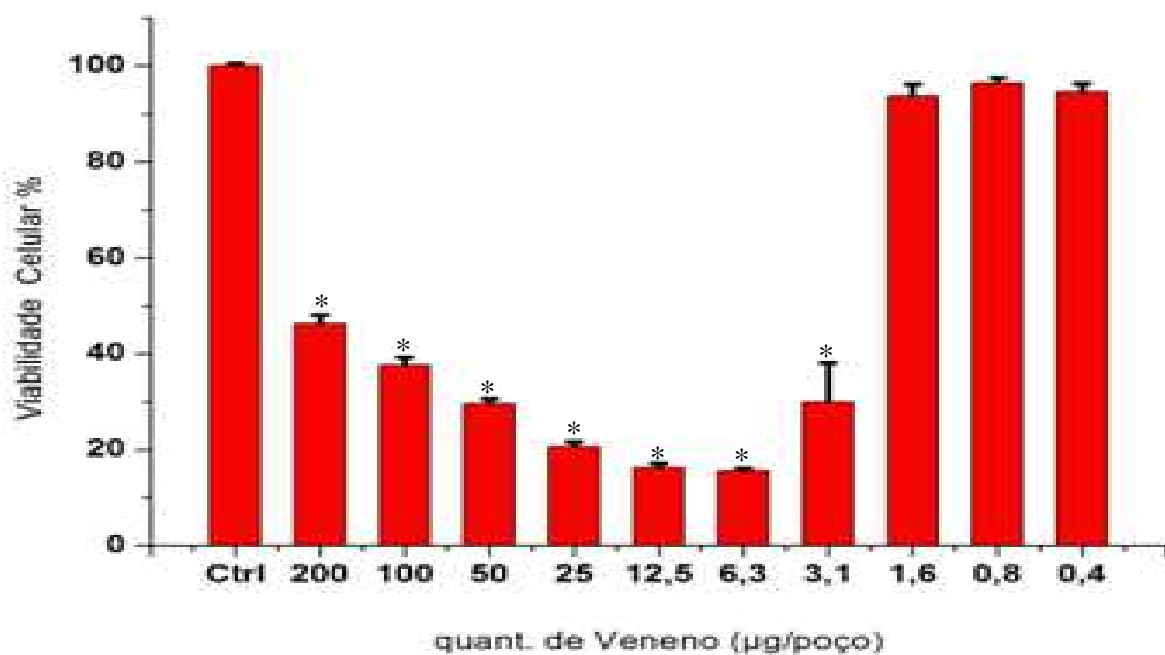


Figura 17- Viabilidade das células L929 após incubação com veneno de *Crotalus vegrandis*, ensaio com MTS após 24 horas. A maior citotoxicidade foi evidenciada na concentração de veneno de 6,3 µg/poço. (OriginPro 7.0). Houve uma maior inibição no crescimento celular na linhagem tumoral B16F10. (*) diferenças significativas ($p < 0,01$) comparando as concentrações testadas versus o controle.

Este ensaio (figura 17) foi realizado com o intuito de analisarmos a viabilidade e atividade citotóxica esperada em células L929 do veneno bruto de *Crotalus vegrandis*, observando a citotoxicidade frente a um novo lote de veneno.

As células de fibroblastos mostraram-se sensíveis, observamos também alterações morfológicas à ação citotóxica da diluição do veneno de *Crotalus vegrandis* em 12,5 µg/poço, demonstrada na figura C

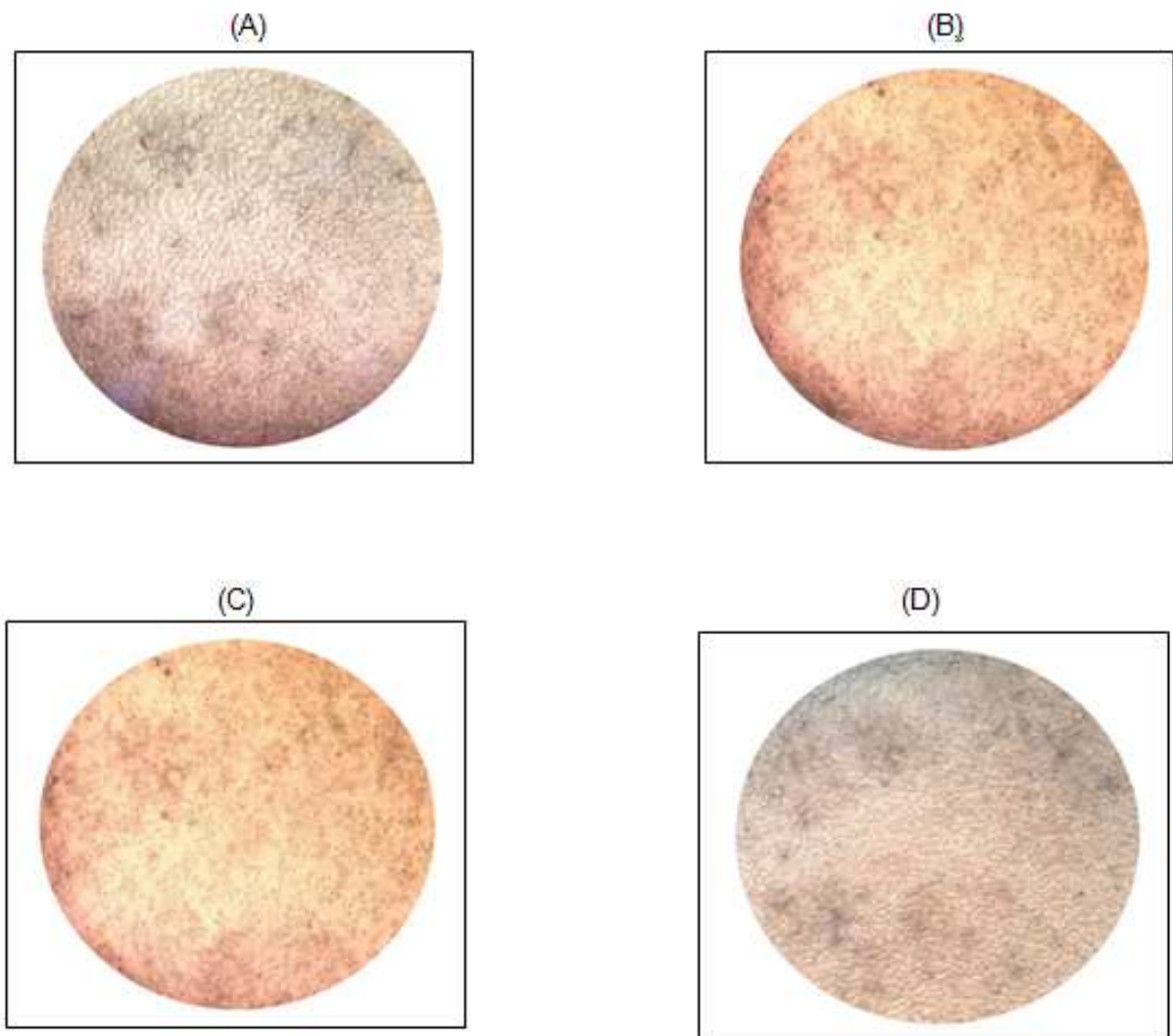


Figura 18- Micrografias de fibroblastos L929 e após o tratamento com veneno de *Crotalus vegrandis* (aumento de 200X) por 24 horas. A- controle negativo B- 200 µg/poço, C- 12,5 µg/poço e D-1,6 µg/poço.

4.12 Cromatografia de Exclusão Molecular

4.12.1 Etapa para o ensaio de Fracionamento do veneno total de *Crotalus vegrandis*.

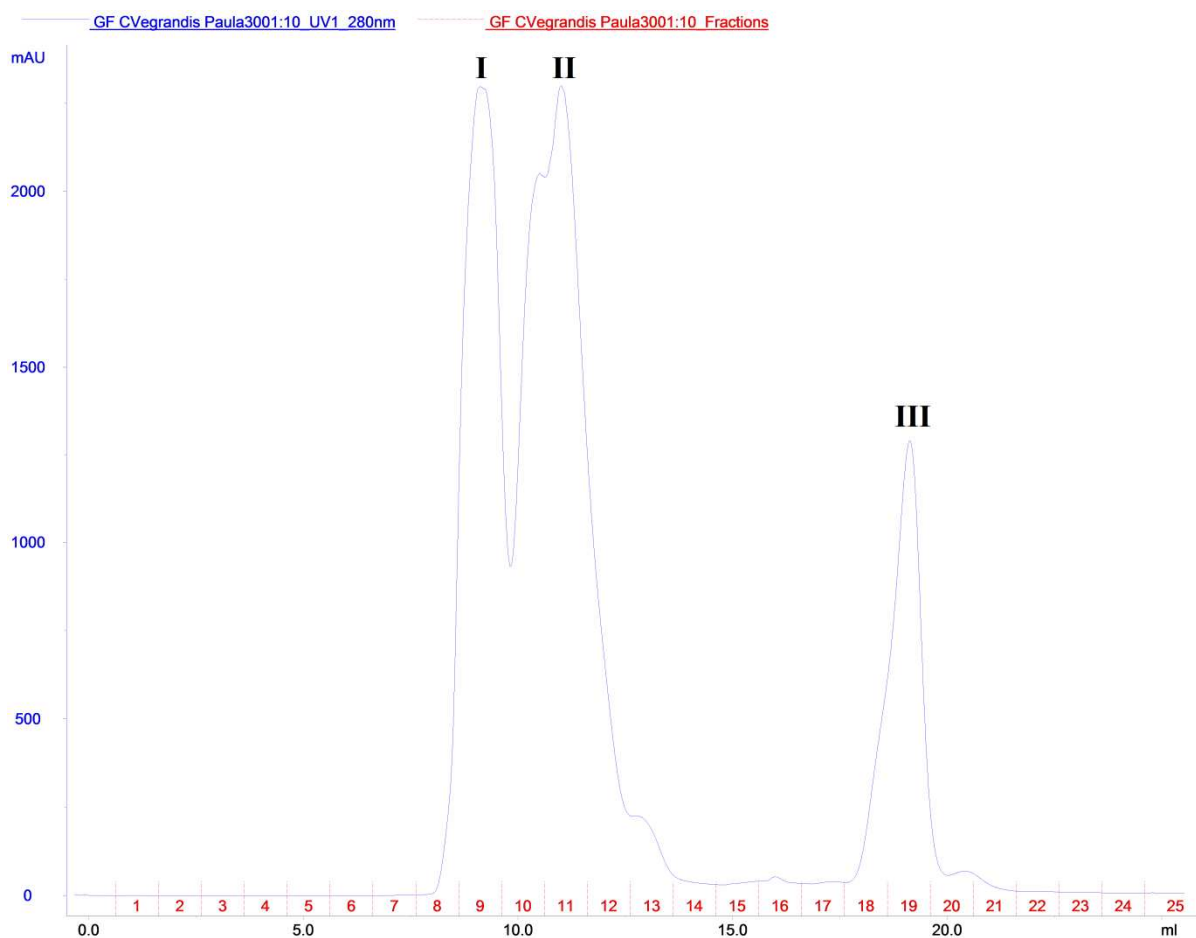


Figura 19- Fracionamento do veneno: Perfil cromatográfico do veneno total de *Crotalus vegrandis* (20 mg/mL) em coluna Superdex 75 10/300 GL, previamente equilibrada Tris/HCl 50mM em pH 8,2. A absorbância foi determinada em 280 nm em fluxo de 0,8 mL/min. Foram obtidos os seguintes picos: I, II e III.

Os picos obtidos nesta etapa (Figura 19) foram coletados e o pico I selecionado para a próxima etapa de fracionamento em coluna Mono-Q.

4.13 Cromatografia de Troca Anionica e gel SDS PAGE 15%

4.13.1 Fracionamento do pico I obtido da exclusão molecular.

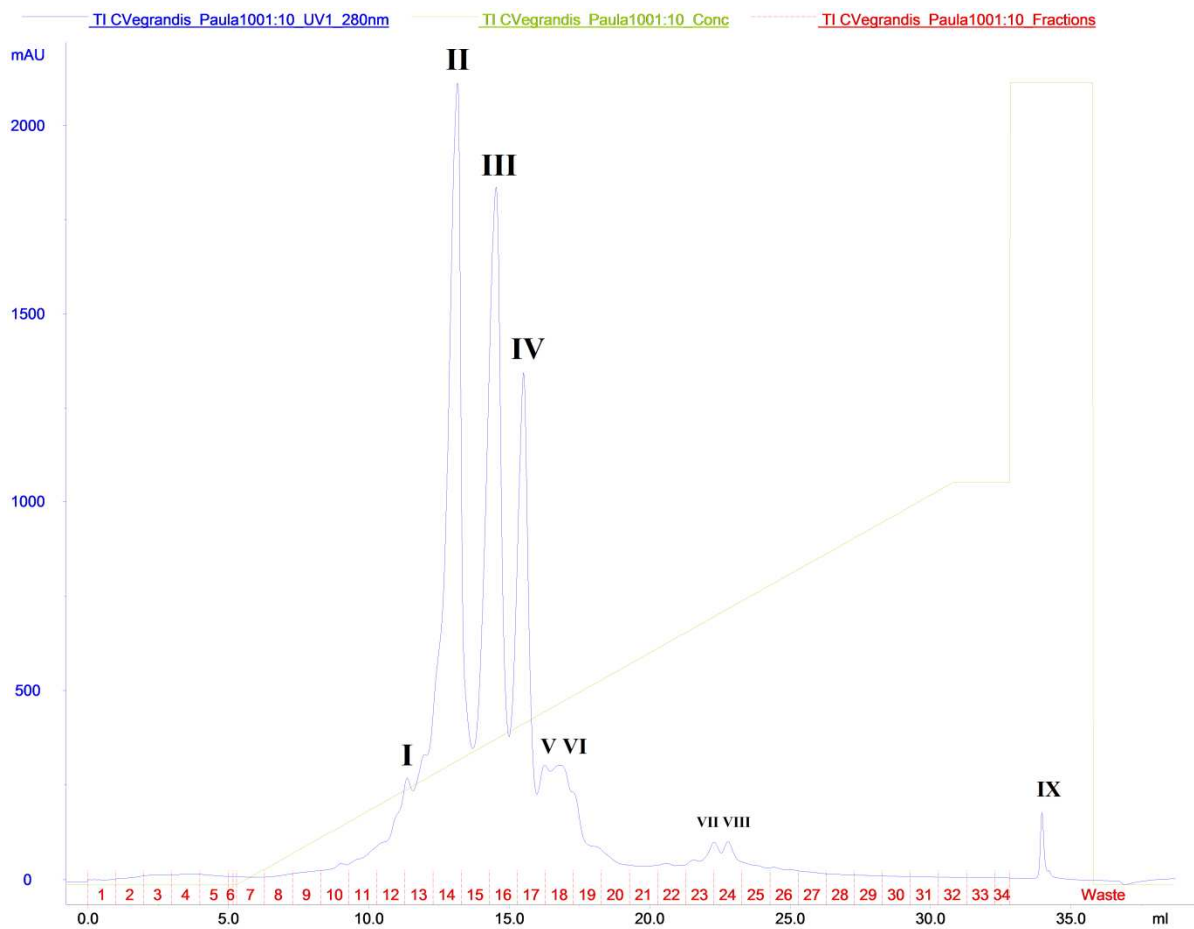


Figura 20- Fracionamento do pico I do veneno de *Crotalus vegrandis* em coluna Mono-Q. Previamente equilibrada Tris/HCl 50mM em pH 8,2. A absorbância foi determinada em 280 nm em fluxo de 0,8 mL/min. Os picos obtidos foram I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX.

O pico majoritário (II) foi coletado, posteriormente quantificado em Nanodrop, liofilizado e dializado.

4.14 SDS PAGE 15%.

4.14.1 Analise de pureza e tamanho molecular.

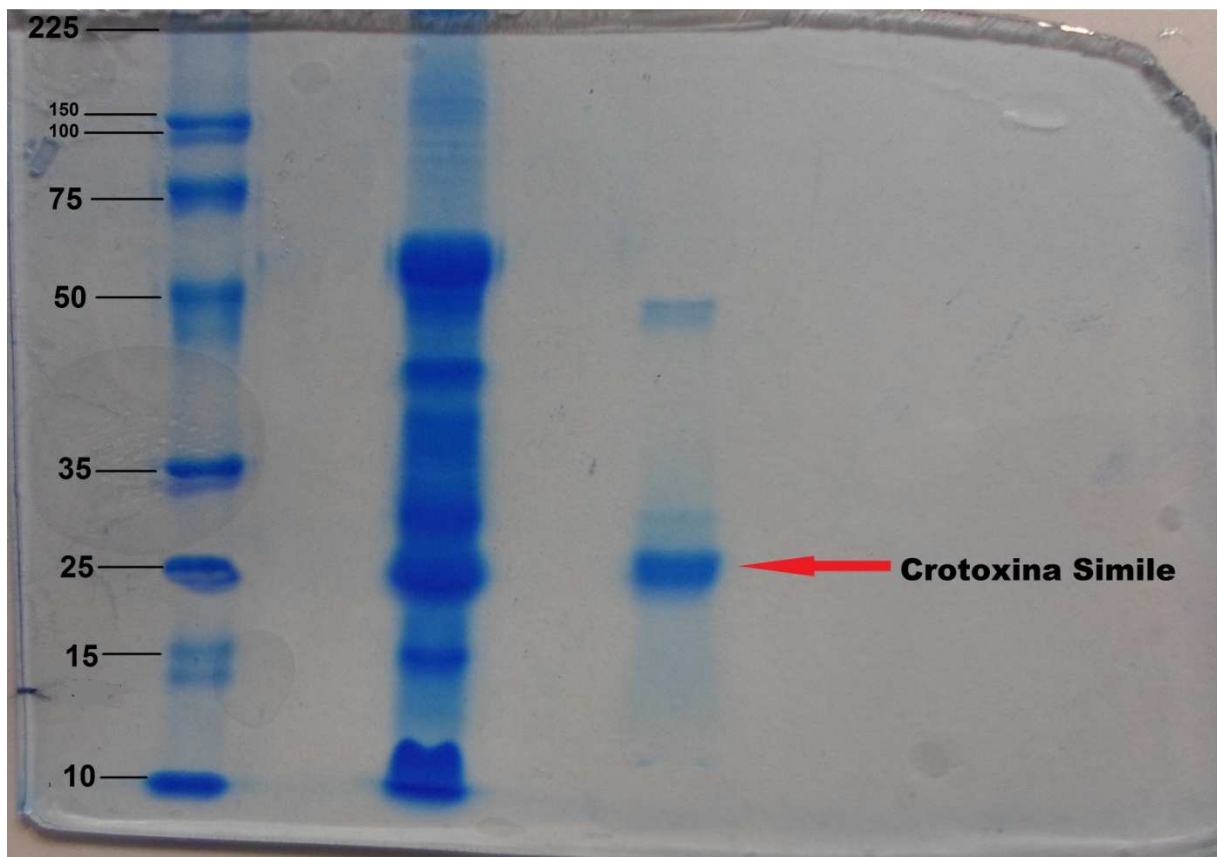


Figura 21- Gel SDS PAGE 15% do pico II coletado na troca anionica. Foram aplicados 20uL/poço de amostra. Seguindo a sequencia P=Padrão, Veneno *Crotalus vegrandis* e o Pico II.

Na figura 21 podemos observar a banda do pico II com aproximadamente 25 kDa o que nos sugere a crotoxina simile do veneno de *Crotalus vegrandis*.

4.15 Ensaio de Viabilidade celular da fração coletada na coluna Mono-Q.

4.15.1 Análise de Viabilidade da crotoxina símile do veneno de *Crotalus vegrandis*.

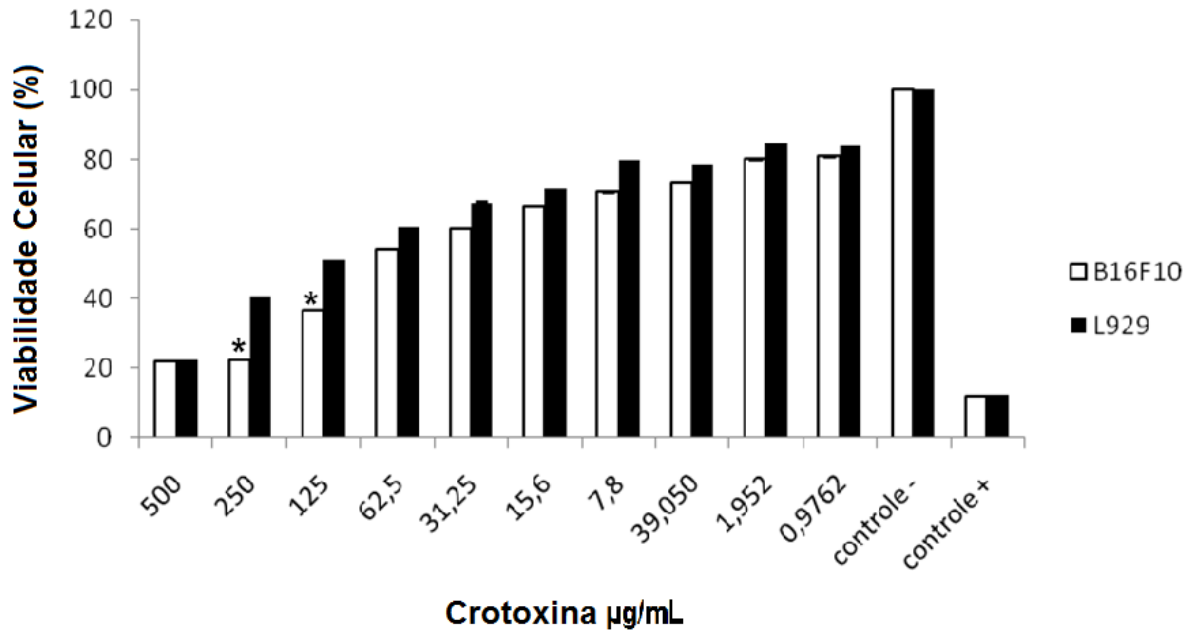


Figura 22- Atividade citotóxica da crotoxina símile purificada a partir do veneno de *Crotalus vegrandis* para as linhagens B16F10 (melanoma murino) e L929 (fibroblasto murino). (*) diferenças significativas ($p < 0,01$) comparando as concentrações testadas em B16F10 versus L929. Expostas por 48 horas.

As células foram incubadas com diferentes concentrações da crotoxina durante 48h a 37 °C e a viabilidade celular foi obtida por MTT. Houve uma inibição um pouco maior no crescimento celular na linhagem tumoral B16F10. (*) diferenças significativas ($p < 0,01$) comparando as concentrações testadas em B16F10 versus L929. Como controle positivo foi utilizado veneno de jararaca e como controle negativo apenas meio de cultura RPMI.

4.15.2 Avaliação da viabilidade celular

4.15.2.1 Sensibilidade das células B16F10 e L929 frente à crotoxina símile do veneno de *Crotalus vegrandis*.

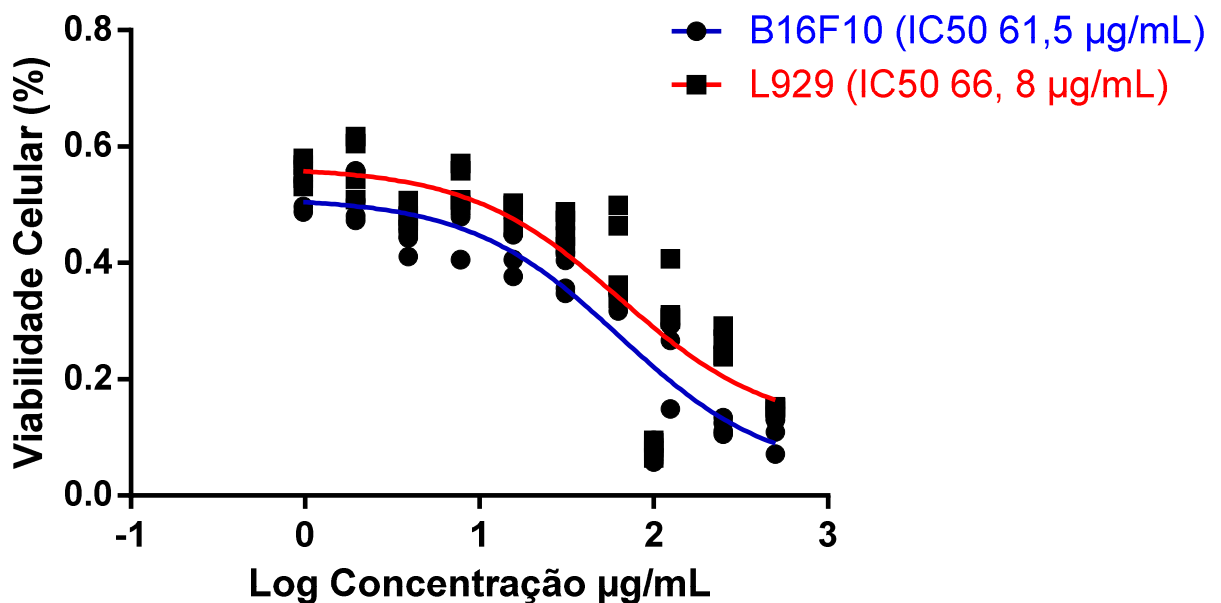


Figura 23- Curva de inibição de crescimento celular causado pela secreção cutânea bruta de *Crotalus vegrandis* e as doses mínimas efetivas que matam 50% das células (IC50) para B16F10 e L929.

A figura 23 mostrou uma leve atividade citotóxica para as linhagens de células B16F10 (melanoma murino) e L929 (fibroblasto murino). Ao se comparar as linhagens celulares foi observado que houve uma maior inibição do crescimento celular na linhagem B16F10 do que na L929, sendo as doses efetivas (IC50) 61,5 µg/mL e 66,8 µg/mL respectivamente. Estatisticamente não foram encontradas diferenças significantes na inibição do crescimento celular entre as linhagens testadas B16F10 e L929.

5. DISCUSSÃO

Há na literatura relatos sobre a capacidade de alguns componentes de veneno de diversos animais, tais como abelhas (Ferguson e Duncan, 2009) e serpentes (Calderon, *et al.*, 2014), de inibição, migração, proliferação e progressão de células tumorais *in vitro* e *in vivo*.

Inicialmente, a crotoxina interage com sítios de ligação altamente específicos na superfície celular (Montecucco *et al.*, 2008) envolvendo assim a atividade de fosfolipase juntamente com a crotapotina (Corin *et al.*, 1993), onde receptores do fator de crescimento epidermal (EGFR) são alvos da atividade da toxina, havendo um bloqueio do crescimento da célula. Assim, a crotoxina causa uma maior supressão do crescimento de células tumorais que apresentam maiores níveis de EGFR (Donato *et al.*, 1996).

Yan *et al.* (2006) demonstraram que há um colapso do potencial de membrana mitocondrial causado pela crotoxina, liberando citocromo-c que ativa a caspase-3 em células de leucemia mieloide crônica o que sugere que a morte das células é causada por apoptose.

Proteínas apoptóticas (metaloproteinases) de indução vascular 1 e 2 (VAP1 e VAP2) encontradas no veneno da cascavel *Crotalus atrox* são capazes de causar a morte apoptótica *in vitro*, mediada pelas integrinas $\alpha 3$ e $\beta 1$ e $\alpha 6$ e $\beta 1$ (Masuda *et al.*, 1998). Portanto, metaloproteinases podem inibir o crescimento de tumor interagindo com receptores integrinas e proteínas de adesão, abundantes em células tumorais.

A PLA₂ tem potencial no tratamento contra o câncer de mama, pois esta toxina apresenta seletividade para células que expressam altos níveis de EGFR. Porém, esta fosfolipase apresenta uma neurotoxicidade como efeito colateral, limitando seu uso. Ferguson e Duncan (2009) utilizando a PLA₂ proveniente do veneno de abelha conjugado com dextrina (PLA₂ (alfa-1,4 poli (D-glucose)) em células tumorais de melanoma murino (B16-F10), câncer cólon humano (HT29) e câncer de mama humano (MCF-7), não apresentou citotoxicidade para as células normais, mas somente para as células tumorais de todas as linhagens. A dextrina é conhecida clinicamente por não ser tóxica ou imunogênica (solução para diálise peritoneal).

Deseja-se uma maior especificidade do efeito citotóxico de uma crotoxina nas células tumorais, pois em um tratamento de câncer o objetivo é atingir somente as células tumorais com maior eficiência possível evitando-se assim danos aos tecidos saudáveis e qualquer outro efeito colateral.

Em estudos realizados por Paioli (2011) utilizando a crotoxina, a fosfolipase (PLA₂) e a crotapotina, do veneno da *Crotalus durissus terrificus*, em células L929 e B16F10, observaram-se uma diferença grande em relação à eficiência de atuação. Para doses baixas a crotapotina isolada não apresentou citotoxicidade e com a utilização da PLA₂ houve citotoxicidade. Entretanto, ambas as linhagens, B16F10 e L929 foram sensíveis ao efeito tóxico da proteína. Com o uso da crotoxina íntegra, verificou-se maior efeito citotóxico em células B16F10, em relação às células L929.

Yoshikura *et al.* (1966), observaram a ação do veneno bruto de *Trimeresurus flavoviridis* em culturas de células HeLa (células pulmonares de camundongo e de fibroblastos humanos) onde se verificou também que o veneno bruto provocou alterações morfológicas nas linhagens celulares, porém, sem promover a morte celular, e quando houve a remoção do veneno as células voltaram a crescer normalmente.

Com o objetivo de identificarmos a presença da crotoxina símile no veneno de *Crotalus vegrandis* foi realizado o ensaio imunoenzimático Dot Blot, utilizando como controle positivo o veneno da *Crotalus durissus terrificus*, e como controle negativo PBS, onde se observou a imunorreatividade da crotoxina símile da *Crotalus vegrandis* e suas respectivas subunidades (figuras 1, 2 e 3). Esses dados são compatíveis com os obtidos por Fucase (2011) que em seu trabalho também se verificou as semelhanças entre os venenos.

Para o isolamento da crotoxina símile do veneno de *Crotalus vegrandis* inicialmente foi realizado fracionamento em coluna de Exclusão Molecular (gel filtração) onde foram obtidos os picos de I a VII, sendo o pico IV o de maior intensidade (Figura 4), que, como descrito por Kaiser e Aird (1987), corresponde ao da crotoxina símile.

Para avaliar o grau de pureza da crotoxina símile foi feita a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% onde obtivemos a sua massa molecular, observados na figura 5 e 6 com bandas de aproximadamente 14 kDa, valores também compatíveis com os dados obtidos por Kaiser e Aird (1987), e o mesmo foi observado por Paioli

(2011), o que especifica este valor como sendo da PLA₂, principal neurotoxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Após essa etapa, as amostras dos picos foram coletadas e submetidas ao ensaio de Western Blot (Figura 7) onde, o pico IV, apresentou imunorreatividade ao anticorpo policlonal anti crotoxina, confirmando a presença de crotoxina, como observado por Fucase (2011). Posteriormente, a fração IV foi refracionada através da técnica de Cromatografia de Troca Aniônica, observado na figura 8, e os picos foram identificados como IV-I a IV-V, em seguida, as frações foram coletadas e congeladas. Este método purifica a crotoxina, no caso, a crotoxina símile, como feito por Kaiser (1987). E posteriormente foi realizado um SDS PAGE (Figura 9) com o objetivo de se verificar a pureza e a massa molecular.

Para o ensaio de citotoxicidade foi realizado a gel filtração (Exclusão Molecular) alterando-se o tampão de formiato de amônio para PBS pH 7,5 com este tampão se alcançam condições adequadas para a utilização em células.

Foi realizado a gel filtração para o veneno de *Crotalus vegrandis* e *Crotalus durissus terrificus* a fim de compararmos a citotoxicidade de ambas em células L929 e B16F10.

O tampão com formiato de amônio vêm sendo utilizado por diversos trabalhos, como por exemplo, os de Fucase (2011) e Paioli (2011), por ser padronizado. Porém, a substituição pelo tampão de PBS alterou apenas a formação de picos nos cromatogramas (Figuras 10 e 12) para ambos os venenos; a crotoxina símile foi localizada no Pico III após a corrida do SDS PAGE 15% (Figura 11), assim como já descrito por Kaiser (1987) para o veneno de *Crotalus vegrandis*.

Para medir as concentrações de cada pico foi realizada a quantificação protéica em Nanodrop, para que os picos de maior concentração fossem usados nos ensaios de citotoxicidade (Tabelas 1 e 2).

As células B16F10 e L929 foram expostas aos picos de maiores concentrações, sendo eles: Pico I, Pico II, Pico III e Pico IV, para ambos os venenos.

O menor efeito citotóxico em células L929 e maior eficiência citotóxica nas B16F10 foram observados no Pico III, tanto para o veneno de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus vegrandis*, sendo este o pico da crotoxina símile (Fosfolipase A₂), observados nas figuras 13 e 14.

Triggiani *et al* (2006) e Yan *et al* (2006) já mostraram indução de morte celular em diferentes linhagens de células, demonstrando a ação citotóxica da

crotoxina. Utilizando as mesmas linhagens de células já se verificou esta ação citotóxica, em Fucase (2011), onde a ação foi obtida utilizando outros picos do veneno da *Crotalus vegrandis*, e Paioli (2011) também observou ação citotóxica com a crotoxina da *Crotalus durissus terrificus*.

Comparando os picos com as maiores ações citotóxicas, o Pico III apresentou maior efetividade do que o pico II, mostrando-se capaz de diminuir a viabilidade celular de forma mais ativa sobre a população de células B16F10 do que sobre as células L929 (Figuras 15 e 16).

Os efeitos da crotoxina não se limitam aos ensaios *in vitro*. Ensaios *in vivo*, utilizando tecido de rato, mostraram diminuição tumoral em músculos (Salvini *et al* 2001; Miyabara *et al* 2004), em células peritoniais (Sampaio *et al* 2005), em endotélio (Lomonte *et al* 1999), em tecido neural (Dorandeu *et al*, 2002) e no pâncreas (Lloret and Moreno 1993). A ação citotóxica da crotoxina sobre células tumorais também foi relatada em humanos com câncer terminal, demonstrando uma diminuição significativa no tamanho dos tumores de próstata, gastrointestinal, mama, cabeça e pescoço (Cura *et al.*, 2002).

Com o intuito de testarmos a atividade do veneno bruto de *Crotalus vegrandis*, como controle, visto que não são raras as vezes que se observa lotes de venenos com algum tipo de processo de degradação e com sua atividade tóxica reduzida, realizamos ensaio com diluição seriada do veneno, partindo de uma quantidade de 200 µg/poço. Foi observado que com a diminuição da concentração de veneno, há uma redução da viabilidade celular, até atingir um maior efeito citotóxico na concentração de 6,3 µg/mL, valor próximo ao obtido por Paioli (2011), que usou diretamente a crotoxina da *Crotalus durissus terrificus* em células L929, e observou a maior atividade citotóxica em 7,81 µg/poço.

Nas fotomicrografias observamos as alterações morfológicas provocadas pela diluição de 12,5 µg/poço do veneno de *Crotalus vegrandis*, confirmadas na Figura 18.

Em concentrações menores que 6,3 µg/poço, o efeito citotóxico começa a diminuir abruptamente até não se obter quase nenhum efeito em concentrações de aproximadamente 1,6 µg/poço.

A concentração de 200 µg/poço não mostrou o maior efeito citotóxico sobre as células normais L929 (Figura 17). Acredita-se que a baixa citotoxicidade é devido

à presença de inibidores endógenos no veneno como o citrato, e tripeptídeos inibidores de metaloproteinases (Marques-Porto *et al.*, 2008).

Giron e pesquisadores, em 2005, realizaram testes com o veneno bruto de *Crotalus vegrandis* em ratos albinos com administração intraperitoneal, não mostrando qualquer alteração nos animais. Essa variação dos resultados pode ser justificada pela gama de componentes presentes no veneno, podendo induzir diversos efeitos.

Para o isolamento da crotoxina símile do veneno de *Crotalus vegrandis* foi necessário outro fracionamento. No teste realizado chamado gel filtração utilizou-se coluna Superdex 75 10/300 GL, previamente equilibrada Tris/HCl 50mM em pH 8,2. (Viala *et al.*, 2015). Nesse ensaio observaram-se os picos de I a III com o objetivo de isolar a crotoxina símile. O pico coletado I (Figura 19) foi submetido para a próxima etapa de Troca aniônica cujo tampão utilizado foi o mesmo da anterior, de gel filtração (Sampaio *et al.*, 2005). Coletou-se, então, o pico majoritário, o de interesse contendo supostamente a crotoxina símile do veneno de *Crotalus vegrandis* pico II. (Figura 20). Realizou-se o ensaio de gel SDS PAGE 15%, verificando-se o grau de pureza e a massa molecular, onde foi observada uma banda de aproximadamente 25 kDa (Figura 21), o que nos indica que seja a crotoxina símile do veneno de *Crotalus vegrandis*. A quantificação foi realizada em equipamento de Nanodrop e para o seu isolamento total utilizou-se a liofilização e em seguida a diálise.

Para o teste *in vitro* com células B16F10 e L929, as mesmas foram mantidas em cultura até o isolamento da crotoxina símile do veneno de *Crotalus vegrandis*. Em seu trabalho, Paioli (2011), realizou testes da crotoxina da cascavel brasileira *Crotalus durissus terrificus* com suas respectivas subunidades (Ácida e Básica) e com a crotoxina íntegra, onde se verificou no teste realizado em células B16F10 e L929, que somente a crotoxina íntegra com suas subunidades fez efeito significativo (Canziani *et al.*, 1983; Hendon and Conrat, 1971). Compreende-se, portanto, que ao se separar as subunidades, tal procedimento não traz nenhum resultado eficaz. (Toyama *et al.*, 2003; Chang and Su, 1997).

No presente trabalho, o ensaio de viabilidade celular de 48 horas (Figura 22) da crotoxina símile de *Crotalus vegrandis* com diluição seriada, obteve-se um resultado mais significativo em diluições de 250 e 125 µg/mL, quando o valor da viabilidade celular chegou a aproximadamente 60% para as células B16F10 e 20% para as células L929 na diluição de 250 µg/mL, e 50% para as células B16F10 e

20% para as células L929 na diluição de 125 µg/mL. Para as demais diluições a viabilidade celular para ambas as células mostraram resultados muito próximos, onde se conclui não haver nenhuma especificidade da crotoxina símile de *Crotalus vegrandis* para as células tumorais B16F10. Enquanto que o ensaio de Paioli (2011) com a crotoxina da *Crotalus durissus terrificus*, todas as diluições utilizadas no ensaio de 48 horas obtiveram resultados eficientes. Em relação às diluições de 250 e 125 µg/mL obteve-se de viabilidade celular aproximadamente 60% e 10% para as células B16F10 e L929 respectivamente, em ambas as diluições.

Na figura 23, o gráfico de viabilidade celular, demonstrou uma pequena diferença na ação da Crotoxina símile sobre a curva de crescimento das células B16F10 e L929.

Podemos sugerir que a crotoxina símile de *Crotalus vegrandis* foi ineficiente no tratamento para de células tumorais, pois não mostrou uma característica de seletividade em relação às células tumorais B16F10, atuando de forma muito parecida na morte de células normais L929.

A crotoxina símile não foi eficiente para diminuir a viabilidade e o crescimento celular das células tumorais B16F10 de forma específica, como os trabalhos descritos na literatura para a atividade da crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* sob esse mesmo modelo. Essa diferença significativa apresentada na atividade desses dois componentes pode estar relacionada com as diferenças estruturais presentes na composição molecular de cada um deles. O fato de que o veneno de *C. vegrandis* apresentar componentes com porções C e N-terminais com altos índices de homologia estrutural em relação à fração básica da crotoxina (PLA2 de *C. durissus terrificus*), não necessariamente indica que essas duas moléculas irão apresentar a mesma atividade biológica, visto que a estrutura primária da Crotoxina símile ainda não é conhecida, portanto, as diferenças na sequência dessas moléculas podem ser um fator determinante para que as mesmas apresentem atividades distintas sobre o mesmo modelo (Viala *et al*, 2015).

6. CONCLUSÃO

Os venenos de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus vegrandis* apresentaram uma significativa identidade imunológica.

O fracionamento dos venenos de *Crotalus vegrandis* e *Crotalus durissus terrificus*, demonstraram efeito citotóxico sobre as linhagens celulares B16F10 e L929, onde foi observada uma maior toxicidade da fração III de *Crotalus vegrandis* sobre as células tumorais B16F10.

As análises por Dot blot e SDS PAGE nos levam a identificação de uma proteína crotoxina símile.

A crotoxina símile isolada do veneno de *Crotalus vegrandis* apresentou atividade citotóxica mais significativa na linhagem celular tumoral B16F10 do que na L929, após 48 horas em concentrações de 250 e 125 ug/mL.

7. BIBLIOGRAFIA

ABBAS, A.K.;KUMAR, V.;FAUSTO, N.;**Patologia: bases patológicas das doenças**. 7. Ed. Rio de Janeiro: ELsevier; p. 1616, 2005.

ADAM JK, ODHAV B, BHOOLA KD. Immune responses in câncer.**Pharmacology and Therapeutics**.V.1, p.1-20, 2003.

ALTIERI DC, The molecular basis and potential role of survival in cancer diagnosis and therapy. **Molecular Medicine**.V.12, p.1-6, 2001.

ANDREEFF M, GODHICH DH, PARDEE AB. Cancer Biology: cell proliferation, differentiation and apoptosis. In: Bast RC, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Hollana JF, Frei E, Gansier TS. **Cancer Medicine**. 5th ed. Canada: BC Decker Inc; 2000.

AZEVEDO MARQUES, M.M.;CUPO, P.; HERING, S.E. **Plantas venenosas e animais peçonhentos**-Samuel Schvartsman. Rio de Janeiro, 1992.

BOHN I, SCHILD H. Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. **Molecular Imaging and Biology**.V.5, p.2-14, 2003.

BON, C.; CHANGEUX, J.P.; JENG, T.W.; FRAENKEL-CONRAT, H. Postsynaptic effect of crotoxina and its isolated subunits.**Eur. J. Biochem**, v.99, p.81-471, 1979.

BOLD, R.J.; TERMULEN, P.M, MACCONEY, D.J.; **Apoptosis, cancer and cancer therapy**.**Surgical Oncology**. V. 6, p.133-42,1997.

BJARNASON,J.B.;FOX, J.W.; Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacologic & Therapeutics**, v. 62, p. 325-372, 1994.

BUNZ F. **Cell death amd cancer therapy**.**Current Opinion in Pharmacology**.V.1, p. 337-41, 2001.

BLAGOSKLONNY MV. Apoptosis, proliferation, differentiation: in search of order. **Cancer Biology**. V.13, p.97-105, 2003.

BRASILEIRO FILHO, G.; GUIMARÃES, R. C. BOGLIOLO,; L. **Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular**. In: BRASILEIRO FILHO, G. BOGLIOLO. Patologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6ªed. p. 149-193, 2000.

CALDERON, L.A.; SOBRINHO, J.C.; ZAQUEO, K.D.; MOURA, A.A.; GRABNER, A. N.; MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; NOMIZO, A. FERNANDES.; C.C.F.; ZULIANI, J. P.; CARVALHO, B.A.M.; SILVA, S. L.; STABELI, R.G.; SOARES, A.M. **Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy**. Hindawi.p. 19. 2014.

CANZIANI, G.; SEKI, C.; VIDAL, C.J. The mechanism of inhibition of phospholipase activity of crotoxin B by crotoxin A. **Toxicon**.V.21, p. 663-674, 1983.

CORIN, R.E.; VISKATIS, L.J.; VIDAL, J.C.; ETCHEVERRY, M.A. **Cytotoxicity of crotoxin on murine erythroleukemia cells *in vitro***. **Investigational New Drugs**. V.11, p.5-11, 1993.

COSTA, L. A.; MILES, H.; ARAUJO, C. E.; GONZALEZ, S.; VILARRUBIA, V. G.; Tumor regression of advanced carcinomas following intra-and/or peri-tumoral inoculation with VRCTC-310 in humans: preliminary report of two cases. **Immunopharmacology immunotoxicology**. V.20, p. 15-20,1998.

COTRANS RS, KUMAR V, COLLINS T. ROBBINS **patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; v. 14, p.93-233, 2000.

CURA, J.E.; BLANZACO, D.P.; BRISSON, C. CURA.; M.A.; CABROL, R.; LARRATEGUY, L.; MENDEZ, C.; SECHI, J.C.; SILVEIRA, J.S.; THEILLER, E.; DE ROODT, A.R.; VIDAL, J.C. Phase I and pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA(2), NSC-624244) in patients with advanced cancer. **Clinical cancer Research**, v.8, p. 1033-1041, 2002.

CHANG, C.; SU, J, M. The mechanism of potentiation of the pre-synaptic effect of phospholipase A2 by the crotoxin component of the crotoxin complex. **Toxicon**. V. 16, p. 402-405, 1977.

CUSHMAN, D., W., ONDETTI, M., A., History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension**, v.17, p.589- 592, 1991.

CURY, I.; PICOLO, G.; KONNO, K.; GIORGI, R. BRIGATE.; P, GUTIERREZ.; V, CAMARGO. A. **Analog compounds of analgesic peptides derived from the venom of *Crotalus durissus terrificus* snakes. Their uses compositions**

methods of preparation and purification. United States Patent Application Publication, 2009.

DANEN, E. H. J.; MARCINKIEWICZ, C.; CORNELISSEN, I. M. H. A.; VAN KRAATS, A. A.; PACTER, J. A.; RUITER, D. J.; NIEWIAROWSKI, S.; VAN MUIJEN, G. N. P. The disintegrin eristostatin interferes with integrin $\alpha 4\beta 1$ function and with experimental metastasis of human melanoma cells, **Experimental cell research**, v. 238, p. 188-196, 1998.

DENNIS, E. A. Diversity of group types regulation and function of phospholipase A2. **Journal of biological chemistry**. V. 269, p. 60-13057, 1994.

DE VITA, HELLMAN and ROSENBERG`S, **Cancer: Principles & Practices of Oncology**. 7^{ed}, p.7-13, 2005.

DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cellular and molecular life science**, v.71, p. 66-2851, 2009.

DORANDEU, FREDERIC.; HESTERS, REMI.; GIRARD, FABIEN.; FOUR, ELISE.; FOQUIN, ANNIE.; BON, CASSIAN.; LALLEMENT, GUY.; FAURE, GRAZYNA. Inhibition of crotoxin phospholipase A2 activity by manoalide associated with inactivation of crotoxin toxicity and dissociation of the heterodimeric neurotoxic complex. **Biochemical pharmacology**, v.63, p. 755-761, 2002.

DONATO, N.J.; MARTIN, C.A.; PEREZ, M.; NEWMAN, R.A.; VIDAL, J.C.; ETCHEVERRY, M. Regulation of epidermal growth factor receptor activity by crotoxin, a snake venom phospholipase A2 toxin: a novel growth inhibitory mechanism. **Biochem Pharmacol**. V. 51, p. 43-1535, 1996.

DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v.40, p. 659-665, 2002.

FUCASE, T. M. **Estudo o veneno de *Crotalus vegrandis* e suas frações com atividade antitumoral**. 2011. Dissertação (mestrado), Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo-SP.

FERGUSON, E.L.; RICHARDSON, S.C.W.; DUNCAN, R. Studies on the mechanism of action of dextrin-phospholipase A2 and its suitability for use in combination therapy. **Molecular pharmaceutics**. V. 7, p. 21-510, 2010.

FIDLER, I.J. Selection of successive tumor lines for metastasis. **Nature new biology**. V. 242, p. 9-148,1973.

FOROUHAR, F.; HUANG, .N.; LIU, J. H.; CHIEN, K. Y.; WU, W. G.; HSIAO, C. D. Strutral basis of membrane-induced cardiotoxin A3 oligomerization. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, p. 21980-21988, 2003.

FRANKLIN C.C, KREJSA CM, PIERCE R, WHITE C.C, FAUSTO N, KAVANAGER JJ. Caspase 3 dependent cleavage of the glutamate-L cysteine ligase catalytic subunit cleaning apoptotic cell death.**American Journal of Pathology**.V.160, p.94-1887, 2002.

MARÍA, E.; GIRÓN; IRMA AGUILAR; LISANDRO ROMERO; ELDA E. SÁNCHEZ; JOHN C. PÉREZ; ALEXIS RODRIGUEZ-ACOSTA. A low-cost method to test cytotoxic effects of *Crotalus vegrandis* (Serpentes: Viperidae) venom on kidney cell cultures. Rev. Inst. **Med. trop. S. Paulo**. v. 47, p. 1678- 9946, 2005.

GRUBER C, HEUKEL M BUDASH W, BELKA C, JENDROSSEK V. Involvement of tyrosine kinase p56/ LCK in apoptosis induction by anticancer drug. **Biochemical Pharmacology**. V. 20, p. 1-14. 2004.

HENDON, A, R.; CONRAT, F. Biological roles of the two components of crotoxin.**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**.V. 68, p. 1560-1563, 1971.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA) [homepage on the internet]. Disponível em:<http://www.inca.gov.br>. [2013 jan 07]

JUBB KV, KENNEDY NC. **Transmissible veneral tumor canine**.**Patology of Domestic Animals**. V. 3, p.452, 1993.

KAISER, I.;I.AIRD, S.D.A, crotoxin homolog from the venom of the Uracoan rattlesnake (*Crotalus vegrandis*). **Toxicon**, v.25, p.1113-1120, 1987.

KAMIGUTI, A.S., ZUZEL, M.,THEAKSTON,R.D.G.,Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.853-862, 1998.

KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**. V.26, p.57- 239, 1972.

KIRKIN V, JOOS S, ZORNING M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1664, p. 49-229, 2004.

KOUYOUNDJIAN, J.A., HARRIS, J.B., JOHNSON, M.A., Muscle necrosis caused by the subunits of crotoxin. **Toxicon**, v. 24, p.575-583, 1986.

LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p. 680-685, 1970.

LEYTIN V, FREEDMAN J. Plated apoptosis instored plated concentrates and other models. **Transfusion and Apheresis Science**. V. 28, p.285-95, 2003.

LEHNINGER AL. **Princípios de bioquímica**. 6. ed. São Paulo: Sarvier; 1232, 2004.

LOMONTE, BRUNO.; ÂNGULO, YAMILETH.; RUFINI, STEFANO.; CHO, WONHAWA.; GIGLIO, JOSE ROBERTO.; OHNO, MOTONARI.; DANIELLE, JOSE JULIAN.; GEOGHEGAN, PATRICIA.; GUTIERREZ, JOSE MARIA. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A2 on mouse endothelial (tEND) and skeletal muscle (C2C12) cell *in vitro*. **Toxicon**, v.37, p.145-158, 1999.

LLORET, S; MORENO, J.J. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A2 purified from porcine pancreas and snake venoms. **Toxicon**, v. 31, p. 949-956, 1993.

LOWE SW, LIN AW. **Apoptosis in cancer.Carcinogenesis**, v21, p. 95-485, 2000.

MALICH, G., MARKOVIC,B., WINDER, C., The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the *in vitro* cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. **Toxicology**, v.124, p. 179-192, 1997.

MARKLAND, F.S.; Snake venom and hemostatic system. **Toxicon**, v.36, p. 1749-1800, 1998.

MARQUES-PORTO.R, LEBRUM. I, PIMENTA. D.C, Self-proteolysis regulation in the *Bothrops jararaca* venom: The metallopeptidases and their intrinsic peptidic inhibitor. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.147, p.424-433, 2008.

MASUDA, S.; HAYASHI, H. ARAKI. S. Two vascular apoptosis-inducing proteins from snake venom are members of the metalloprotease/desintegrin family. **European Journal Biochemistry**, v.253, p.36-41, 1998

MERCATANTE DR, MOHLER, JL, KOLE R. Cellular response to an antisense-mediated shift of Bcl-x pre-mRNA splicing and antineoplastic agents. **The Journal of Biological Chemistry**. v277, p.82- 49374. 2002.

MIYABARA, E.H.; TOSTES, H.S.; SELISTRE-DE-ARAUJO, M.S.; AOKI, A.S.; MORISCOT, A.S. Role of nitric oxide in myotoxic activity induced by crotoxin *in vivo*. **Toxicon**, v.43, p. 425-432, 2004.

MILLER AJ, MIHM MC. Mechanisms of disease: melanoma. **The New England Journal of Medicine**.v.355, p. 51-65, 2006.

MOFFATY J, HASHIMOTO M, KOJIMA A, KENNED DO, MURAKAMI A, KOSHIMIZY K, OHIGASHI H, YUASA IM. **Apoptosis induced by acetaxychavicol acetate in Erlich ascites tumor cells is associated with modulation**. **Carcinogenesis**.v. 21, p. 7-2151, 2000.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J.M, LOMONTE, B.; Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cellular and molecular life science**. V.65, p. 912-2897, 2008.

MONTEIRO, R.Q.; ZINGALI, R. B.; Bothrojacin a proexosite I ligand inhibits factor Va-accelerated prothrombin activation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.87, p. 288-293, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. V. 65, p. 55-63, 1983.

NEWMAN, R. A.; VIDAL, J. C.; VISKATIS, L. J.; JOHNSON, J.; ETCHVERRY, M. A. VRCTC-310 A novel compound of purified animal toxins separates antitumor efficacy from neurotoxicity. **Investigational new drugs**. V. 11, p. 9-151, 1993.

OWNBY, C. L.; CAMERON, D.; JU, A.T. Isolation of myotoxic component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. Electron microscopic analysis of muscle damage. **The American Journal of Pathology**, v. 85, p. 149-166, 1976.

PAIOLI, F. S.; **Efeito citotóxico da crotoxina em células de melanoma murino e fibroblastos**. 2011. Dissertação (mestrado), Universidade de São Paulo, Instituto e Ciências biomédicas. São Paulo-SP.

POMERANTZ, J.; SCHREIBER-AGUS, N.; LIÉGEOIS, N.J.; SILVERMAN, A.; ALLAND, L.; CHIN, L.; POTES J.; CHEN, K.; ORLOW, I.; LEE, H.W.; CORDON-CARDO, C.; PINHO, R.A. **The Ink4a Tumor Suppressor Gene Product, p19Arf, Interacts with MDM2 and Neutralizes MDM2's Inhibition of p53**. **Cell**. V.6, p. 23-713, 1998.

PULIDO-MENDEZ, M.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A.; FINOL, H.; AGUILAR, I.; GIRÓN, M. E., **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v.31, p.555-561, 1999.

RAIS B, COMING B, PUIGJANER T, BRNDERS JL, CRYPPY E, SABOUREAU D. Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a G1 phase cycle arrest in Ehrlich tumor cells through inhibition of the glucose cycle. **Cancer letters**. V. 456, p. 113-8, 1999.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., MOORE, P.K. **Farmacologia**, 5ª ed. cap 32, p. 527-540, 2004.

REED JC, WARNER L. Mechanisms of apoptosis. **American Journal of Pathology**. V. 57, p. 30-1415, 2000.

RICOTTI, C.; BOUZAR, I N., AGADI, A., COCKERELL, C.J. Malignant skin neoplasms. **Medical Clinics of North America**. V. 93, p. 64-1241, 2009.

RIZZO, M. T.; NGUYEN, E.; ALDO BENSON, M.; LAMBEAU, G. Secreted phospholipase A2 induces vascular endothelial cell migration. **Blood**. V. 96, p. 15-3809, 2000.

RODRIGUEZ-ACOSTA, A.R., AGUILAR, I., GIRÓN, M., PULIDO, V.R., Haemorrhagic Activity of Neotropical Rattlesnake (*Crotalus vegrandis* Klauber, 1941). **Venom Natural Toxins**, v.6, p.15-18, 1995.

ROTHER J, JONES D. Molecular markers of tumor progression in melanoma. **Current Genomics**.v.10, p.9- 231, 2009.

SALVINI, T.F., AMARAL, A.C., MIYABARA, E.H., TURRI, J.A.O., DANELLA, H.S., SELISTRE DE ARAUJO, H.S. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. **Toxicon**, v.39, p. 1141-1149, 2001.

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

SAMPAIO,S.C.,HYSLOP,S.,FONTES,M.R.M.,PRADO.;FRANCESCHI,J.ZAMBELLI, V.O.,MAGRO,A.J.,BRIGATTE,P.,GUTIERREZ,V.P.,CURY,Y.Crotoxin:Novel activities for a classic b-neurotoxin. **Toxicon**, v.55, p.1045-1060, 2010.

SANTOS, M. M. V.; SANTANA, C. D.; GIGLIO, J. R.; DA SILVA, R. J.; SAMPAIO, S.; SOARES, A. M.; FECCHIO, D.; Antitumoral effect of na L-amino acid oxidase isolated from *bothrops jararaca* snake venom. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 102, p. 533-542, 2008.

SAMPAIO, S. C.; HYSLOP, S.; FONTES, M. R. M.; FRANCESCHI, J. P.; ZAMBELLI, V. O.; MAGRO, A. J.; BRIGATTE, P.; GUTIERREZ, V. P.; CURY, Y. Crotoxin novel activities for a classic b-neurotoxin. **Toxicon**. V. 55, p. 60-1045, 2010.

SARASIN M. **An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis**.Reviews in Mutation Reseach. v..544, p. 99-106, 2003.

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**. V. 16, p. 92-480, 2010.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A.The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system.**Biochim biophys acta**. V. 1761, p. 59-1246, 2006.

SHIMADA K, MATSUYOSHI S, NAKAMURA M, ISHIDA E, KISLI M, KONISHI N. **Phosphorylation of FADD is critical for sensityve to anticancer drug-induced apoptosis**. Carcinogenesis.v. 2, p. 97-1089, 2004.

SHIMOKAWA, K.; JIA, L. G.; WANG, X. M.; FOX, J. W.; Expression, activation and processing of the recombinant snake venom metalloproteinase proatrolysin e. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 335, p. 283-294, 1996.

SUHR, S.M, KIM. D.S, Comparasion of the apoptotic pathways induced by L-aminoacid oxidase and hidrogen peroxide. **Journal of Biochemistry** (Tokyo), v.125, p.305-309, 1999.

SLOTTA, K.H.; FRANKEL-CONRAD, H.; **Estudos químicos sobre venenos ofídicos**. Memórias do Instituto Butantan. 1938.

TAKEDA, A.K.; BARBOSA, S.F.C.; COSTA, L.M.; ADELINO, M.G.F. **Fracionamento do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por cromatografia de exclusão molecular**. Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.27, p. 22-115, 1985.

TOYAMA, H, M.; OLIVEIRA, G, D.; BERIAM, S, O, L.; NOVELLO, C, J.; SIMIONI, R, L.; MARANFONI, S. Structural enzymatic and biological properties of new PLA2 isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**. V. 41, p. 1033-1038, 2003.

TSETLIN, V. I.; HUCHO, F.; Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. **FEBES Letters**, v. 557, p. 9-13, 2004.

TRIGGIANI, M.;GRAMATA, F.; FRATTINI, A.; MARONE, G. Activation of human inflammatory cell by secreted phospholipase A2. **Biochimica et biophysica acta**, p. 1289-1300, 2006.

THOMPSON, A., BRENNAN, K., COX, A., GEE, J., HARCOURT, D., HARRIS, A., HARVIE, M., HOLEN, I., HOWELL, A., NICHOLSON, R., STEEL, M., STREULI, C.; **Evaluation of the current knowledge limitations in breast cancer research - a gap analysis**. Breast Cancer Research v.10, 2008.

YAMADA, D.; SHINA, Y.; MORITA, T. Nucleotide sequence of a cDNA encoding a common precursor of disintegrin flavostatin and hemorrhagic factor HR2a from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. **FEBES Letters**, v. 451, p. 299-302, 1999.

YAN, C.H, LIANG, Z.Q.; GU, Z.L.; YANG, Y.P.; REID, P.; QIN, Z.H. Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to Crtx-induced death of K562 cells. **Toxicon**. 47: 521-30, 2006.

YIM HW, SLEBOS RJC, RANDALL SH, UMBACH DM, PARSONS AM, RIVERA MP, DETTERBECK FC, TAYLOR JA. Smoking is associated with increased telomerase activity in short-term cultures of human bronchial epithelial cells. **Cancer Letters**.v,246, p.24-33, 2007.

YOSHIKURA, H.; OGAWA, H. OHSAKA, A.; OMORI-SATOH, T, Action of *Trimeresurus flavoviridis* venom and partially purified hemorrhagic principles on animal cells cultivated *in vitro*. **Toxicon**.V.4, p.183-190, 1966.

VERHEIJ, H. M.; BOFFA, M. C.; TOTHEIN, C.,BRICKAERT, M.; VERGER, R.; HASS, G. H. Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A2.**European Journal Biochemistry**, v. 112, p. 25-32, 1980.

VIALA, L.V.; HILDEBRAND, D.; FUCASE, M, T.; SCIANI, M. J.; NETO, P, P.J.; RIEDNER, M.; SANCHES, L.; NISHIMURA, J, P.; OGUIURA, N.; PIMENTA, C, D.; SCHLUTER, H.; BETZEL, C.; ARNI, K, R.; SPENCER, J, P. Proteomic analysis of the rare Uracoan rattlesnake *Crotalus vegrandis* venom: Evidence of a broad arsenal of toxins. **Toxicon**.V.107, p. 234-251, 2015.

VORHERR H. Adjuvant chemotherapy of breast cancer: Hope – Reality – Hazard? **Journal of Molecular Medicine**.v.62, p. 61-149, 1984.

ZHIVOTOVSKY B, ORRENIUS S. Apoptosis and cancer: where are and where to go. **Cancer Biology**.v.13, p.5- 93, 2003.