

**Fernanda Somma Paioli**

Efeito Citotóxico da Crotoxina em Células de  
Melanoma Murino e Fibroblastos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo  
2011

**Fernanda Somma Paioli**

**Efeito Citotóxico da Crotoxina em Células de Melanoma  
Murino e Fibroblastos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora:  
Dra. Ruth Camargo Vassão

Versão corrigida

São Paulo  
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Paioli, Fernanda Somma.

Efeito citotóxico da crotoxina em células de melanoma murino e fibroblastos / Fernanda Somma Paioli. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Ruth Camargo Vassão.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Toxinologia.

Versão do título para o inglês: Cytotoxic effect of crotoxin on murine melanoma cells and fibroblasts.

Descritores: 1. Neoplasias 2. Melanoma 3. Fosfolipase  
4. Crotoxina 5. Ciclo celular 6. I. Vassão, Ruth Camargo II.  
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.  
Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB02/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
**Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia**  
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a):                      Fernanda Somma Paioli.

Título da Dissertação:            Efeito citotóxico da crotoxina em células de melanoma murino e fibroblastos.

Orientador(a):                    Ruth Camargo Vassão.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,  
em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**                       **Reprovado(a)**

Examinador(a):            Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):            Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                    Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO BUTANTAN

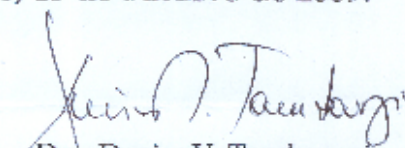
Av. Vital Brazil, 1500, CTP (15503-910), São Paulo, SP, Brazil  
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito antitumoral da crotoxina em melanoma murino", **protocolo nº 645/09**, sob a responsabilidade de Ruth Camargo Vassão e Alessandra Cavalcanti Duarte Lupi, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **13/10/2009**.

Vigência do Projeto: 09/2009 – 08/2011	Nº de animais/espécie
Laboratório Biologia Celular	50/camundongos C57BL/6(Macho)

São Paulo, 15 de outubro de 2009.

  
Dra. Denise V. Tambourgi  
Presidente da CEUAIB

De acordo:

  
Dr. Otávio Azevedo Mercadante  
Diretor do Instituto Butantan

A Deus, aos meus pais Artur e Lucila, aos meus irmãos Silvia, Antônio e Mariana e aos meus sobrinhos Artur, Eduardo, Francisco e Maria Clara. Amo todos vocês!

# Agradecimentos

No decorrer da realização deste trabalho, contei com a colaboração direta ou indireta de várias pessoas. Seria impossível a conclusão desta jornada sem o envolvimento destas pessoas:

Primeiramente a Deus, pela vida e por me abençoar todos os dias.

Aos meus pais e à minha família que nunca deixam de me apoiar. Pelo carinho nos momentos de dificuldade.

À Dra. Ruth Camargo Vassão e ao Dr. Patrick Jack Spencer pela oportunidade oferecida, pela disponibilidade e paciência em me orientar.

Ao Dr. Wilson Fernandes do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan pela disposição do veneno utilizado neste trabalho.

Ao Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes e seu aluno Welbert Oliveira Pereira do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Imunologia da USP, pela grande ajuda, disponibilização de tempo, laboratório e de materiais.

Aos Laboratórios de Imunopatologia e de Genética do Instituto Butantan, e ao Laboratório de Biotecnologia do IPEN, pela acolhida e por disponibilizar espaço e equipamentos.

Às Dras. Maisa Splendore Della Casa, Sandra Coccuzzo Sampaio e Adriana da Costa Neves pelos esclarecimentos.

Aos colegas e amigos, Adriana (Dro), Fê Sakai, Cícera, Andrea, Janaina, Eric, Losanges, Alessandra, Pedro (Perereca), Gal, Heloisa, Natália, Vanessa, Simone, Bárbara.

Aos funcionários dos laboratórios de Imunopatologia, Genética e Biologia Celular do Instituto Butantan e do Laboratório de Biotecnologia do IPEN.

Aos funcionários da secretaria do programa de pós-graduação em Biotecnologia.

Aos funcionários da biblioteca do ICB.

O único homem que está isento de erros, é  
aquele que não arrisca acertar.

Albert Einstein



## Resumo

Paioli FS. Efeito citotóxico da crotoxina em células de melanoma murino e fibroblastos. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A crotoxina é a toxina mais abundante e ativa do veneno da cascavel brasileira *Crotalus durissus terrificus*. Foi descrita como uma neurotoxina envolvida no bloqueio pré-sináptico das junções neuromusculares. É uma proteína heterodimérica formada por uma unidade ácida (crotopotina) sem atividade enzimática, ligada à subunidade básica (PLA2) que possui de baixa toxicidade. No entanto, o heterodímero demonstra alta toxicidade, atribuída à interação entre a subunidade ácida que age como uma chaperonina e a básica que age como uma fosfolipase A2. Alguns autores atribuíram à esta toxina um efeito citotóxico e sugeriram seu uso como um agente terapêutico contra células tumorais. No presente trabalho, foi investigado o efeito citotóxico da crotoxina em células de melanoma murino (B16-F10) e fibroblastos (L929). As células foram tratadas com concentrações crescentes (partindo de 0,339 nM até 21,74 nM) de crotoxina por períodos de 6, 24 ou 48 horas. A viabilidade celular foi avaliada com ensaio de MTT. Estes ensaios foram repetidos com as subunidades da crotoxina em concentrações na proporção molar destas na molécula inteira. Os resultados dos ensaios de 48 horas mostraram que a crotoxina é altamente tóxica para as células de B16-F10 induzindo a morte celular até em concentrações mais baixas enquanto a linhagem L929 foi afetada somente em concentrações bem maiores. Os ensaios de 6 e 24 horas mostraram que o efeito citotóxico na linhagem B16-F10 foi verificado somente quando utilizaram-se as maiores concentrações da toxina, enquanto nenhuma morte celular foi observada na linhagem L929. Os ensaios com as subunidades demonstraram que a PLA2 é menos efetiva sem o carreador (crotopotina), e também que não houve efeito citotóxico nas células tratadas somente com a crotopotina. Estes resultados possibilitaram o cálculo da EC50% da crotoxina para ambas as linhagens sendo 0,08138 nM para a B16F10 e 6,91 nM para a L929.

Palavras-chave: Crotoxina. Fosfolipase A2. Tumor. Melanoma. Efeito citotóxico.

## Abstract

Paioli FS Cytotoxic effect of crotoxin on melanoma cells and fibroblasts. Master thesis (Biotechnology). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Crotoxin is the most abundant and active toxin from the venom of the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. It has been described as a neurotoxin involved in pre-synaptic blockade of neuromuscular junctions. Some authors have also attributed to this toxin a direct cytotoxic effect, and have suggested its use as a therapeutical agent against tumoural cells. In the present work, we investigated the cytotoxicity of crotoxin on melanoma cells (B16-F10) and on fibroblasts (L929) cells. Cells were incubated with increasing concentrations of crotoxin, (ranging from 0,339 nM to 21,74 nM). After 6, 24 or 48 hours, the cells viability was determined using an MTT based assay. These assays were repeated with the crotoxin subunits, using the molar ratios of the entire toxin. Our results for the 48 hours assays indicate that crotoxin is highly toxic to the B16-F10 cells inducing cell death even at the lowest concentration while the fibroblast were only affected with the higher concentrations. The 24 hours assays indicate that the cytotoxic effect is not immediately observed, since no detectable changes were observed for the concentrations that induced cell death in the longer lasting experiment. However, at high concentrations some loss of cell viability was observed only on the B16-F10 cells. The subunits assays showed a lower cytotoxic effect for PLA2 demonstrating the importance of the acidic subunit (crotaopotin) for the cytotoxicity. There was no cytotoxic effect on cells treated with crotaopotin. The EC50% values for crotoxin on both cell lines was determined being 0,08138 nM for B16-F10 strain and 6,91 nM for L929.

Key words: Crotoxin. Phospholipase A2. Tumor. Melanoma. Cytotoxic effect.

## Lista de Figuras

Figura 1 -	Representação esquemática do ciclo celular de mamíferos ....	21
Figura 2 -	Primeiro passo para purificação da crotoxina .....	49
Figura 3 -	Segundo passo para purificação da crotoxina .....	50
Figura 4 -	Cromatograma da separação das subunidades .....	51
Figura 5 -	Curva padrão de BSA .....	52
Figura 6 -	SDS – PAGE da crotoxina .....	53
Figura 7 -	Micrografia das células B16-F10 - controle e tratadas com crotoxina .....	56
Figura 8 -	Micrografia das células L929 – controle e tratadas com crotoxina.....	57
Figura 9 -	Grupo 01 - viabilidade das células B16-F10 e L929 após incubação com crotoxina .....	58
Figura 10 -	Grupo 02 viabilidade das células B16-F10 e L929 após incubação com PLA2 .....	60

## Lista de Tabela

Tabela 1 - Valores da função da curva de BSA .....	52
--	----

## Lista de abreviaturas e siglas

ATCC	“Americam Type Cell Collection”
Bad	Promotor de morte associado a Bcl-2
Bak	Antagonista homólogo de Bcl-2
Bax	Proteína X associada a Bcl-2
BCL-2	B- Linfoma celular 2
BSA	Albumina sérica bovina
Ca <sup>++</sup>	Cálcio
CDK	Quinase dependente de ciclina
CK	Creatina Quinase
Da	Daltons
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC50	Dose efetiva para 50% da população de células
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFr	Receptor de fator de crescimento epidermal
Fas	Família de receptor de morte celular
FPLC	“Fast Protein Liquid Cromatography”
INCA	Instituto nacional do câncer
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitros
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
PLA2	Fosfolipase A2
PM	Peso molucular
Proteína Rb	Proteína do retinoblastoma
Ras	Família denominada Ras – identificada em vírurus causador de sarcoma em ratos
SDS/PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	17
1.1	Câncer	17
1.2	Ciclo celular	20
1.3	Morte celular	23
1.3.1	<i>Necrose</i>	24
1.3.2	<i>Apoptose (morte celular programada)</i>	24
1.4	Câncer de pele	28
1.4.1	<i>Células B16-F10</i>	29
1.5	A peçonha da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	30
1.5.1	<i>Crotoxina</i>	32
1.5.2	<i>Efeitos da crotoxina em células</i>	34
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	41
2.1	Objetivos gerais	41
2.2	Objetivos específicos	41
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	42
3.1	Purificação do veneno crotálico	42
3.1.1	<i>Exclusão molecular (FPLC)</i>	42
3.1.2	<i>Cromatografia de troca iônica</i>	43
3.1.3	<i>Dosagem de proteínas por Bradford</i>	43
3.1.4	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE)</i>	44
3.2	Células	44
3.2.1	<i>Manutenção de cultura de células e ensaios de citotoxicidade</i>	45
3.2.2	<i>Avaliação da viabilidade celular</i>	46
3.2.3	<i>Avaliação da morte celular por citometria de fluxo</i>	47
3.3	Analises estatísticas	48
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	49
4.1	Purificação da crotoxina	49
4.1.1	<i>Primeiro passo: cromatografia por gel filtração</i>	49
4.1.2	<i>Segundo passo: troca iônica</i>	50
4.1.3	<i>Separação das subunidades</i>	51
4.1.4	<i>Dosagem de proteínas por Bradford</i>	52

<b>4.1.5</b>	<b><i>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE)</i></b> .....	<b>53</b>
<b>4.2</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade</b> .....	<b>54</b>
<b>4.2.1</b>	<b><i>Ensaio com crotoxina (Grupo 01)</i></b> .....	<b>54</b>
<b>4.2.2</b>	<b><i>Ensaio com PLA2 e Crotopotina</i></b> .....	<b>59</b>
<b>4.2.3</b>	<b><i>Cinetica (Grupo 03)</i></b> .....	<b>61</b>
<b>4.3</b>	<b>Avaliação da morte celular por citometria de fluxo</b> .....	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>68</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer

Todos os anos surgem milhares de novos casos de câncer em seres humanos em todo o mundo. Na medicina veterinária tem-se notado um aumento dos casos de neoplasia, principalmente entre os animais de estimação em virtude da elevação da expectativa de vida de cães e gatos, o que tem levado à necessidade de estudar e implantar novos esquemas de tratamento dessas neoplasias. Entre os seres humanos, além do aumento da expectativa de vida, outros fatores ambientais como tabagismo, obesidade, alimentação, sedentarismo também contribuem para a elevada frequência de casos de câncer. Agentes físicos, químicos e biológicos podem induzir agressão ao genoma e levar ao desenvolvimento neoplásico.

O processo de divisão celular é controlado por fatores reguladores que fazem a manutenção da homeostase. Em certas circunstâncias este controle falha e as células passam a se dividir de maneira autônoma (Abbas et al., 2005)

A célula neoplásica (neo: novo; plasein: formas) tem como características a capacidade de se esquivar dos controles de crescimento e do sistema imune. Esta capacidade de escape aos controles é transmitida a toda progênie da célula e, frequentemente, se acentua conforme aumentam as gerações e as mutações (Abbas et al., 2005).

Tumor, sinônimo de neoplasma ou blastoma, é o crescimento anormal de tecidos, no qual as células com um distúrbio genético passam a se reproduzir mais rapidamente do que as células normais. O tumor é denominado como maligno quando seu crescimento é demasiadamente acelerado e desorganizado com produção de metástases (Adam et al., 2003; Sarasin, 2003).

Câncer é uma palavra derivada do latim e significa caranguejo. Este nome foi dado em devido à semelhança com o crustáceo que se adere firmemente a qualquer lugar, assim como o tumor se adere ao tecido onde se desenvolve (Bold et al., 1997).

A doença acontece quando alterações genéticas interferem nos mecanismos normais de crescimento celular. Estas alterações podem ser herdadas ou adquiridas e, por isso, sabe-se que a oncogênese é um processo de múltiplos



estádios, em nível de genótipo e fenótipo, que envolvem alterações cumulativas (Altieri, 2001; Bunz, 2001; Adam et al., 2003).

Segundo estatísticas publicadas pelo INCA (Instituto Nacional do Câncer, 2010), o câncer é uma importante causa de doença e morte no Brasil, desde 2003 as neoplasias malignas constituem-se na segunda causa de morte na população, representa quase 17% das mortes de causa conhecida notificadas em 2007. Esperam-se 489.270 novos casos de câncer para o ano de 2010. O mais incidente será o câncer de pele amelanótico, com 113.850 casos. Em seguida vêm os tumores de próstata (52.350), mama feminino (49.240), cólon e reto (28.110) e pulmão (27.110).

Considerada uma patologia com desenvolvimento genético, o câncer se desenvolve devido a mutações ao longo dos anos. Estas mutações estão relacionadas com os proto-oncogenes envolvidos no crescimento celular, os quais se transformam em oncogenes tornando a célula neoplásica, levando-a a imortalização pela ação da enzima telomerase (Rais et al., 1999). Esta enzima encontra-se ativa nas células germinativas, progenitoras e tumorais. Nas células somáticas, a telomerase encontra-se reprimida. A ativação da telomerase leva à imortalização celular, enquanto a repressão leva a uma contínua redução do tamanho cromossômico que acaba por levar à morte celular (Yim et al., 2007). A presença de alterações na forma e número de cromossomos, a perda das propriedades de adesividade célula-célula e a falha no controle da proliferação celular levam a um crescimento descontrolado e a deleção de proto-oncogenes como o p53 e bcl2, os quais estão envolvidos no controle negativo do ciclo celular e na regulação da apoptose ou morte celular programada (Zhivotovysky e Orrenius, 2003).

Oncogênese é um termo que designa o processo de desenvolvimento de uma neoplasia, desde alterações mais precoces no DNA, que supostamente ocorrem em uma só célula ou em um grupo delas, até a formação de um tumor que pode destruir o organismo do hospedeiro (Abbas et al., 2005).

A descoberta da transplantabilidade de tumores (Jubb e Kennedy, 1993) foi de grande importância para a elucidação dos mecanismos pelos quais as neoplasias se instalam e se desenvolvem no organismo. Tal processo também permite avaliar vários tratamentos quimioterápicos e analisar os mecanismos de escape imunológico do hospedeiro às neoplasias.

Agentes antineoplásicos são usados para tratamento de neoplasias e suas metástases, bem como para aliviar as síndromes paraneoplásicas que são manifestações de caráter imunológico ou humoral que precedem ou acompanham a doença. Alguns destes medicamentos, dentre outros mecanismos, atuam também desencadeando as vias de apoptose, constituindo assim uma quimioterapia menos agressiva para o paciente oncológico (Dagli et al., 2002).

Embora exista uma grande disponibilidade de agentes antineoplásicos, ainda ocorrem falhas de tratamento e mortes, devido a resistência de alguns tumores aos agentes e a toxicidade para os tecidos normais. Por esta razão, a pesquisa por novos agentes antitumorais é crescente.

Os compostos naturais são altamente diversificados, oferecendo uma gama de oportunidades para a indústria farmacêutica. Produtos naturais com atividade biológica possuem estruturas que são fontes de novos agentes farmacológicos. Muitas drogas disponíveis no mercado ou em testes clínicos são derivados de produtos naturais, como por exemplo, os derivados de plantas: morfina (analgésico), taxol, podofilotoxina, camptotecina e alcalóides da vinca (antitumorais), artemisina (antimalárico), aspirina (antiinflamatório, analgésico, antipirético e inibidor da agregação plaquetária) (David et al., 2002); e os derivados de venenos animais: captopril (anti-hipertensivo, oriundo da peçonha de *Bothrops jararaca*).

Estes fatos mostram o grande potencial terapêutico dos compostos naturais, dentre eles, as peçonhas de serpentes e seus peptídeos e justifica a necessidade de estudos para identificar e isolar novas peçonhas com propriedades terapêuticas, como o efeito antitumoral para variados tipos de tumores.

Os agentes antineoplásicos promovem a diminuição dos sintomas da doença, aumentam a sobrevida dos pacientes e ocasionalmente promovem a cura. Para que um fármaco seja eficiente contra os tumores, este deve matar ou incapacitar as células tumorais sem, no entanto, danar excessivamente as células saudáveis (Vorherr, 1984). Esta situação ideal pode ser obtida com a indução da apoptose em células tumorais.

Tais fatos enfatizam a importância de estudos sobre componentes que atuem especificamente no ciclo celular, induzindo a apoptose de células tumorais.

## 1.2 Ciclo celular

O ciclo celular começa quando fatores de crescimento ligam-se a receptores de membrana que ativam proteínas transdutoras de sinais. Uma vez que estes sinais alcançam o núcleo, ativam os fatores de regulação nuclear, iniciando-se a transcrição do DNA culminando com a divisão celular. O ciclo se desenvolve nas seguintes etapas, denominadas de fases: G0 (repouso), G1 (*gap* ou lacuna 1), S (síntese), G2 (*gap* 2) e M (mitose) (Rais et al., 1999; Sarasin, 2003).

Na fase G0 as células mantêm suas funções em nível basal; na fase G1, a célula acumula no citoplasma os materiais necessários para o desdobramento do DNA. Após a fase G1 há uma pausa, denominada ponto R (restrição) ou primeira parada, na qual haverá uma checagem da fita de DNA, antes da progressão do ciclo. Se houver alguma anormalidade na informação genética a mesma deverá ser reparada durante esta parada, caso contrário, a célula não progredirá. Na fase S ocorre a replicação do DNA e na fase G2, há o armazenamento dos materiais necessários para a mitose. Por último acontece a fase M em que a célula se divide. As duas células-filhas com igual número de cromossomos da célula-mãe, que sofreram mitose entram em fase G1 e podem reiniciar o ciclo celular ou alternativamente parar o ciclo celular, temporária ou definitivamente. Outro processo de controle da divisão celular é a contagem do número de telômeros que induz a célula a se dividir. Neste mecanismo, as pontas dos cromossomos (telômeros) determinam o número de divisões, e no momento apropriado iniciam senescência e morte; estes mecanismos sugerem uma tentativa de imortalização da célula cancerosa (Rais et al., 1999).

A progressão do ciclo celular é controlada por um grupo de proteínas reguladoras denominadas quinases dependentes de ciclina (CDK). Estas são enzimas que se ligam a outras proteínas ativadoras denominadas de ciclinas e ambas agem através de reação de fosforilação em outros substratos, os quais inibem ou ativam fases específicas do ciclo celular. Assim, para a célula entrar na fase G1, age a ciclina D ligada à CDK4 ou à CDK6; após o ponto R, ainda na fase G1, age a ciclina E ligada à CDK2. Na fase S age a ciclina A, na fase G2 as ciclinas A e B e na fase M a ciclina B, ligadas as CDK's correspondentes (Mercetante et al., 2002; Blagosklonny, 2003).

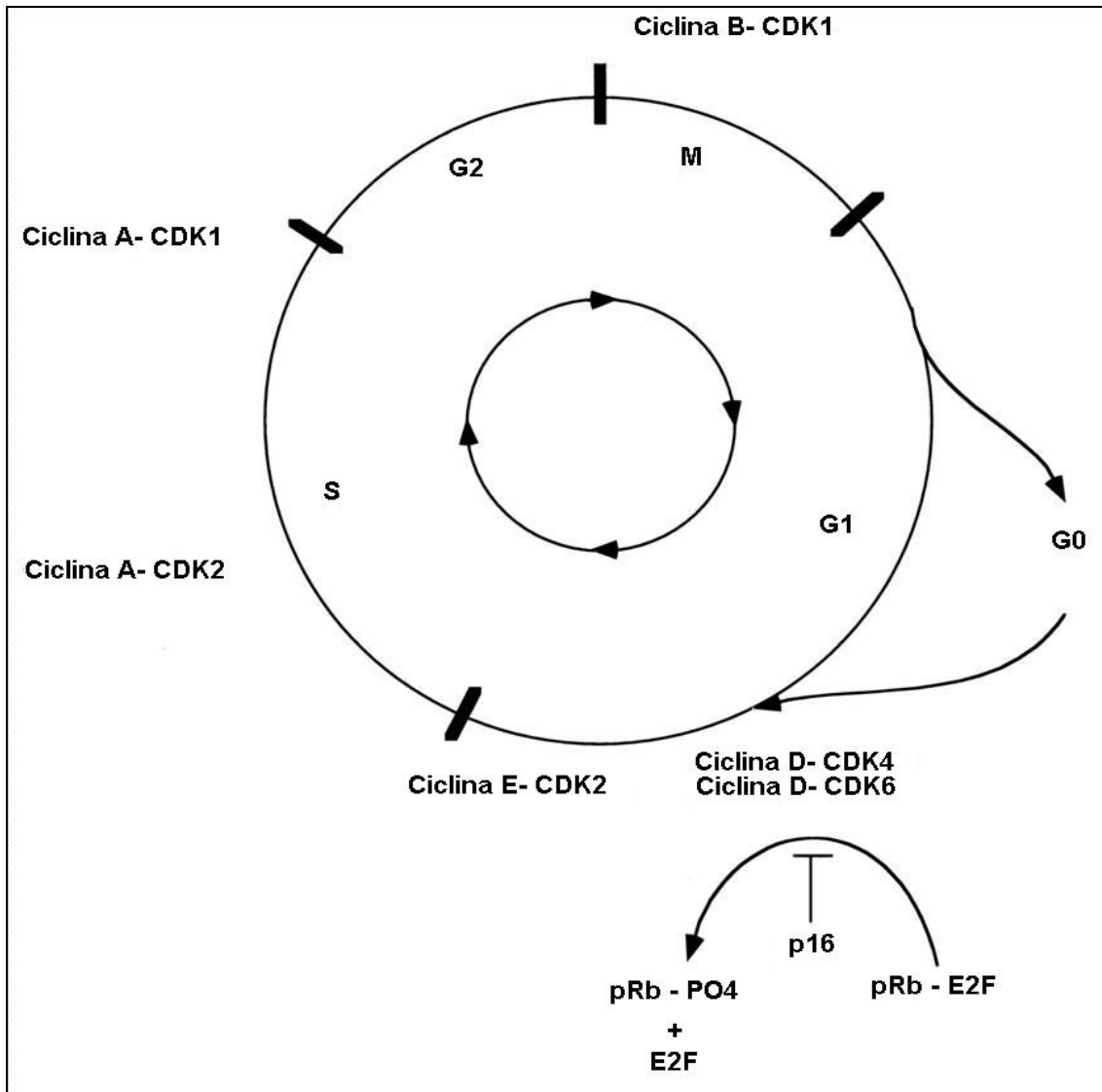


Figura 1 – Representação esquemática do ciclo celular de mamíferos  
 Fonte: Collins et al. (1997).

Uma vez ocorrida a divisão celular, cada célula contém informações específicas na fita de DNA, as quais são transcritas em nível nuclear para a fita de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm). Este RNAm leva as informações até o citoplasma, mais especificamente até os ribossomos, onde com o auxílio do RNA de transferência (RNAt) e do RNA de síntese (RNAs) ocorre a síntese de proteínas. Cada célula é programada para cumprir suas funções e terminar o seu ciclo de vida com a morte celular programada, denominada de apoptose (Lehninger et al., 2002).

A apoptose é, na realidade, um processo controlado geneticamente, que atua na remoção de células indesejáveis cujo processo está envolvido tanto em funções fisiológicas quanto patológicas (Bohm e Schild, 2003). Os avanços da biologia molecular permitiram a identificação de genes que intervêm no crescimento

celular, possibilitando o melhor conhecimento do processo de oncogênese humana. Duas classes de genes têm sido identificadas: os supressores de tumor e os oncogenes (Bold et al., 1997; Roninson et al., 2002).

Um clone celular é considerado neoplásico quando apresenta as seguintes características: perda de controle da proliferação e da divisão celular, imortalização pela ação da enzima telomerase, presença de alterações na forma e no número de cromossomos, perda das propriedades adesivas da membrana plasmática que permite o reconhecimento célula-célula e a inibição por contato do movimento e crescimento celular. Além destas, perda da função e capacidade de diferenciação ou especialização, capacidade de atingir tecidos vizinhos e formar metástases e capacidade de induzir a formação de novos vasos sanguíneos, a angiogênese (Blagosklonny, 2003).

### 1.3 Morte celular

A morte celular é um fenômeno que por muito tempo foi negligenciado, o conceito predominante sugeria que a morte celular seria um processo degenerativo produzido durante situações patológicas (Soini et al., 1998).

Em meados do século dezenove alguns pesquisadores chegaram a considerar a morte celular como um processo exclusivamente patológico, que ocorreria apenas em situações anormais, como no caso de doenças. Neste caso o estudo da morte celular promoveu seu melhor entendimento dos eventos celulares envolvidos em algumas doenças. No século vinte, alguns pesquisadores passaram a considerar a morte celular como um fenômeno fisiológico, necessário para o desenvolvimento normal e manutenção da forma normal dos tecidos, estudando tecidos embrionários. Nos anos 70, outro grupo de pesquisadores ao analisar a alta frequência de morte celular em tumores, relacionou esta morte com fenômenos homeostáticos, reguladores do número de células para promover equilíbrio entre perda e ganho celular (Bohn e Schild, 2003).

O fenômeno de morte celular atrai a atenção de inúmeros pesquisadores em variados campos de conhecimento, no entanto, muitos problemas aparecem quando se tenta entender o processo e os mecanismos da morte celular. Muitas tentativas foram feitas para classificar e caracterizar os possíveis tipos de morte celular, segundo sua função para os seres vivos, a morfologia das células atingidas e os aspectos bioquímicos de sua ocorrência. Resumidamente, os tipos de morte celular são: necrose e morte celular programada ou apoptose, que envolve um programa genético na sua execução. Somente em mamíferos, a morte celular programada e a apoptose são consideradas sinônimos (Soini et al., 1998).

Embora a morte celular durante o desenvolvimento do organismo já tivesse sido sugerida há mais de um século, foi a classificação bioquímica e morfológica sugerida por Kerr em 1972 que começou a esclarecer o papel fisiológico desse fenômeno, diferenciando apoptose de necrose (Bohm e Schild, 2003; Zhivostovsky e Orrenius, 2003).

### **1.3.1 Necrose**

Uma das expressões morfológicas da morte celular, a necrose refere-se a um espectro de alterações que se seguem à morte celular. É resultante em grande parte, da ação progressiva de enzimas sobre a célula letalmente lesada, que se caracteriza pela morte celular causada por injúrias no tecido, constituindo-se num processo não mediado por ATP, ou seja, passivo, levando a ruptura da célula. Acontece uma ruptura da membrana citoplasmática e extravasamento de material antigênico que induz à reação inflamatória, intensificando o dano tecidual. A morfologia é decorrente do resultado de dois processos: digestão enzimática que se traduz microscopicamente como uma necrose de liquefação e a desnaturação de proteínas que origina a necrose de coagulação. Na necrose de coagulação os contornos celulares são preservados por algum tempo enquanto que na necrose de liquefação a célula é completamente digerida. As alterações nucleares aparecem sob três padrões: a basofilia da cromatina pode diminuir (cariólise), uma alteração que supostamente se reflete na atividade da DNase. Um segundo padrão é a picnose, caracterizada pela retração nuclear e aumento da basofilia. Neste caso o DNA aparentemente se condensa em uma massa sólida, basofílica. No terceiro padrão, conhecido como cariorrexe, o núcleo picnótico ou parcialmente picnótico sofre fragmentação. Com o tempo, um ou dois dias, a célula necrótica desaparece totalmente (Cotrans et al., 2000; Bohm e Schild, 2003).

### **1.3.2 Apoptose (morte celular programada)**

Apoptose é uma palavra de origem grega que significa cair em pedaços. Trata-se de um processo fisiológico essencial para o desenvolvimento e evolução dos tecidos. Vários processos biológicos se devem a mecanismos de morte celular programada controlado pelas células, como por exemplo, a metamorfose de larvas de anfíbios (perda de cauda dos girinos), atrofia de rins devido à obstrução de ductos excretórios, a eliminação de membranas interdigitais durante a embriogênese, a involução das glândulas mamárias após o período de lactação. As células tumorais

podem apresentar um descontrole nos mecanismos de morte celular programada, fato que leva ao crescimento descontrolado (Bhom e Schild, 2003; Zhivotovsky e Orrenius, 2003).

A apoptose é um processo ativo mediado por ATP, pode ser iniciada por algumas vias como a de caspases que são proteínas que catalisam uma série de reações hidrolíticas, provocando a clivagem e inativação de proteínas que protegem as células da morte. Danos genéticos subletais sinalizam para que as células morram por apoptose, enquanto danos severos inibem a habilidade das células em produzir ATP eliminando-as por necrose (Leytin e Fredman, 2003).

Estima-se que 50 a 70 bilhões de células pereçam a cada dia no adulto em decorrência da apoptose, em um ano, cada indivíduo produzirá e erradicará uma massa de células igual ao peso do corpo inteiro. É necessário que este processo esteja altamente regulado, já que defeitos na maquinaria apoptótica, aumentam a sobrevivência da célula e podem contribuir para a expansão de células anormais. A sobrevivência prolongada de células cria um ambiente permissivo para instabilidade genética e acúmulo de mutações. Além disso, defeitos nos mecanismos apoptóticos conferem resistência à quimioterapia, radiação e destruição imunomediada (Andreeff et al., 2000).

Com a biologia molecular, o estudo da morte celular programada atingiu o campo da genética molecular. A expressão de vários genes tem sido associada à indução de morte celular em uma grande variedade de vertebrados e invertebrados (Wang et al., 2003).

A apoptose é caracterizada por uma série de modificações celulares que podem ser vistas ao microscópio de luz. Microscopicamente ocorre fragmentação nuclear e celular em vesículas apoptóticas e a formação dos corpos apoptóticos. Diferente da necrose, não existe extravasamento de conteúdo para o interstício e, portanto, não há inflamação ao redor da célula morta (Moffat et al., 2000; Lowe e Lin, 2000).

Quatro componentes genéticos devem ser considerados em relação aos mecanismos apoptóticos: as caspases, os complexos sinalizadores de morte celular, as mitocôndrias e as proteínas da família Bcl-2 (Bohm e Schild, 2003).

As reações hidrolíticas centrais dos processos apoptóticos são catalisadas por uma família de proteases chamadas de caspases que apresentam um sítio ativo de cisteínas que é um aminoácido ativo. Elas são sintetizadas como pró-enzimas



que são ativadas por clivagem de modo autolítico ou por outras caspases. As caspases são frequentemente classificadas como enzimas iniciadoras ou efetoras dos processos apoptóticos, dependendo se sua atuação se dá sobre estímulo de sinais iniciais, ou na última etapa de destruição celular via apoptose (Kirkin et al., 2004).

A apoptose é também induzida pelos “complexos sinalizadores de morte celular” (*DISCs –Death Inducing Signaling Complexes*) na membrana plasmática. DISCs são formados quando ligantes extracelulares chamados de TNF (fator de necrose tumoral) interagem com receptores de superfície pertencentes à superfamília de genes receptores ricos em cisteína (Shimada et al., 2004).

O receptor de morte Fas, também conhecido como CD95 ou Apo-1, é importante para a eliminação de linfócitos T CD4 ativados, que combatem as infecções e por induzir a ação de linfócitos T citotóxicos (CD8) sobre as células cancerígenas. As ligações entre o Fas e seus ligantes também levam à formação de domínios de morte intracelular, devido à ligação entre receptores, formando complexos macromoleculares (*clusters*) que agem como receptores de pró-caspases (como a pró-caspase 8) que quando ativada por processo de autoclivagem, por sua vez, ativará uma cascata de caspases efetoras (como a caspase 3) levando a célula à apoptose. De maneira alternativa a caspase 8 pode clivar uma proteína da família Bcl-2, chamada de Bid, promovendo a apoptose (Bold et al., 1997; Bohm e Schild, 2003).

As mitocôndrias são organelas centrais nos processo de morte celular programada. Sinais provenientes de receptores de superfície da célula ou de sítios danificados convergem sobre a mitocôndria provocando a permeabilização de suas duas membranas, a perda do potencial transmembrana da membrana interna das mitocôndrias e liberação de proteínas relacionadas a apoptose como o citocromo c, derivados mitocondriais ativadores de caspases e certas pró-caspases a partir do espaço intermembranas. A liberação de proteínas indutoras de apoptose e o colapso do potencial transmembrana mitocondrial resultam na abertura de poros, pela alteração do volume mitocondrial e pela ruptura da membrana mitocondrial externa e consequentemente a liberação de proteínas presentes no espaço intermembranas que ativam as caspases do citosol (Gruber et al., 2004).

O início do processo de apoptose pode acontecer por uma via intrínseca, estimulada por sinais de estresse provenientes do interior da célula. Radiação,

quimioterápicos, choque térmico, falta de fatores de crescimento, níveis aumentados de corticosteróides são alguns dos fatores que podem gerar tais sinais de estresse (Huigsloot et al., 2002). Estes sinais são detectados pelas mitocôndrias que passam por um desacoplamento da cadeia respiratória e liberam para o citosol, citocromo c, as proteínas SMAC/Diablo (*Second Mithochondria-derived of Caspases/Direct IAP-Binding protein with a low isoelectric point*) e AIF (*Apoptosis Inducing Factor*). Por outro lado o citocromo c citoplasmático se liga a Apaf-1 e este complexo na presença de ATP (adenosina tri-fosfato) ativa a caspase 9, que por sua vez ativará a caspase 3. A SMAC é responsável pelo cancelamento da ação negativa de moléculas da família dos IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) sobre a apoptose. Esta família de inibidores endógenos de caspases é bastante conservada evolutivamente, apresentando homologia com moléculas virais. É composta por moléculas que possuem de um a três domínios BIR (*Baculovirus IAP Repeats*) os quais parecem ser responsáveis pela inibição das caspases 3,7 e 9 (Franklin et al., 2002).

A morte celular programada faz parte de diversos processos vitais, como o desenvolvimento embrionário, o controle de tumores e a regulação de populações de células do sistema imune. Alterações nos genes responsáveis pela autodestruição podem ser desastrosas. Por ser indispensável à vida, a morte da célula deve seguir um plano. Qualquer distúrbio de sua regulação, tanto o excesso quanto a insuficiência, pode levar ao desenvolvimento de doenças degenerativas ou do câncer (Reed e Warner, 2002).

## 1.4 Câncer de pele

Os cânceres de pele mais comuns são divididos em dois grupos principais: os melanóticos (melanomas) e os amelanóticos, sendo o segundo grupo composto por carcinoma baso-celular (CBC) e por carcinoma de células escamosas (CEC). Os cânceres amelanóticos são pouco fatais, porém de crescimento rápido, que se negligenciado, pode levar à destruição local ou funcional. Por outro lado, o melanoma aparece em menor frequência, porém sua letalidade é maior. A profundidade do tumor é uma característica essencial para o prognóstico, portanto o sucesso terapêutico está diretamente ligado ao reconhecimento precoce (Ricotti et al., 2009).

O melanoma tem origem a partir de melanocitos produtores de pigmento de melanina. A pele a derme e a epiderme separam-se por uma membrana basal e os melanócitos posicionam-se na junção epidermal. Aproximadamente, pode-se localizar um melanócito a cada dez células basais, produzindo melanina, que por sua vez é distribuída para as camadas superiores, dando cor à pele e protegendo o DNA contra a radiação ultravioleta (Ricotti et al., 2009).

Embora esteja envolvido na dinâmica natural de proteção epidérmica no crescimento, diferenciação e migração vertical dos queratinócitos, a proliferação dos melanócitos é altamente controlada e é raramente observada em condições fisiológicas basais. Estas células são diferenciadas a partir dos melanoblastos, oriundos de células pluripotentes da crista neural. O desenvolvimento do melanoma é a maior consequência patológica de um descontrole microambiental do mecanismo de controle gênico celular na diferenciação dos melanócitos (Pomerantz et al., 1998).

O mecanismo exato envolvido no desenvolvimento do melanoma pela irradiação ultravioleta não está esclarecido. Muitas teorias para a carcinogênese induzida pela irradiação ultravioleta tem sido propostas. De maneira geral, o melanoma é uma doença genética caracterizada por uma série de alterações acumulativas dos genes que modulam diversos mecanismos relacionados à proliferação celular, morte celular programada, angiogênese e expressão de moléculas de adesão (Pomerantz et al., 1998).

Embora o melanoma corresponda por apenas 4% de todos os cânceres de pele, este é responsável por 80% das mortes provocadas pelos tumores desta classe. Poucos pacientes com metástase alcançam uma sobrevivência de cinco anos. Os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do melanoma estão no histórico familiar, nevos benignos ou atípicos, e histórico anterior de melanoma. A imunossupressão, sensibilidade solar e exposição à radiação ultravioleta são fatores de risco adicionais. Cada um destes fatores constitui uma predisposição genética ou um estresse ambiental que contribuem para a geração de um tumor. O melanoma se origina da transformação dos melanócitos e torna-se mais perigoso quando começa a avançar para as camadas mais internas da pele, pois aumenta a possibilidade de metástases. No entanto, como na maioria dos cânceres, existe uma heterogeneidade tanto no aparecimento como na patogenicidade. Os casos são mais frequentes em pessoas com histórico de exposição solar por longos períodos, particularmente com episódios de queimaduras, sendo outros fatores de risco pouco conhecidos. As apresentações de melanoma em mucosas e tecidos moles parecem ter patogenia distinta. Grande parte dos casos de melanoma apresentam mutações na CDKN2A (inibidor de quinase dependente de ciclina 2A), e a minoria na quinase dependente de ciclina 4 (CDK4). Estas características explicam a ligação entre a susceptibilidade e as mutações no CDKN2A ou CDK4 já que ambos são genes supressores de tumor. O efeito da exposição à luz ultravioleta é regulado por alterações de genes em particular (polimorfismo) que afetam a resposta defensiva da pele contra a luz ultravioleta. A radiação ultravioleta causa mudanças genéticas na pele, altera a função imune cutânea, aumenta a produção local de fatores de crescimento, e induz a formação de espécies reativas do oxigênio que danificam o DNA dos queratinócitos e melanócitos (Miller e Mihm, 2006; Rother e Jones, 2009).

#### **1.4.1 Células B16-F10**

Trata-se de um melanoma que possui grande afinidade por células pulmonares. Foi isolado por Fidler (1973), que estudava o potencial de metastatização de melanoma maligno em camundongos C57BL/6. Começando com um melanoma murino B16 com baixo potencial de metastatização *in vivo*, variantes foram selecionadas por suas características de implantação, invasão, sobrevivência e crescimento para formar metástase em pulmão após injeção subcutânea em

camundongos C57BL/6. As metastases desenvolvidas no pulmão eram identificadas pela sua pigmentação (melanina) e retirados para isolamento de crescimento em cultura. Assim foi obtida a designada linhagem B16-F1, este processo foi repetido mais nove vezes até a obtenção da linhagem B16F10, que apresentava um maior potencial de metástase no pulmão em relação a B16F1 (Fidler, 1973, 1975; Nicolson et al., 1978).

A linhagem tumoral B16F10 constitui um modelo biológico muito útil no estudo do melanoma, pois é um tumor que surgiu espontaneamente na linhagem murina C57BL/6 e possui o mesmo complexo de histocompatibilidade principal (MHC) permitindo seu uso para estudo *in vivo*; é um tumor que pode ser visto facilmente na pele e órgãos pela presença de muita melanina e suas células podem ser cultivadas facilmente *in vitro* e injetadas por diferentes vias *in vivo* para observação de diversas interações.

Uma pequena dificuldade observada ao utilizar estes modelos para estudar o melanoma é o fato de que as células são aplicadas de forma subcutânea, e isto não reflete o surgimento natural do tumor na epiderme, portanto alguns processos de invasão das células para a derme são ignorados, mas a sua capacidade de metástase pode ser avaliada e terapias para sua prevenção podem ser testadas.

A linhagem B16-F10 é especializada em invadir a circulação e induzir metástases, portanto é um modelo ideal para estudar o tratamento de melanoma maligno metastático.

### **1.5 A peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus***

O veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* tem sido descrito como de pouca complexidade. Essa serpente encontra-se distribuída no Brasil nas zonas altas e secas, sul oriental e meridional, desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais. Sua denominação popular é cascavel ou boiquira. O veneno apresenta efeitos importantes sobre os músculos esqueléticos, sistema nervoso autônomo, rins e sangue. Outros órgãos como o fígado também podem ser acometidos (Barraviera, 1994). O veneno crotálico também induz rabdomiólise generalizada, mialgia, aumento dos níveis de creatinoquinase (CK) acompanhado de mioglobinúria e dor por todo o corpo (Sano-Martins et al., 2001).

Até 1985 tinham sido isoladas e caracterizadas quatro principais toxinas deste veneno: convulxina, giroxina, crotoxina e crotamina (Takeda et al., 1985). Posteriormente duas novas toxinas foram descritas no veneno da *C.d. terrificus*, a delta toxina e um analgésico (Doley e Kini, 2009).

A convulxina, glicoproteína de cerca de 70 kDa provoca efeitos como convulsões tônico-clônicas, alterações circulatórias e respiratórias, ativação e agregação plaquetária, na ausência de fibrinogênio (Vargaftig et al., 1983).

A giroxina possui peso molecular de 33 kDa e provoca síndrome convulsiva, caracterizada por movimentos circulatórios ao longo do seu eixo longitudinal do corpo lembrando o rolar de um barril (Silva 2004), característico em camundongos. A giroxina também apresenta atividade coagulante do fibrinogênio no plasma, exercendo assim uma atividade do tipo trombina (Alexander et al., 1988).

A crotoxina de 23 kDa, representa cerca de 60% do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* e apresenta alta toxicidade. É uma neurotoxina pré-sináptica que atua nas terminações nervosas motoras inibindo a liberação de acetilcolina pelos impulsos nervosos, sendo este o principal fator responsável pelo bloqueio neuromuscular e, portanto pelas paralisias motoras e respiratórias observadas nos animais (Azevedo Marques et al., 1992). Esta neurotoxina é composta por duas sub-unidades ligadas não covalentemente. A subunidade ácida é enzimaticamente inativa e não possui toxicidade, é também conhecida como crotapotina e potencializa a ação da fosfolipase (subunidade básica) (Bon et al., 1979).

A crotamina é um polipeptídeo básico de 4.8 kDa que atua na membrana das fibras musculares alterando sua permeabilidade ao sódio, produzindo espasmos musculares (Azevedo Marques et al., 1992).

### 1.5.1 Crotoxina

Os venenos de serpentes são misturas complexas de proteínas farmacologicamente ativas, sendo as fosfolipases A2 um de seus componentes mais abundantes. Dois grupos (I e II) de fosfolipases foram estabelecidos para estes venenos baseando-se em suas estruturas primárias e nos padrões de pontes dissulfeto. O grupo I abrange a família *Elapidae* enquanto o grupo II é encontrado nas serpentes das famílias *Viperidae* a *Crotalidae* (Gebrim et al., 2009).

A crotoxina é o principal componente do veneno da cascavel sul americana *Crotalus durissus terrificus*, foi descrita em 1938 por Slotta e Frankel-Conrad. Trata-se de uma toxina heterodimérica composta por duas subunidades, sendo uma não tóxica de caráter ácido chamada Crotapotina (CA) sem atividade de fosfolipase A2 (PLA2), e a outra de pouca toxicidade e caráter básico (CB) que apresenta atividade de PLA2. A subunidade CA é formada por três cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto. São geradas pela quebra proteolítica do precursor de CA, o qual é similar às enzimas PLA2 do grupo II. Até então, já foram isolados do transcriptoma de *C. durissus terrificus* quatro isoformas deste precursor (CA1, CA2, CA3 e CA4). As proteases envolvidas no processamento da subunidade CA ainda não foram identificadas (Doley e Kini, 2009).

A subunidade CB é uma enzima PLA2 do Grupo II. Embora tenha sido a primeira toxina a ser cristalizada, a estrutura tridimensional do complexo ainda não está disponível. Funcionalmente, a crotoxina é uma neurotoxina potente, age bloqueando reversivelmente a transmissão de sinais nervosos nas junções neuromusculares. De maneira similar ao complexo da crotoxina nativa, a subunidade CB causa o bloqueio da transmissão neuromuscular e exibe outros efeitos farmacológicos, enquanto a CA é farmacologicamente inativa. Embora a CB exiba neurotoxicidade, o complexo da crotoxina é, pelo menos, dez vezes mais potente do que a CB sozinha. A subunidade CA age como uma chaperonina que impede que a CB se ligue em sítios não específicos e guiando-a para o sítio específico, o que aumenta a sua potência (Doley e Kini, 2009).

As fosfolipases A2 são enzimas que aparecem em altas concentrações nos venenos de serpentes, abelhas, vespas e no suco pancreático de mamíferos (Harris, 1991). Podem ser encontradas em uma grande variedade de venenos de serpentes

apresentando um amplo espectro de atividades biológicas dentre elas a ação hemolítica indireta, neurotóxica, cardiopática, anticoagulante, edematogênica e miotóxica (Kini e Evans, 1989).

Também conhecidas por fosfatidil – acil – hidrolases, as pLA2s são uma família de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações acil – éster, na porção *sn-2* de fosfolipídios. Tal reação depende da presença de íons cálcio, sendo a unidade catalítica formada pelos aminoácidos His 48, Asp 49 e uma molécula de água (Dennis et al., 1994). Este processo catalítico gera ácidos graxos livres, como o ácido araquidônico (AA), precursor de eicosanóides, que atuam como segundos mensageiros de processos fisiopatológicos (Dennis et al., 1994) e lisofosfolipídeos, como o liso-PAF (Smith et al., 2000). As PLA2s são classificadas em cinco grupos: as PLA2s secretadas (sPLAs), as intracelulares (como as cPLA2 citosólicas), as PLA2s independentes de Ca<sup>+</sup> (iPLA2), as acetil-hidrolases (PAF-AH) e as PLA2s lisossomais (Schaloske e Dennis, 2006).

As PLA2s secretadas, provenientes dos venenos de serpentes Crotalidae e Viperidae, assim como aquelas do fluido sinovial e de plaquetas, estão incluídas no grupo II. A subunidade PLA2 da crotoxina tem seqüência de aminoácidos homóloga à de PLA2s presentes em venenos de outras Viperidae (Fraenkel-Conrat et al., 1980).

O grupo das PLA2s secretadas é o mais amplamente estudado. Seus efeitos na função celular são dependentes da liberação de derivados do ácido araquidônico e de lisofosfolopídeos (Rizzo et al., 2000). Outros efeitos dependem da ligação da enzima a receptores de membrana específicos, descritos como do tipo M (muscular) e N (neuronal). Os do tipo N foram os primeiros a serem identificados estando presentes em grande número em membranas do cérebro de ratos e são compostos por, ao menos, dois sítios de ligação (Rizzo et al., 2000). Estes receptores apresentam bastante afinidade por uma variedade de PLA2s neurotóxicas, incluindo a crotoxina. Tal fato sugere que este receptor seja crucial para o efeito neurotóxico. Os receptores do tipo M estão presentes em músculos esqueléticos e são potenciais candidatos a ligantes das PLA2 miotóxicas como por exemplo a miotoxina 2 de *Bothrops asper* (Lomonte et al., 1999). Na literatura há muita informação sobre o efeito da sPLA2 crotálica, em variados tipos celulares, como em macrófagos, linfócitos, plaquetas e células neoplásicas (Newman et al., 1993, Donato et al., 1996, Sampaio et al. 2005, Yan et al., 2006 e 2007).



Muitas toxinas de serpentes evoluíram de enzimas PLA2 digestivas por um processo de evolução acelerada. Os efeitos mais freqüentes são o neurotóxico (atingindo o sistema nervoso periférico e paralisando a presa rapidamente), algumas ainda têm efeito anticoagulante, hipotensor, hemolítico, edemaciante e afetam a agregação plaquetária. (Montecucco et al., 2008).

O mecanismo pelo qual a PLA2 leva a lesão celular é uma característica evolucionária altamente conservada, tais lesões são conseqüência de uma perturbação da membrana plasmática que promove um grande aumento da concentração do  $Ca^{2+}$  citosólico levando à degradação celular. (Montecucco et al., 2008; Sampaio et al., 2010).

As diferentes conseqüências patofisiológicas sistêmicas causadas por estas toxinas não estão relacionadas aos diferentes mecanismos de toxicidade celular, mas às propriedades anatômicas e fisiológicas dos tecidos e células atingidos (Sampaio et al., 2010).

As diferentes PLA2s tem estruturas muito similares, sendo formadas por quatro  $\alpha$ -hélices e duas folhas  $\beta$  anti-paralelas, ligadas por sete pontes dissulfeto. Elas variam no comprimento (119-134 aminoácidos) e possuem forma elipsóide de dimensões aproximadas de 45x30x20 Å. A crotoxina está classificada como uma PLA2 do grupo II, classificação dada segundo a posição de uma das pontes dissulfeto e pela presença de um alça adicional na porção C-terminal (Montecucco et al., 2008).

### **1.5.2 Efeitos da crotoxina em células**

O uso da crotoxina como um agente anti-tumoral teve início na década de 1970 em dois pacientes com câncer (adenocarcinoma e mamário) em estágio avançado. Na época, foi feita a aplicação peritumoral de um fármaco denominado VRCTC-310, que é composto por uma associação da crotoxina com a cardiotoxina, proveniente do veneno das serpentes da espécie *Naja naja atra*. Em ambos os casos houve resposta bastante positiva em relação a diminuição do volume tumoral (Costa et al., 1998). A aplicação da crotoxina foi repetida em 2002 por Cura et al. em 26 pessoas acometidas por tumores sólidos que já não respondiam à tratamentos convencionais. Os pacientes foram avaliados diariamente em relação aos efeitos colaterais do tratamento (toxicidade neurológica e não neurológica), farmanocinética,

dor e respostas dos tumores. Os efeitos colaterais cessaram sem a necessidade de tratamento, com exceção dos casos de hipersensibilidade. Os tumores tiveram redução da progressão e tiveram suas massas reduzidas, além de ser relatada a diminuição das dores por metástase óssea por alguns pacientes.

O fármaco VRCTC-310 foi testado por Newman et al. (1993) tanto *in vitro* como *in vivo* em carcinoma de pulmão de Lewis. A droga demonstrou especificidade citotóxica. Na experimentação *in vivo* foi alcançada a inibição de até 83% do crescimento dos tumores com aplicações em concentrações variadas por via subcutânea durante vinte dias. Com o tempo os animais desenvolveram tolerância aos efeitos colaterais como o efeito neurotóxico, a perda de peso e a irritação no local das aplicações, através de um protocolo de indução de tolerância feito com o aumento gradual das doses de tratamento ou com aplicações de pequenas doses da droga antes do início dos experimentos com a inoculação dos tumores.

A atividade catalítica da fosfolipase A2 (PLA2) é importante para o seu efeito antiproliferativo, no entanto o seu mecanismo de ação não está esclarecido (Donato et al., 1996). Pesquisas realizadas com a PLA2 proveniente da crotoxina em células que expressavam diferentes níveis de receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFr), uma glicoproteína da membrana plasmática composta de um domínio de ligação extracelular (importante mediador do crescimento celular, diferenciação e sobrevivência), demonstrou que a supressão do crescimento foi mais efetiva nas linhagens expressavam maiores níveis de EGFr, sugerindo a correlação entre a expressão destes fatores com a ação antiproliferativa da crotoxina (Donato et al., 1996; Doley e Kini, 2009).

Outra característica relacionada com a atividade da crotoxina pouco esclarecida seria o tipo de morte celular envolvido em seu efeito citotóxico. Estudos relacionando a autofagia e a apoptose celular foram feitos por Yan et al. (2006) em uma linhagem de leucemia mieloide crônica (K562). A toxina diminuiu a viabilidade das células, estimulando a autofagia, também foi constatado o colapso de membrana mitocondrial com liberação de citocromo-c e ativação da caspase -3, características de indução de apoptose. No ano de 2007 os mesmos autores repetiram os estudos em outra linhagem celular (MCF-7) de câncer mamário humano, deficientes em caspase-3. Desta vez, o estímulo da autofagia ainda foi observado, assim como a apoptose pela condensação e fragmentação nuclear. A viabilidade celular foi inibida de maneira dependente do tempo e da dose de exposição.

A apoptose é um tipo de morte celular com alterações morfológicas típicas e tem sido descrita em células tratadas com venenos. Este tipo de morte celular pode estar relacionado a complicações fisiológicas causadas por acidentes ofídicos, porém, o mecanismo envolvido na apoptose provocada pelos venenos permanece indefinido. Três mecanismos estão envolvidos no processo de apoptose: o mediado pelo mecanismo receptor ligante, a via mitocondrial e o mecanismo onde o retículo endoplasmático tem papel central (Tamietti et al., 2007). A despolimerização dos filamentos de actina do citoesqueleto puderam ser observadas em células de carcinoma ovariano de hamster (CHO-K1) incubadas por Tamietti et al. (2007) com diversas concentrações de veneno crotálico, as células perderam suas projeções aumentando o espaço entre elas. Ocorreu uma reorganização dos limites externos das células e mudança na forma delas. Durante a apoptose, as células se arredondam e perdem contato entre si ocorrendo também a formação de saliências, mudanças que acontecem provavelmente pela reorganização de estruturas de citoesqueleto (Tamietti et al., 2007). Os autores também constataram alterações no retículo endoplasmático e núcleo (fragmentação nuclear), indicadores de apoptose.

O veneno da *Crotalus durissus terrificus* tem poder citotóxico significativamente maior que a cisplatina, uma droga usada clinicamente para tratamento de tumores (Soares et al., 2010). Células de glioma de ratos (RT2) e de adenoma benigno de pituitária (GH3) tratadas com veneno total apresentaram alterações morfológicas como irregularidades de parede, encolhimento, condensação nuclear, fragmentação de DNA e formação de corpos apoptóticos perinucleares, características típicas de apoptose (Soares et al., 2010). Análises de ciclo celular também sugeriram que o tratamento com o veneno da cascavel provoca apoptose, além de deter o ciclo das células RT2 na fase G0/G1, um indicativo de que houve reconhecimento do dano e tentativa de reparo sem sucesso, já que ocorre a morte total das células após período prolongado de tratamento (Soares et al., 2010).

A apoptose em células tumorais induzida pelo veneno da cascavel, também foi demonstrada por Tamietti et al. (2007) em células de carcinoma de ovário de hamster (CHO-K1). Os autores sugeriram que, neste caso, a apoptose foi induzida por uma via da mitocôndria associada ao gene Bcl-2 promotor de morte celular. A

linhagem CHO-K1 possui o gene p53 mutante e por este motivo não possui o ponto de checagem na fase G1 (Tamietti et al., 2007).

No caso das células RT2, o gene p53 está na forma selvagem possibilitando a parada do ciclo celular nos pontos de checagem das fases G1 e G2 (Soares et al., 2010).

Fatores de crescimento são essenciais para a proliferação celular. Na ausência destes fatores, as células na fase G1 abandonam o ciclo e permanecem na fase G0 (fase quiescente), mantendo o metabolismo reduzido e cessando o crescimento celular, as células podem voltar ao ciclo normal se houver estímulo para crescimento. Os agentes antineoplásicos podem ser específicos para o ciclo celular (mais eficientes em células que proliferativamente ativas), ou não específicas para o ciclo celular (seu efeito independe da proliferação celular). Estudos indicam que o veneno de cascavel seja específico para o ciclo celular (Soares et al., 2010).

O principal componente do veneno da cascavel, a crotoxina, também induziu a morte celular das linhagens RT2 e GH3, caracterizada por alterações morfológicas e degradação de DNA, porém, pelo menos para estas linhagens, o efeito citotóxico da crotoxina não foi tão intenso como o veneno total, um indício de que a crotoxina poderia não ser o único componente do veneno com poder citotóxico (Soares et al., 2010). Estes estudos demonstraram também que a administração das doses com efeito antitumoral do veneno total em animais não provocou efeitos tóxicos agudos, alterações histopatológicas ou alterações funcionais.

O veneno da maioria das serpentes do gênero *Viperidae* tem grande potencial inflamatório. No entanto, o veneno da *Crotalus durissus terrificus* é uma exceção, pois não se observa reação inflamatória no local da picada (Sampaio et al., 2001). Segundo alguns estudos este veneno inibe as respostas imune e inflamatória. O veneno ou a crotoxina (seu principal componente), tem efeito inibitório na resposta imune humoral interferindo com síntese de imunoglobulinas G (IgG) (Sampaio et al., 2001). O veneno da cascavel inibe a distribuição e a atividade fagocitária de macrófagos, por outro lado eleva a produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e o metabolismo de glucose e glutamina (Sampaio et al., 2001). Estas ações são duradouras, permanecendo por até sete dias após aplicação do veneno. O efeito inibitório do veneno não está relacionado às alterações da viabilidade celular e pode estar relacionado com a alteração da distribuição e da atividade fagocitária destas

células. A distribuição dos macrófagos é um mecanismo que está relacionado com a interação da célula com a partícula a ser ingerida (Sampaio et al., 2001).

A principal toxina do veneno da cascavel, a crotoxina, também leva a uma inibição direta da distribuição e da atividade fagocitária dos macrófagos, o que sugere que esta seja a toxina responsável pelo efeito inibitório sobre os macrófagos no veneno total (Sampaio et al., 2003). A crotapotina (carreadora da PLA2) modula a resposta inflamatória diminuindo o edema de pata de camundongo induzido por carragenina (Landucci et al., 1995) e por PLA2 do veneno de naja e de abelha (Landucci et al., 2000). Garcia et al. (2003) mostraram que a crotapotina inibe a proliferação de linfócitos T em resposta a Conavalina A (Con-A), enquanto a PLA2 teve a capacidade de induzir a inflamação com o aumento da permeabilidade vascular na pele de ratos. Contrariando estes dados, Sampaio et al. (2005) obtiveram resultados que sugeriram que a PLA2 e não a crotapotina seria responsável pelo fator inibitório da crotoxina sobre a função dos macrófagos.

Estudos mostram que o soro anti-crotálico possui uma quantidade inferior de anticorpos quando comparado à de outros soros, sugerindo que o veneno da cascavel seja um imunógeno pobre ou que tenha componentes com atividade imunossupressora (Rangel-Santos et al., 2004). Comparando os efeitos do veneno total, da crotoxina e da subunidade PLA2, Cardoso et al. (2004) observaram inibição da proliferação de células esplênicas, exceto pela PLA2, fato que demonstra a necessidade da integridade da molécula para os efeitos avaliados. A viabilidade celular, avaliada com MTT, não foi comprometida. Os autores relatam também, a inibição da produção de citocinas IL-2, IL4, IL10 e IFN- $\gamma$  no tratamento com veneno total. Quando se utilizou a crotoxina, houve inibição somente da IL-4 e IL10. A transferência de células T e B purificadas do baço de ratos tratados com veneno para animais não tratados suprimiu a produção de IgG1 anti-ASH (albumina sérica humana). O efeito na proliferação celular não está relacionado com a atividade citotóxica e a queda da resposta proliferativa induzida por Con-A das células esplênicas pode estar relacionada com os baixos níveis de IL-2. Sugere-se que as toxinas do veneno e a indução de liberação de substâncias poderiam mudar a composição do microambiente interferindo na capacidade dos macrófagos de processar e apresentar o antígeno ao linfócito T. Estas células poderiam manifestar um fenótipo supressivo, como um linfócito T regulatório, que poderia mediar a supressão da resposta imune (Rangel-Santos et al., 2004).

Sampaio et al. (2006a e 2006b) demonstraram que tanto o veneno crotálico, como a crotoxina e sua sub-unidade PLA2 diminuíram significativamente a fagocitose de zimosan opsonizado por macrófagos. Além disso, os mesmos autores em 2005, demonstraram que a crotoxina inibia o espraiamento e a atividade fagocítica de macrófagos. A fagocitose é controlada pelo rearranjo do citoesqueleto de actina, que por sua vez é regulada pela atividade das GTPases. Imagens de microscopia eletrônica mostraram que o tratamento utilizando o veneno ou a crotoxina levou a um menor espraiamento dos macrófagos além de um aumento das microprojeções na superfície dessas células. Estudos de imunocitoquímica mostraram que tanto o veneno como a crotoxina aumentaram o conteúdo de actina-F no citoplasma das células, porém induziram um decréscimo da fosfotirosina. Tais resultados indicam que o veneno crotálico é capaz de induzir o rearranjo do citoesqueleto dos macrófagos, efeito associado a inibição da fosforilação da tirosina e da atividade de proteínas envolvidas na sinalização de processos intracelulares importantes para atividade fagocitária destas células.

O veneno estimula a produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, atividade antimicrobiana e o metabolismo da glicose e glutamina nos macrófagos (Sampaio et al., 2001, 2006). Por outro lado, apresenta efeito inibitório na distribuição e atividade fagocitária de macrófagos incubados com o veneno, efeito atribuído à crotoxina (Sampaio et al., 2003). Os mesmos autores mostraram, posteriormente, em 2005 que a PLA2 é a subunidade responsável pelo efeito inibitório da crotoxina em macrófagos (e não a crotapotina).

A crotoxina e a PLA2 causam a queda do número de linfócitos sanguíneos e linfáticos e levam a um aumento do conteúdo de linfócitos nos linfonodos mesentéricos em ratos (Zambelli et al., 2008). Além disso, a crotoxina promoveu aderência de leucócitos a células endoteliais da microcirculação sanguínea, o que deve ter contribuído para a queda no número de linfócitos circulantes. Várias moléculas de adesão expressas na membrana, tais como as integrinas e antígenos dos linfócitos estão envolvidas neste processo (Zambelli et al., 2008).

A circulação de linfócitos depende da interação com as células endoteliais e envolve os processos de rolamento, adesão e diapedese. Tratamento de ratos com crotoxina ou PLA2 levam ao aumento de leucócitos aderentes às vênulas, efeito evidente após uma ou duas horas da aplicação das toxinas, período correspondente ao da queda de leucócitos circulantes e em rolamento. Após um período de quatro

horas de aplicação das toxinas, estes efeitos não são mais observados (Zambelli et al., 2008). Animais previamente tratados com bloqueadores de selectina, moléculas de adesão que regulam o rolamento dos leucócitos, não tiveram queda em seu número quando posteriormente tratados com as toxinas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a ação citotóxica da crotoxina e suas subunidades em células de melanoma murino (linhagem B16-F10) comparada com sua ação em fibroblastos da linhagem L929.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a viabilidade celular após tratamento com crotoxina e suas subunidades por períodos de 6, 24 e 48 horas;
- Estabelecer a concentração efetiva 50% da crotoxina e suas subunidades (EC50) da população de células B16-F10 e L929.



### 3 MATERIAL E METODOS

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.

#### 3.1 Purificação do veneno crotálico

##### *Exclusão Molecular (FPLC)*

A cromatografia por exclusão molecular, também conhecida por filtração em gel, baseia-se na separação de proteínas de acordo com o tamanho das moléculas, sendo que os solutos maiores passam com maior velocidade pela coluna. As amostras são eluídas na presença de um simples tampão sem gradiente e passam por um meio de gel poroso, cujos poros são suficientemente pequenos para excluírem as moléculas maiores, porém não as menores. Desta maneira, as moléculas grandes atravessam a coluna com maior velocidade por não entrarem nos poros do gel, enquanto as moléculas pequenas demoram mais a percorrer a coluna por penetrarem nos poros necessitando de maior volume para eluir. Todos os procedimentos para purificação da crotoxina e suas subunidades foram realizados em cromatógrafo ÄKTA (GE Healthcare Life Science S.A. Westborough, MA, EUA).

A crotoxina foi inicialmente isolada, a partir do veneno bruto de *C. d. terrificus*, por exclusão molecular em coluna de gel filtração Superdex 75 (1,6 x 70 cm), GE. Para cada cromatografia, alíquotas de cerca de 80 mg do veneno total liofilizado foram dissolvidas em 1,2 ml de tampão formiato de amônio 100 mM, pH 3,0. Em seguida, a solução foi centrifugada a 14.000 G por 5 minutos em uma microcentrífuga. O sobrenadante foi aplicado à coluna de gel filtração, previamente ambientada no mesmo tampão, com fluxo de 0,5 ml/min. As frações foram coletadas (1,0 mL por tubo) com o auxílio de um coletor automático do sistema de FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*). A absorbância do eluato foi monitorada a 280 nm. As frações foram separadas em recipientes apropriados e posteriormente congeladas e liofilizadas.

### 3.1.2 Cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica é utilizada em soluções com misturas de cátions e ânions podem ser resolvidas em colunas resinas trocadoras de cátions e ânions como fases estacionárias. É usada para a separação de compostos iônicos ou ionizáveis. O princípio de separação é uma troca de íons da solução com os íons fixados na coluna.

A fração correspondente à crotoxina obtida na primeira etapa cromatográfica, depois de liofilizada, foi ressuspensa em 3,0 mL de tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 8,2 (nomeado tampão A) e aplicada em uma coluna de troca iônica do tipo Mono Q 5/5 GE, previamente estabilizada com o mesmo tampão, conectada a um sistema de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). A crotoxina adsorvida à coluna foi eluída pela passagem de um gradiente linear de NaCl, de 0 a 1M, em tampão idêntico ao A, exceto pela adição do sal. A absorvância foi lida automaticamente em 280 nm. As frações correspondentes à crotoxina foram coletadas e dialisadas contra PBS em membrana apropriada (limite máximo de 12.000 Da) (SIGMA – ALDRICH S.A. St. Louis, MO, EUA) e de maneira exaustiva. Posteriormente a crotoxina foi armazenada a temperatura de -20 °C.

Para a separação das subunidades, foi feito mais um passo cromatográfico por troca iônica em coluna Mono S 5/5 GE. Para a separação da PLA2 da crotapotina fez-se a diluição da crotoxina em tampão fosfato 50 mM /uréia 6M pH 7,2 e a toxina foi posteriormente aplicada na coluna já ambientada com o mesmo tampão. A crotapotina que possui ponto isoelétrico ácido é eluída primeiramente enquanto a fosfolipase A2 permanece adsorvida à coluna (por ter ponto isoelétrico básico). A eluição da fosfolipase A2 foi feita pela passagem de gradiente linear de cloreto de sódio, de 0 a 1M, em tampão igual ao A com a adição do sal (tampão B). A absorvância foi lida automaticamente em 280 nm. As frações correspondentes às subunidades foram coletadas e dialisadas contra água em membrana apropriada (limite máximo de 3.000 Da – SIGMA – ALDRICH S.A.) e de maneira exaustiva para a remoção da uréia. Posteriormente a PLA2 e a crotapotina foram armazenadas em freezer a temperatura de -20 °C.

### ***Dosagem de proteínas por Bradford***

Esta metodologia baseia-se na observação das duas variações de cor (azul e vermelho) do Coomassie Brilliant Blue. A coloração vermelha é convertida em azul quando ligada à proteína e a tonalidade varia conforme a concentração de proteína na solução, tornando possível a mensuração desta concentração Bradford, 1976). A concentração da crotoxina e de suas subunidades purificadas foram determinadas comparando-se uma curva de diluições em duplicata da amostra em questão à uma curva padrão de BSA (*Bovine Serum Albumine*):

As amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm, descontando-se o branco, iniciou-se dos tubos de menores concentrações para os de maiores. Os valores de densidade optica obtidos foram então analisados estatisticamente, no programa Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software S.A. La Jolla, CA EUA) em uma regressão linear para determinar a curva padrão e a função para determinar a concentração da amostra de crotoxina.

### ***Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE)***

Trata-se da separação de moléculas em um campo elétrico, que quando aplicado em uma solução de proteínas, estas moléculas migram com uma velocidade e em uma direção que refletem sua massa molecular e sua carga global.

Para avaliar o grau de pureza da crotoxina foi feita a eletroforese em gel de poliacrilamida o SDS-PAGE (*Sodium Dodecil Sulphate Poliacrilamide Gel Eletrophorese*), metodologia desenvolvida por Laemmli, 1970.

A amostra obtida após purificação foi diluída em 100  $\mu$ L de tampão de amostra (Laemmli, 1970) (SDS 20%; glicerina;  $\beta$  – mercaptoetanol 1 M; tampão Tris 1 M pH 6,8; Azul de bromofenol a 0,1 %) e aquecida a 70 °C por 10 minutos para desnaturação da proteína.

Em seguida, 20  $\mu$ L da amostra foi aplicada em gel de poliacrilamida a 15% (SDS- PAGE), para migração por eletroforese. Para tanto, aplicou-se uma voltagem constante de 100 V. O gel foi então corado em Azul Coomasie 250-R.

## 3.2 Células

As linhagens celulares utilizadas para a realização dos experimentos são provenientes da ATCC (American Type Cell Collection).

A linhagem B16-F10 é aderente e é proveniente de melanoma da pele de camundongos da linhagem C57BL/6J. Quando inoculada em camundongos desenvolve massa tumoral, servindo, desta maneira, como modelo de estudos tanto *in vitro* como *in vivo*.

A linhagem L929 também é aderente e é originária do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos C3H/Na.

### 3.2.1 **Manutenção de cultura de células e ensaios de citotoxicidade**

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade foi feita a manutenção em cultura de duas linhagens celulares, sendo uma de melanoma murino (B16-F10) e a outra de fibroblastos normais de camundongo (L929).

As células, inicialmente mantidas em nitrogênio líquido, passaram por processo de descongelamento sendo colocadas em garrafas de cultura celular (T25) contendo meio RPMI-1640 completo, ou seja, meio RPMI-1640 (CULTILAB S.A. Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (CULTILAB S.A.), 2 mM de glutamina (CULTILAB S.A.), 10U de penicilina e 10µg de estreptomicina GIBCO® (Lifescience S.A. São Paulo, SP, Brasil. Foram então mantidas em estufa a 37 °C de atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> até a confluência.

Para o tratamento das linhagens celulares com a crotoxina (Grupo 01) estas foram plaqueadas em quadruplicata numa concentração de 5x10<sup>5</sup> células/mL (5x10<sup>4</sup> células/ poço) de meio RPMI-1640 completo em placas de cultivo celular de 96 poços. Após aderência das células, acrescentou-se a toxina em diferentes diluições com meio RPMI-1640 iniciando-se com 21nM diluído em meio de cultura seguida de diluições seriadas na razão 2 até chegar à concentração de 0,33nM Os ensaios foram feitos com tratamentos de 6, 24 e 48 horas de incubação a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> com a toxina, sendo repetidos por três vezes.

Os ensaios com as subunidades da crotoxina (PLA2 e crotapotina), Grupo 02, foram realizados de maneira similar repetidos por três vezes, porém, somente com períodos de 24 e 48 horas. As concentrações usadas corresponderam à

proporção do peso molecular de cada subunidade presente na crotoxina (aproximadamente 1:1,5), e portanto, o tratamento com a PLA2 e crotapotina foram iniciados com a mesma concentração molar de 21nM diluída em razão 2 até chegar em 0,33 $\mu$ M. Para verificar se a atividade biológica da toxina foi prejudicada com o processo de separação das subunidades, foram feitos, como controle positivo, os tratamentos com a enzima reconstituída e intacta na maior concentração (21,74nM).

A cinética da atividade citotóxica da crotoxina para as duas linhagens celulares foi avaliada com um ensaio similares aos já descritos (Grupo 03), porém, neste caso, o tratamento foi feito utilizando-se as concentrações de 2,5nM , 5nM e 10nM. A crotoxina foi adicionada à cultura celular de três maneiras diferentes: na primeira, o meio contendo a toxina foi removido e substituído por meio de cultura 30 minutos após a aplicação; no segundo, o meio com a crotoxina foi deixado por 60 minutos e então foi substituído pelo meio de cultura; e no terceiro, considerado como controle positivo, o meio com toxina permaneceu durante todo o período experimental. Como controle negativo, foram mantidos poços com cultura de células livre de tratamento com a crotoxina. Após 48 horas de incubação da placa a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, novamente foi feito o ensaio com MTT para avaliação da viabilidade das células. Com estes ensaios é possível determinar de se a atividade citotóxica da crotoxina é desencadeada nos primeiros minutos de tratamento, ou se é necessário toxina esteja presente durante todo o período de ensaio.

### **3.2.2 Avaliação da viabilidade celular**

A avaliação da viabilidade celular após tratamento com a crotoxina, foi feita com o ensaio com MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide – (USB S.A. Cleveland, Ohio, EUA) (Mosmann, 1983 modificado). Este composto é metabolizado nas mitocôndrias pelas células viáveis formando os cristais de formazan, ou seja, onde o efeito citotóxico for maior haverá pouca formação de cristais. Após duas lavagens com tampão fosfato estéril (100  $\mu$ l/poço), o MTT foi adicionado em concentração de 5mg/mL, sendo 100  $\mu$ l/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 adicionou-se o mesmo volume de DMSO (dimetilsulfóxido) (MERCK S.A., Rio de Janeiro, R.J., Brasil) para

diluição dos cristais de formazan. Uma vez diluídos os cristais, procedeu-se a leitura da placa em um leitor de ELISA (Multiskan EX<sup>®</sup>) em comprimento de onda de 540 nm.

Os valores, em quadruplicata, de densidade óptica (D.O.) obtidos foram então utilizados para o cálculo da viabilidade celular da seguinte maneira:

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{\text{Média D.O. tratamento} \times 100}{\text{Média D.O. controle}}$$

Os resultados obtidos também foram usados para o cálculo da concentração efetiva 50% (EC50) com o uso do programa PHOTOTOX (Phototox, Humboldt University Institute for Biochemistry, Berlim, Alemanha). Este valor corresponde à concentração, em mg/mL, de crotoxina necessária para termos um efeito citotóxico em 50% da população de células tratadas.

### ***Avaliação da morte celular por citometria de fluxo***

Para avaliar o tipo de morte celular envolvida no efeito citotóxico da crotoxina foi realizada a citometria de fluxo com marcação por anexina V-FITC e iodeto de propídeo. Durante a apoptose as células modificam a estrutura de suas membranas plasmáticas para sinalizar seu suicídio ao ambiente, possibilitando sua fagocitose. O aparecimento da fosfatidilserina na superfície celular é uma das mudanças estruturais que ocorre. A anexina V é uma proteína de ligação para fosfolípidos, que na presença de íons de cálcio, exibe alta afinidade para ligação seletiva à fosfatidilserina.

As células B16-F10 e L929 foram tratadas com concentrações intermediárias de crotoxina (4,35 e 8,7 nM), por um período de 18 horas, em placas de cultura de 24 poços (2X10<sup>5</sup> céls./mL) em triplicata. Finalizado o período de tratamento, o meio contendo a toxina foi removido e foi feita a lavagem dupla com PBS, as células

foram tripsinizadas e centrifugadas a 200 G a 4 °C por dez minutos. As células foram então incubadas por 15 minutos no escuro em 100 µL de tampão HEPES (10mM HEPES, 140mM NaCl<sub>2</sub>, 5mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) contendo 2µL de anexina-V-FITC. Então foram adicionados 20µL de uma solução de iodeto de propídeo a 100µg/mL e incubadas a 4 °C por 15 minutos. Por fim, foram adicionados 300µL de tampão HEPES a cada amostra e feita a análise dos níveis de exposição de fosfatidilserina nas superfícies celulares. O percentual de células em apoptose e em necrose foi avaliado pela coloração com anexina V e iodeto de propídeo em citômetro de fluxo FACS Canto BD (BD Franklin Lake, NJ, EUA) e análises feitas com programa FlowJo (Tree Star, Inc, Ashland, OR, EUA). Considerou-se células vivas aquelas iodeto de propídeo e anexina V negativas, em necrose as iodeto de propídeo positivas e anexina V negativas e em apoptose quando iodeto de propídeo negativas e anexina V positivas. Foram lidos 10.000 eventos por repetição.

#### **3.2.4 Avaliação da morte celular por fragmentação do DNA**

Para avaliar o tipo de morte celular envolvida na ação citotóxica da crotoxina, foram feitos ensaios partindo da concentração de 4,35 µM, diluindo-se em razão 2 até 1,09 nM em meio RPMI completo e um controle negativo para cada linhagem. O tratamento foi realizado em garrafas de 25 mm contendo cada uma das duas linhagens celulares. Como controle positivo foi feito um tratamento com Estaurosporina, um indutor de apoptose.

Após tratamento de 24 horas, as células foram removidas das garrafas por tripsinização, centrifugadas a 200 G em temperatura de 4°C por 10 minutos. As células foram então lisadas em tampão Tris (10mmol/L, 0,2% triton x-100, 1mmol/ L EDTA, pH8,0). A extração do DNA foi feita com uma solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1). O Material foi centrifugado a 200 G, por 10 min, desprezando-se o sobrenadante e ressuspenso em solução de acetato de sódio 3 mol/ L, pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto gelado (-20°C) e incubados a -20 °C por 72 horas. Após este período, o material foi ressuspenso em etanol 70% e centrifugados a 200 G por 5 min, sobrenadante descartado e foi aguardado que o material secasse.

Por fim, o material foi ressuspensado em solução TE 1x para aplicação em gel de agarose 1,5 % com brometo de etídio (0,05 µg/ L ). O tempo de corrida utilizado foi o TBE 1X (89 mmol/ L Tris, 2 mmol/ L EDTA, 89 mmol/ L ácido bórico, pH 8,0). A corrida do gel foi feita com 100 V de tensão elétrica.

Para leitura dos resultados o gel foi colocado sob luz ultravioleta.

### **3.3 Análises estatísticas**

Após a obtenção dos valores de viabilidade para as duas linhagens celulares, os dados foram analisados comparando-se os efeitos dos tratamentos entre as B16-F10 e L929 para cada concentração e tempo usados. Para tanto, foi utilizado o programa GraphPad Prism 5 ® usando o método Two-way ANOVA seguido do teste Bonferroni, sendo estabelecido o grau de significância para as características analisadas. Deste modo, quando  $p < 0,001$  (indicado nos gráficos como \*\*\*) , a análise é considerada extremamente significativa, quando estiver entre 0,001 e 0,01 considera-se muito significativa (indicado nos gráficos como \*\*) , quando está entre 0,01 e 0,05 é significativa (indicado nos gráficos como \*) e quando  $p > 0,05$  a análise é considerada não significativa.

Para determinar a concentração efetiva da crotoxina para 50% da população de células (EC50), os valores de densidade óptica obtidos nos ensaios foram analisados no programa Phototox ®, e apresentados como concentração (em microgramas)  $\pm$  DV da toxina (e/ou subunidade) capaz de matar 50% da população celular.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Purificação da Crotoxina

#### 4.1.1 Primeiro passo: cromatografia por gel filtração

Primeiro estágio da purificação da crotoxina feita em coluna de gel filtração: neste momento, foram separadas as seis principais toxinas que compõem o veneno da *C. d. terrificus*, saindo primeiramente as de maior tamanho molecular e, por último, as de menor tamanho configurando a seguinte ordem: convulxina, delta-toxina, giroxina, crotoxina, crotamina e analgésico. A crotoxina elui com resquícios da giroxina e da crotamina, sendo necessário o segundo passo de purificação (Figura 2).

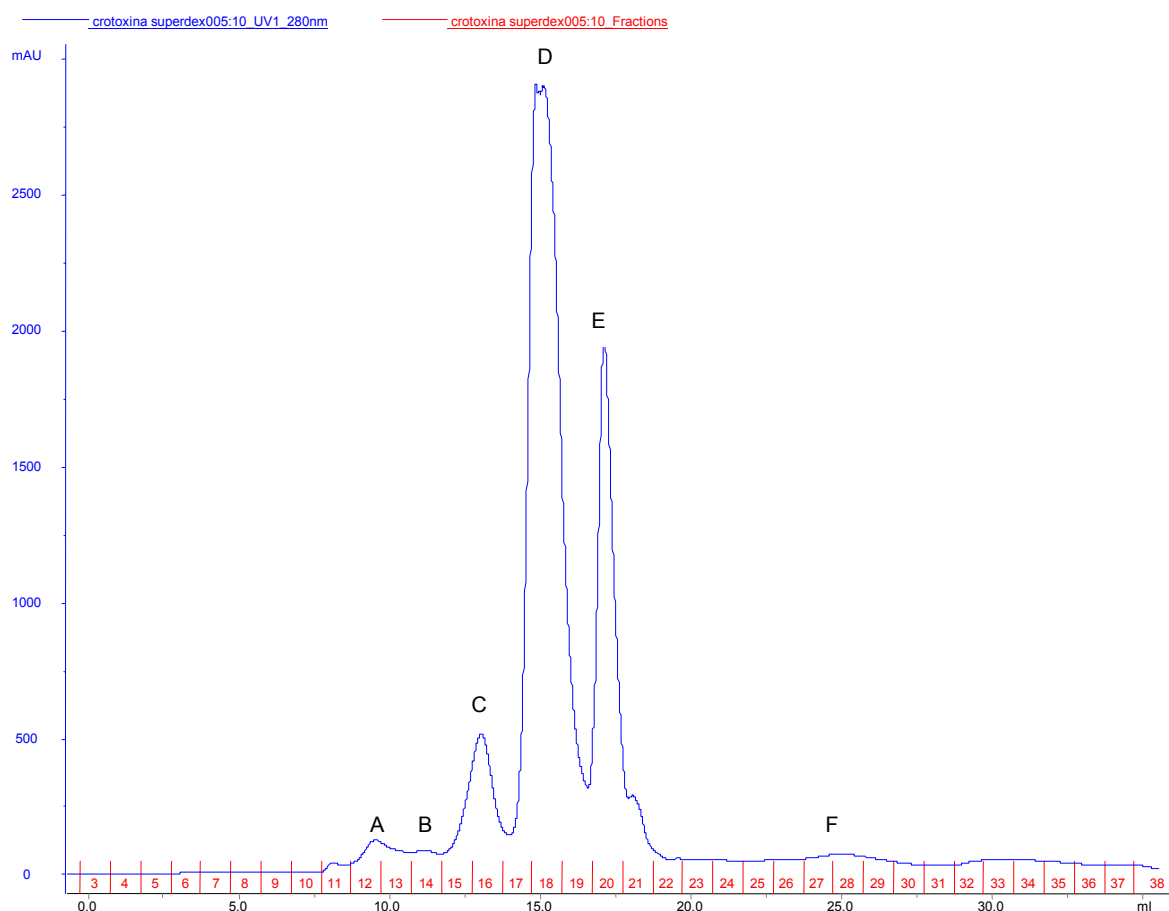


Figura 2 - Primeiro passo para purificação da crotoxina: gel filtração obtendo-se os seguintes picos: (A) convulxina; (B) delta-toxina; (C) giroxina; (D) crotoxina; (E) crotamina e (F) analgésico.

#### 4.1.2 Segundo passo: Troca iônica

O segundo passo de purificação foi feito por troca iônica em coluna Mono Q, é o passo que finalizou a purificação da crotoxina separando-a dos resíduos de giroxina e de crotamina (Figura 3).

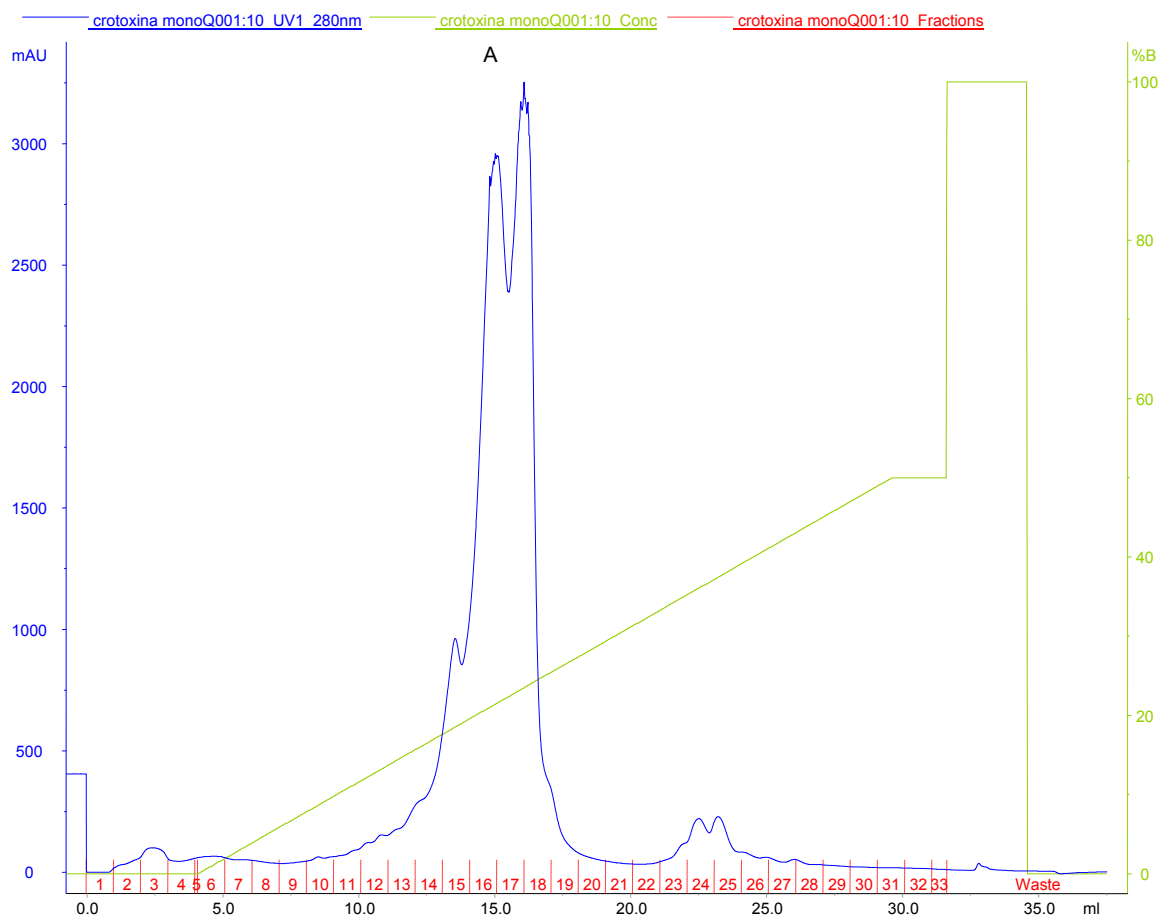


Figura 3 - Segundo passo para purificação da crotoxina em coluna Mono Q representada pelo pico majoritário do cromatograma (A).

### 4.1.3 Separação das subunidades

Para a separação das subunidades da crotoxina foi realizado um terceiro passo de purificação por troca iônica, em coluna Mono S, obtendo dois picos correspondentes a PLA2 e a crotopotina (Figura 4).

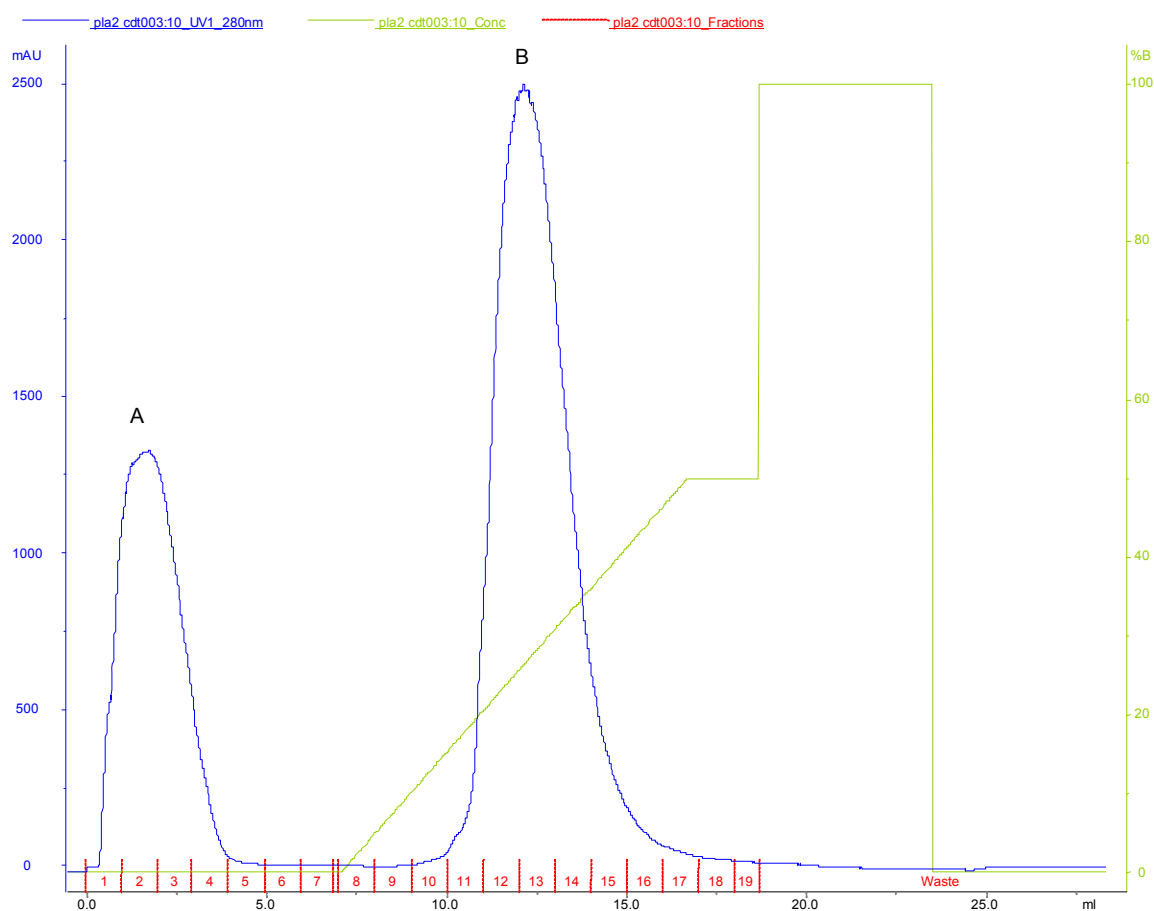


Figura 4 - Cromatograma da separação das subunidades (coluna Mono S): (A) crotopotina e (B) fosfolipase A2.

#### 4.1.4 Dosagem de proteínas por Bradford

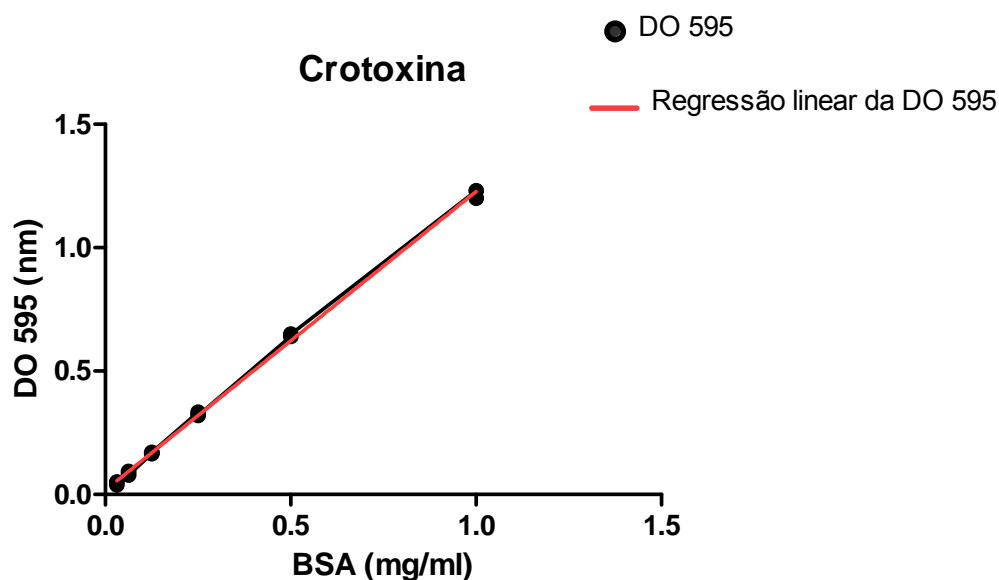


Figura 5 - Curva padrão de BSA

Tabela 1 - Valores da função da curva de BSA

	Coeficiente Linear		Coeficiente Angular		Estatística
	Valor	Erro	Valor	Erro	Ajuste do R <sup>2</sup>
DO 595nm	0,0173	0,006334	1,2101	0,01344	0,9988

Função f(x):

$$y = 1,2101x + 0,0173$$

Aplicando os resultados de absorbância obtidos na fórmula e depois multiplicando-os pelo fator da diluição, foi obtida a dosagem protéica da crotoxina (1,00 mg/mL aproximadamente), da PLA2 (0,879 mg/mL) e da crotopotina (0,277mg/mL).

#### 4.1.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE)

Para determinar a pureza da crotoxina, esta foi submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE - *Sodium Dodecil Sulphate Poliacrilamide Gel Eletrophorese*), na presença de agente redutor. No caso da crotoxina, as subunidades se separam evidenciando-se apenas a banda correspondente à PLA2 de 14 KDa (Figura 6).

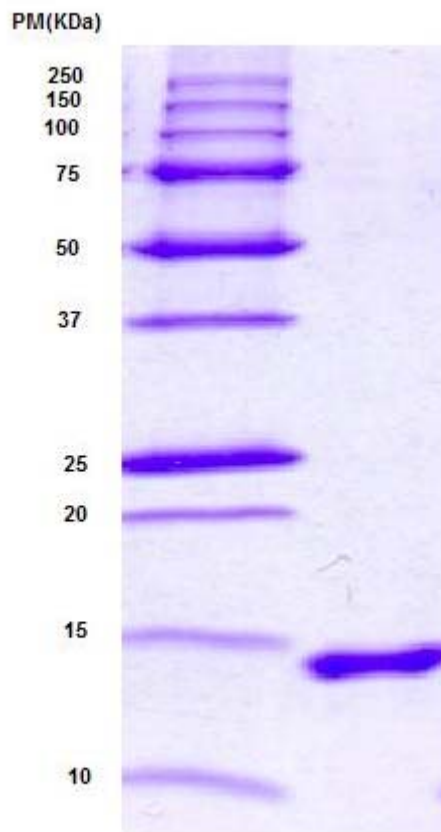


Figura 6 - SDS-PAGE da crotoxina, bandas da esquerda correspondem ao padrão de peso molecular. A banda que aparece a direita corresponde a PLA2 (PM = 14KDa). As bandas do padrão correspondem a 250KDa (miosina), 150KDa ( $\beta$ -galctosidase), 100KDa (fosforilase b), 75KDa (albumina sérica bovina), 50 KDa (ovalbumina), 37KDa (anidrase carbônica), 25 KDa (inibidor de tripsina), 20 KDa (lisozima), 15 KDa (aprotinina), 10 KDa (insulina, cadeia B oxidada).

## **4.2 Ensaio de citotoxicidade**

Para cada ensaio realizado foram feitos os cálculos de viabilidade para a realização das análises estatísticas e confecção dos gráficos.

### **4.2.1 Ensaio com Crotoxina (Grupo 01)**

O tratamento pelo período de seis horas mostrou que o efeito citotóxico da crotoxina já começa para a linhagem tumoral com as maiores concentrações, enquanto as células não tumorais não tem sua viabilidade afetada (Figuras 7, 8 e 9). Este resultado já sugere um efeito citotóxico com maior sensibilidade para as células tumorais. Neste período ainda não é possível estabelecer a EC50.

Somente após um período de tratamento de 24 horas, é possível observar o início da citotoxicidade da crotoxina na linhagem L929, ainda que somente com as maiores concentrações de tratamento. No caso da linhagem tumoral B16-F10, observa-se o efeito citotóxico bastante avançado nas maiores concentrações e inicial nas concentrações menores de tratamento (Figuras 7, 8, 9). Neste momento já é possível estabelecer o valor da EC50 que para as células B16-F10 que foi de 1,13  $\mu\text{M}$  (DP= 2,056), para as células L929 ainda não é possível estabelecer este valor. Novamente pode-se sugerir a maior sensibilidade ao efeito pela célula tumoral.

Após 48 horas de tratamento, a morte celular para a linhagem tumoral ocorreu até nas menores concentrações (Figuras 7, 8, 9).

Foi calculado a EC50 para as duas linhagens, sendo para a B16-F10 a EC50 de 0,08138 nM (DP=0,981) e para a L929 o valor de 6,91nM (DP= 5,713). É possível, com estes resultados, observar que a linhagem tumoral é consideravelmente mais sensível ao efeito citotóxico da crotoxina em relação a linhagem de fibroblastos (cerca de 100 vezes).

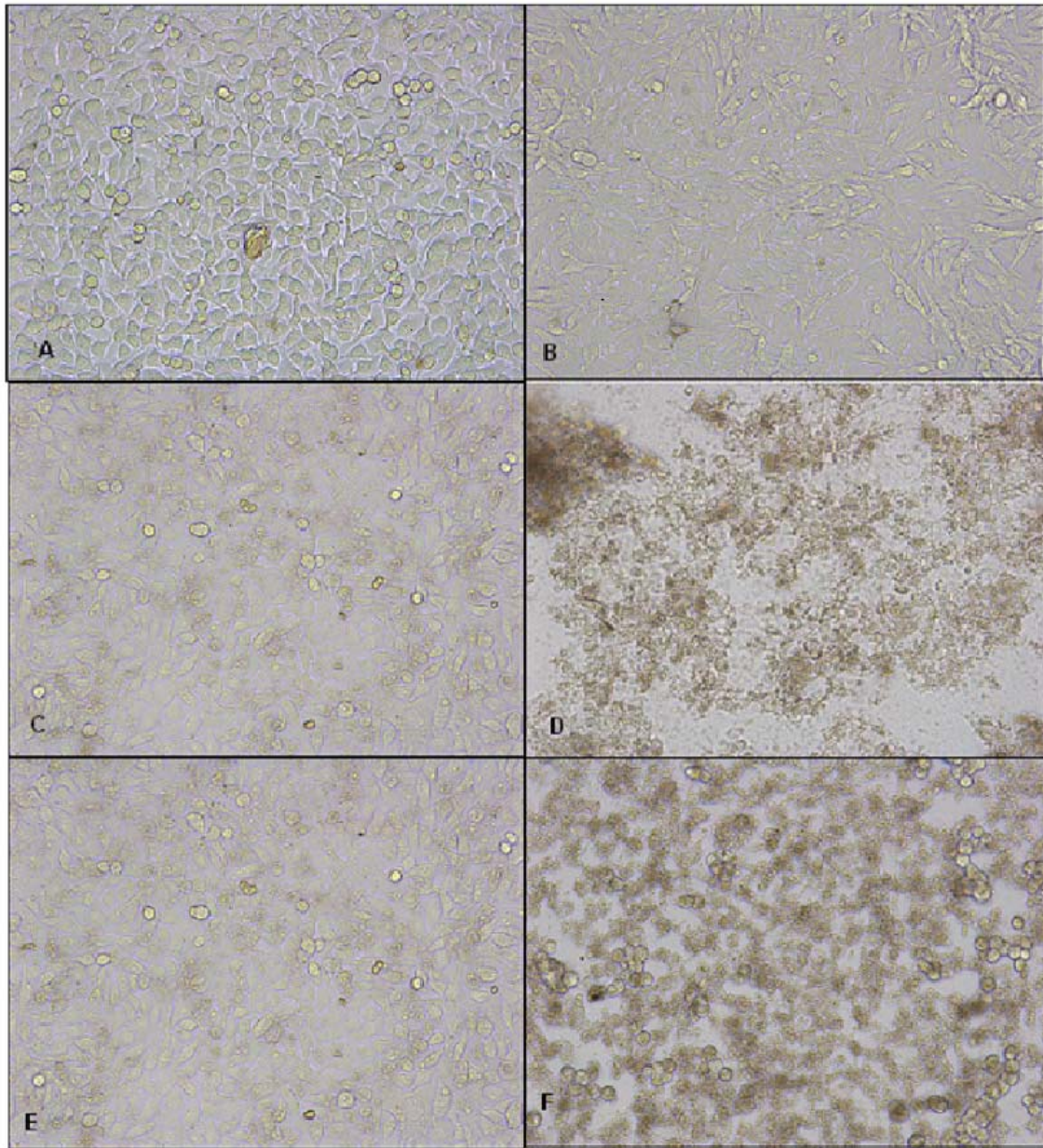


Figura 7 - Micrografias de células B16F10 controle e após tratamento com crotoxina (aumento de 200X). A e B controle 24 e 48 horas respectivamente. C e D tratamento com 8,7nM por 24 e 48 horas respectivamente. E e F tratamento com 4,35nM por 24 e 48 horas respectivamente.



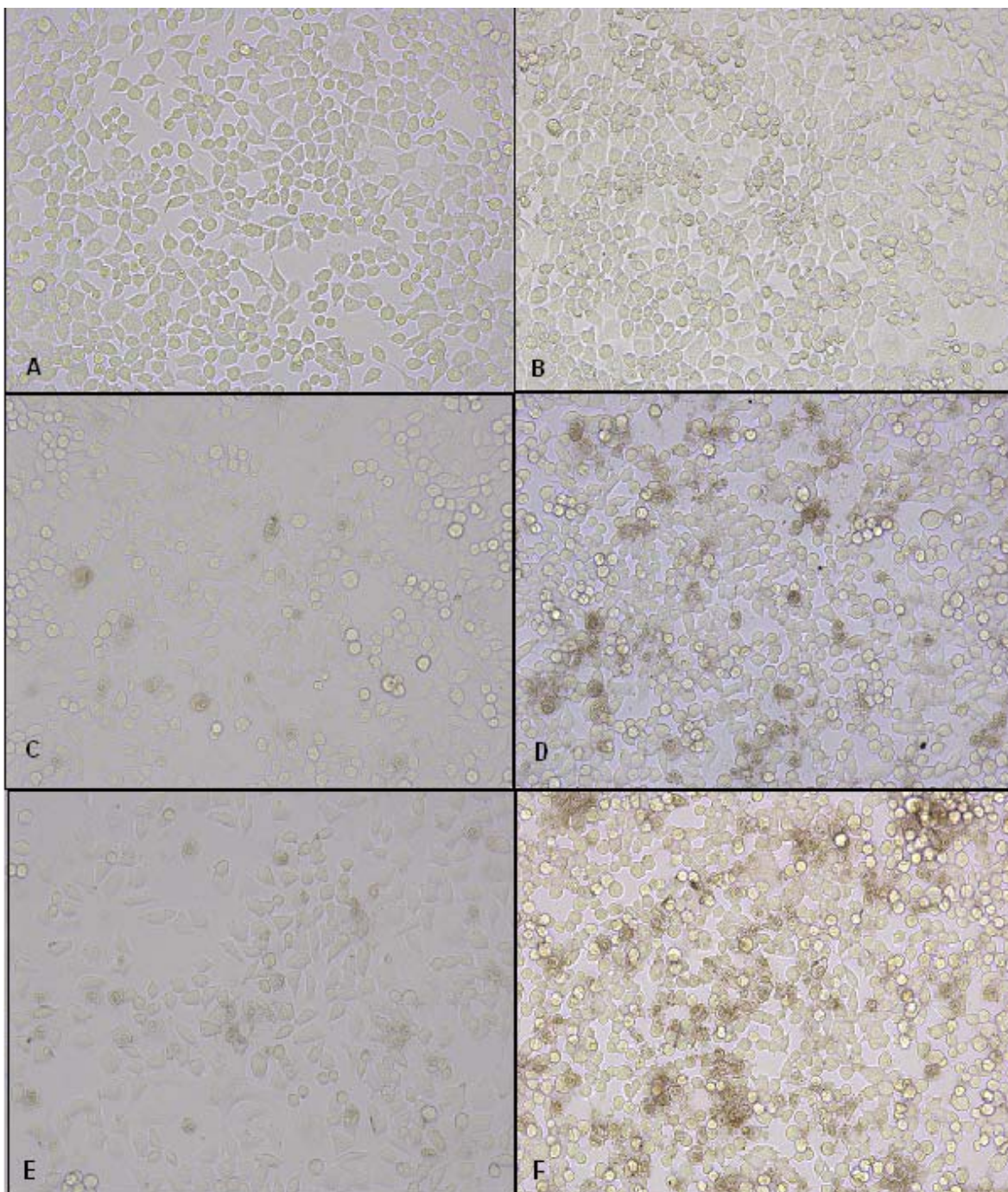
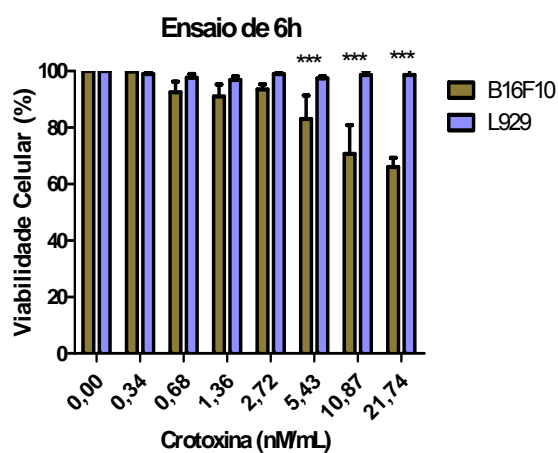
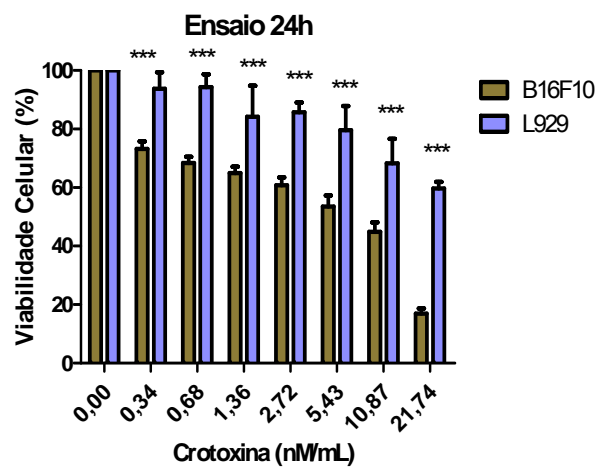


Figura 8 - Micrografias de células L929 controle e após tratamento com crotoxina (aumento de 200X). A e B controle 24 e 48 horas respectivamente. C e D tratamento com 8,7nM por 24 e 48 horas respectivamente. E e F tratamento com 4,35nM por 24 e 48 horas respectivamente.

A



B



C

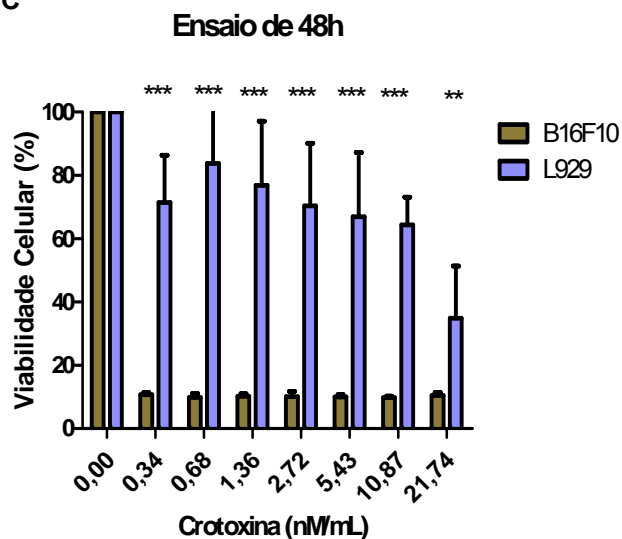


Figura 9-Grupo 01 viabilidade das células B16-F10 e L929 após incubação com crotoxina, ensaio com MTT após 6 h (gráfico A), 24h (gráfico B) e 48 h (gráfico C). Os dados representam a porcentagem de viabilidade das células  $\pm$  desvio padrão (n = 4). Os níveis de significância estão representados por \*, onde  $p < 0,001$  (\*\*\*), p entre 0,001 e 0,01 (\*\*), p entre 0,01 e 0,05 (\*) e quando  $p > 0,05$  não há representação (Two-way ANOVA seguido de teste Bonferroni).

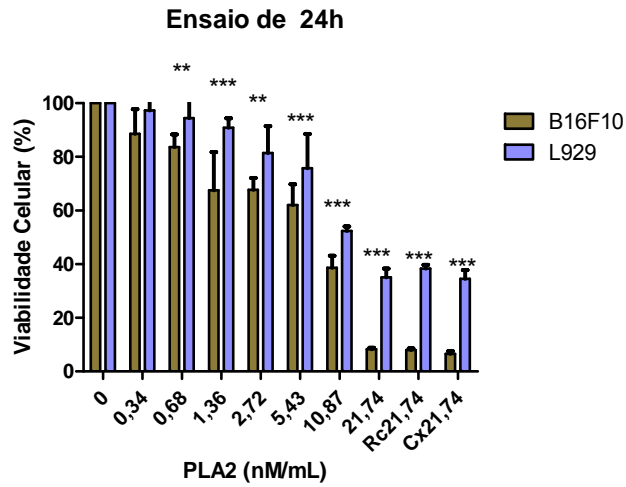
#### **4.2.2 Ensaio com PLA2 e Crotopotina (Grupo 02)**

Foi possível constatar que a PLA2 quando isolada da crotopotina não tem poder citotóxico tal qual a crotoxina intacta (Figura 10). Com estes resultados não foi possível estabelecer a EC50 para a toxina.

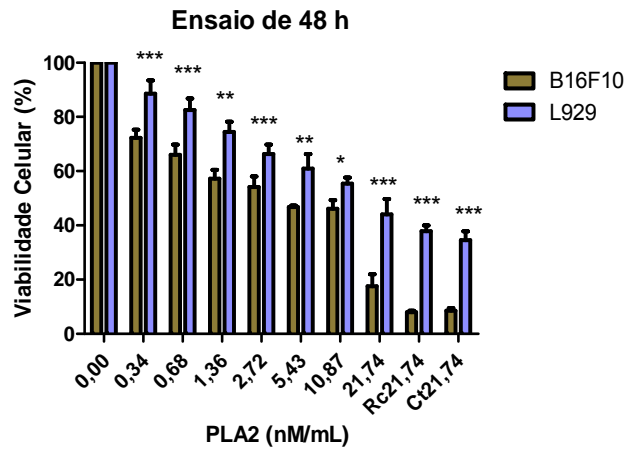
A PLA2 demonstrou ser menos efetiva que a crotoxina, sugerindo que a crotopotina tenha importante papel para o efeito citotóxico nas células tumorais. Os ensaios com as subunidades tiveram como controle positivo o tratamento com a toxina reconstituída (Rc), assim como com a crotoxina intacta (Ctx) demonstrando que o processo de isolamento das subunidades não afetou a sua atividade biológica (Figura 10).

A incubação das células com a crotopotina (Figura 10) confirmou o papel carreador da molécula, visto que não foi constatado efeito citotóxico com o experimento.

A



B



C

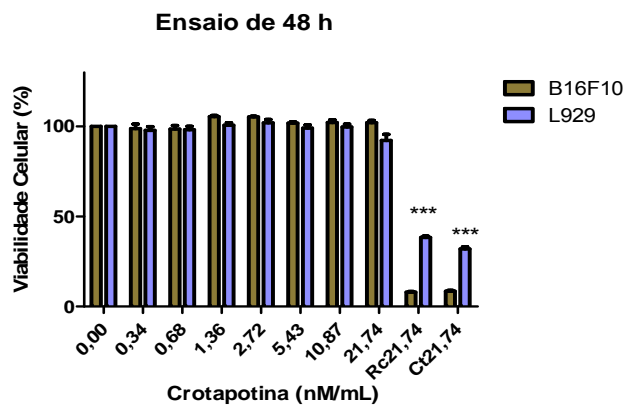


Figura 10 - Grupo 02 viabilidade das células B16-F10 e L929 após incubação com PLA2 24h(A) e 48h (B) e crotapotina 48h (C). Viabilidade celular determinada por ensaio com MTT. Os dados representam a porcentagem de viabilidade das células  $\pm$  desvio padrão (n = 4). Os níveis de significância estão representados por \*, onde  $p < 0,001$  (\*\*\*), p entre 0,001 e 0,01 (\*\*), p entre 0,01 e 0,05 (\*) e quando  $p > 0,05$  não há representação (Two-way ANOVA seguido de teste Bonferroni).

### **4.2.3 Cinética (Grupo 03)**

Os resultados obtidos com o ensaio de cinética (dados não mostrados) da crotoxina sugeriram que o efeito citotóxico é desencadeado a partir dos primeiros trinta minutos de contato da toxina com as células. Desta maneira, conclui-se que não há necessidade da permanência da crotoxina durante todo o período de tratamento para obter os efeitos esperados.

### **4.3 Avaliação da morte celular por citometria de fluxo**

Foi realizado um ensaio preliminar para determinar o tipo de morte celular envolvida no efeito citotóxico da crotoxina. Após tratamento com a toxina (4,35 e 8,7 $\mu$ M) por período de 18 horas, as duas linhagens celulares foram avaliadas por citometria de fluxo. Para tanto, foi usada a marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Os resultados obtidos (dados não apresentados) sugeriram que as concentrações utilizadas no tratamento levaram à morte das células por necrose sem passar pelo processo de apoptose e que, concordando com os ensaios de viabilidade usando o MTT, as células B16-F10 apresentaram maior sensibilidade à toxina.

### **4.4 Avaliação da morte celular por fragmentação de DNA**

A extração do DNA e corrida em gel de agarose, possibilitou visualizar que ocorreu a morte celular por apoptose (pela fragmentação do DNA) nas menores concentrações (1,09 e 2,17 $\mu$ M). A qualidade do gel obtido não permitiu a obtenção de uma imagem de boa qualidade para documentação do resultado, seria necessário uma repetição do ensaio com concentrações maiores de células nos tratamentos, melhorando a qualidades das bandas do gel.

## 5 DISCUSSÃO

A crotoxina mostrou efeito citotóxico altamente significativo e muito maior para as células de melanoma murino, enquanto os fibroblastos normais foram afetados somente nas maiores concentrações, nos ensaios de 6, 24 e 48 horas de incubação com a toxina (Figuras 7, 8 e 9). Este fato sugere que exista maior sensibilidade das células tumorais para a toxina. Os resultados dos ensaios de 48 horas mostraram que a crotoxina é altamente tóxica para as células de melanoma induzindo a morte celular até em concentrações mais baixas (0,339nM) enquanto os fibroblastos somente foram afetados em concentrações 30 vezes maiores (10,87nM) (Figuras 7, 8 e 9). Os ensaios de 24 horas indicam que o efeito citotóxico não é imediato, já que não foram observadas alterações para as concentrações que provocam a morte celular nos experimentos de 48 horas. Os ensaios com a PLA2 e a crotapotina (Figura 10) mostraram que a subunidade catalítica produz atividade tóxica para as células tumorais, porém a concentração necessária para tal efeito é muito maior do que para a toxina inteira. Apesar de dissociada da crotapotina, a maior sensibilidade das células tumorais foi preservada, já que as células não tumorais não foram afetadas.

Donato et al. (1996) estudaram a atividade da fosfolipase A2 proveniente da crotoxina em células que exibem diferentes níveis de receptores EGF (EGFr), concluindo que as células tumorais, que exibiam maior expressão de EGFr, foram mais afetadas pela toxina. A lenta cinética demonstra que é necessário um longo período de exposição ao tratamento para que o efeito aconteça.

Corin et al. (1993) testaram o efeito citotóxico da crotoxina somente em uma linhagem tumoral (eritroleucemia murina). Para esta variedade, encontraram uma EC50 que variou de 3,0 a 5,0 µg/ml, independente da fase de crescimento em que células. Os autores também concluíram que existe uma interação específica entre a crotoxina e as células tumorais usadas, pois, ao compararem a fosfolipase A2 do veneno de *Crotalus durissus terrificus* com a fosfolipase A2 proveniente do veneno de *Crotalus atrox*, esta apresentou efeito citotóxico 86 vezes menos potente.

Em um estudo comparativo entre células de queratinócitos de epiderme (NHEK-47) e três linhagens de tumores humanos, carcinoma de ducto mamário (Hs

578T), glioblastoma (U-87 MG) e adenocarcinoma de pulmão (SK-LU-1), Rudd et al. (1994) tratando-as com crotoxina por 72h (doses de 2,3 a 30,0µg/mL) concluíram que as linhagens SK-LU-1 e Hs 578T tiveram maior sensibilidade ao tratamento (alta redução da viabilidade celular após tratamento com as menores concentrações de crotoxina) e a linhagem U-87 MG só foi afetada de maneira significativa com doses maiores. Corroborando com os resultados obtidos neste trabalho, a linhagem não tumoral (NHEK-47) foi menos afetada pela crotoxina.

Em 2007 Yan et al. utilizando várias concentrações de crotoxina em uma linhagem de células de câncer de mama (linhagem MCF-7), concluíram que a inibição da viabilidade das células variou em relação ao tempo e à dose usados. Com 24h de tratamento a taxa inibitória foi de 28,5% e ao prolongar o tratamento para 48h a taxa inibitória subiu para 51,61% alcançando 57,04% após 72h de tratamento usando uma concentração de 100µg/mL. Quando os autores trataram as células com 50µg/mL o efeito inibitório foi de apenas 33,82% após 72h.

É importante salientar que a maior sensibilidade das células tumorais a crotoxina é uma característica bastante desejável, pois em um tratamento para o câncer deve-se buscar atingir somente as células tumorais evitando danos aos tecidos saudáveis e efeitos colaterais.

Vários estudos demonstraram que a crotoxina tem atividade antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*, interferindo no crescimento do tumor modificando seletivamente os processos celulares associados ao crescimento celular (Corin et al., 1993; Newman et al., 1993; Donato et al., 1996; Sampaio et al., 2010).

A citotoxicidade da crotoxina é inicialmente mediada por uma interação com sítios de ligação altamente específicos na superfície celular (Montecucco et al., 2008) envolvendo a sua atividade de fosfolipase A2 (Corin et al., 1993). Estudos feitos por Donato et al. (1996) sugeriram que receptores transmembranares como os receptores do fator de crescimento (EGFr) seriam os alvos da atividade anti-proliferativa da toxina e que esta atividade seria dependente da crotapotina. Recentemente, Yan et al. (2006) demonstraram que a crotoxina causa um colapso do potencial de membrana mitocondrial, que libera citocromo c ativando a caspase-3 em células de leucemia mielóide crônica, sugerindo o envolvimento de mecanismos apoptóticos na morte celular induzida pela crotoxina.

A atividade antitumoral da crotoxina também foi testada *in vivo* por Newman et al. (1993) com injeções por via intramuscular diárias da crotoxina combinada com



a cardiotoxina (VRCTC-310). Tal composto é mais eficaz nos tecidos tumorais e reduz as possibilidades de efeitos colaterais. Os autores concluíram que o composto inibiu o crescimento de carcinoma pulmonar de Lewis e carcinoma mamário humano (linhagem MX-1) em 83% e 69% respectivamente. Os animais tratados foram submetidos a um protocolo de indução de tolerância às toxinas, aplicando-se doses crescentes do composto ao longo do período de tratamento ou por período anterior à inoculação dos tumores e início do tratamento. Este procedimento possibilitou a redução dos efeitos colaterais provocados pelas toxinas, principalmente a redução da massa corporal.

Em nosso trabalho, a crotoxina apresentou um efeito antitumoral mais eficaz do que as subunidades, salientando a necessidade da crotapotina para o direcionamento da atividade de fosfolipase da crotoxina. Observamos que o tratamento das células com a fosfolipase em concentrações de proporção molar iguais aos tratamentos feitos com a crototoxina não demonstraram efeito citotóxico tão potente. Foi necessário aumentar as concentrações dos tratamentos para obter resultados similares e determinar um efeito citotóxico para 50% da população de células.

A atividade antitumoral de fosfolipase A2 de veneno de abelha (bv- sPLA2) associada ao fosfatidilinositol-(3,4)-bifosfato (PtdIns(3,4) P2) foi estudada por Putz et al. (2006, 2007). Esta PLA2 pertence a uma família de enzimas fosfolipase que catalisam a hidrólise da ligação do ácido graxo na posição Sn-2 da membrana glicero-3-fosfolipídica resultando em diversos efeitos biológicos. Os autores trataram células de carcinoma de rim (linhagem A498), carcinoma mamário humano (linhagem T-47D), carcinoma de próstata humano (linhagem DU145) e células epiteliais de brônquios humanos (linhagem BEAS-2B) com bv- sPLA2. Um comportamento similar ao da fosfolipase A2 da crotoxina foi demonstrado, pois quando o tratamento das linhagens celulares foi feito com as duas substâncias isoladas a citotoxicidade foi baixa, enquanto com o tratamento feito com as duas substâncias associadas houve aumento do poder de citotoxicidade. Os autores também observaram que os produtos da lise celular estimularam a resposta imune induzindo a maturação de monócitos. Como os sinais induzidos pelo EGF foram anulados, os autores consideraram a possibilidade que os receptores de EGF (EGFr) sejam alvos do tratamento. Embora não tenha sido esclarecida se os EGFr foram internalizados ou se foi anulada sua função, provou-se que a sinalização



induzida por estes receptores foi interrompida. Também foi constatada a alteração da morfologia celular com o aumento da permeabilidade da membrana sugerindo sua ruptura.

A PLA2 tem considerável potencial como tratamento para o câncer de mama em decorrência de sua seletividade por células que expressam altos níveis de EGFR, porém seu uso pode ser limitado já que apresenta como efeito colateral a sua neurotoxicidade. Considerando esta característica, Ferguson e Duncan (2009) criaram um conjugado PLA2 do veneno de abelha com dextrina ( $\alpha$ -1,4 poli(D-glucose)) como carreadora. A dextrina é usada clinicamente como solução para diálise peritoneal por não ser tóxica ou imunogênica. É rapidamente degradada pela  $\alpha$ -amilase, formando os dissacarídeos maltose e isomaltose. A  $\alpha$ -amilase pode apresentar-se em níveis 85 vezes maiores no ambiente tumoral dando a oportunidade para a ativação do conjugado PLA2- dextrina no interstício tumoral. Foi comparado o efeito citotóxico da bv-sPLA2 livre dextrina e do conjugado bv-sPLA2 com a dextrina em células de melanoma murino (B16-F10), câncer de cólon humano (HT29) e câncer de mama humano (MCF-7). Como esperado, a dextrina não apresentou citotoxicidade e a PLA2 foi citotóxica para todas as linhagens. O conjugado também foi citotóxico para todas as linhagens de maneira dose dependente com tendência de aumento da citotoxicidade quando comparada a PLA2 livre. Tanto a PLA2 conjugada como a livre foram mais tóxicas para a HT29 que possui maior nível de expressão de EGFR. As enzimas PLA2 têm preferência por alguns fosfolipídios (fosfatidilcolina, fosfatidiletolmina e esfingomiélna) encontrados em níveis maiores em células cancerígenas que explicaria as diferenças de citotoxicidade para as linhagens celulares.

Donato et al. (1996), notaram que a crotoxina causa maior supressão de crescimento para as células que expressam maiores níveis intrínsecos de EGFR. Neste caso, a linhagem de carcinoma de reto DiFi, que expressa 100 vezes mais EGFR que a linhagem HT29, demonstrou 20 vezes mais sensibilidade à crotoxina.

A biossíntese de lipídeos alterada e a lipogênese desregulada são características do câncer, conseqüentemente estas vias são estudadas como alvos terapêuticos e as enzimas lipolíticas PLA2 são estudadas como novos agentes anticancerígenos (Ferguson et al., 2010).

A avaliação do tipo de morte celular envolvida no efeito citotóxico da crotoxina mostrou a necessidade de dar continuidade a estes estudos utilizando

menores concentrações, embora tenha sido observada a morte de uma população maior de células B16-F10 em relação às L929. O ensaio realizado neste trabalho indicou a maior porcentagem de morte das células por necrose, resultado diferente de outros autores que utilizaram o veneno total e a crotoxina (Yan et al., 2006, 2007; Tamietti et al., 2007; Soares et al., 2010). Tais autores utilizaram concentrações inferiores a 100µg/mL, além de trabalharem com outras linhagens celulares.

Além de estar presente em venenos como os de serpentes ou de abelhas, a PLA2 pode ser encontrada em secreções pancreáticas, exudatos inflamatórios do líquido sinovial e interstício de alguns tumores. Todas partilham similaridade em sua estrutura primária, hidrolisam a porção sn – 2 dos glicerofosfolipídeos de membrana liberando o ácido araquidônico e frequentemente causam efeito inflamatório e analgésico. Estas enzimas tem sido estudadas como agentes antitumorais em drogas nanoparticuladas como formulações lipossomais e conjugados PEG (Ferguson et al., 2010).

É importante investigar o mecanismo de ação da fosfolipase A2 e da crotoxina, pois podem envolver múltiplos alvos celulares. A maior parte das pesquisas sugerem que a PLA2 age na superfície celular, porém, inúmeros fatores sugerem que a enzima poderia agir preferencialmente na membrana endossomal ou em outras membranas intracelulares (Ferguson et al., 2010).

## 6 CONCLUSÃO

A crotoxina teve efeito citotóxico para as duas linhagens de células tratadas, sendo a linhagem tumoral consideravelmente mais sensível à toxina em todos os tempos de tratamento (6, 24 e 48 horas de incubação). Estes resultados demonstram uma maior sensibilidade das células B16-F10 para a crotoxina.

A PLA2 também demonstrou efeito citotóxico para as duas linhagens, no entanto não com a mesma intensidade; indicando que a citotoxicidade da toxina depende diretamente da presença da chaperonina (crotapotina) para que o efeito se manifeste integralmente. Não foi constatado efeito citotóxico nas células tratadas com a crotapotina isolada.

A partir dos valores de EC50%, foi possível observar que as células tumorais se mostraram cerca de 100 vezes mais sensíveis à ação da crotoxina do que a linhagem celular utilizada como controle negativo, abrindo perspectivas futuras do uso desta toxina ou de análogos e/ou porções da mesma, como potencial agente terapêutico.

## REFERÊNCIAS\*

Abbas AK, Kumar V, Fausto N. Patologia: bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. 1616 p.

Adam JK, Odhav B, Bhoola KD. Immune responses in câncer. *Pharmacology and Therapeutics*. 2003;1:1-20.

Alexander G, Grathusen J, Zepeda H, Schwartzman R J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* is a thrombin-like enzyme. *Toxicon*.1988;26: 953-60.

Altieri DC, The molecular basis and potential role of survival in cancer diagnosis and therapy. *Molecular Medicine*. 2001;7(12):1-6.

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

Awada A, Cardoso F, Atalaya G, Giuliani R, Piccart, MJ. The popeline of new anticancer agents for breast cander treatment, 2003. *Oncology and Hematology*. 2003;48:45-63.

Azevedo Marques MM, Cupo P, Hering SE. *Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos* - Samuel Schwartsman. Rio de Janeiro: Sarvier; 1992.

Barraviera B. *Venenos Animais: Uma visão integrada*. Rio de Janeiro: Editora de Publicação Científica LTDA; 1994. cap. 20. p. 281-95.

Blagosklonny MV. Apoptosis, proliferation, differentiation: in search of order. *Cancer Biology*. 2003;13:97-105.

Bohn I, Schild H. Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Molecular Imaging and Biology*. 2003;5(1):2-14.

\* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org>[2007 May 22].

Bold RJ, Termulen PM, Macconey DJ. Apoptosis, cancer and cancer therapy. *Surgical Oncology*. 1997;6(3):133-42.

Bon C, Changeux JP, Jeng TW, Fraenkel-Conrat H. Postsynaptic effect of crotoxin and its isolated subunits. *Eur. J. Biochem*. 1979;99:471- 81.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72:248-54.

Bunz F. Cell death and cancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*. 2001;1: 337-41.

Collins K, Jacks T, Pavletich NP. The cell cycle and cancer. *PNAS*. 1997;94:2776-8.

Costa LA, Miles H, Araujo CE, Gonzalez S, Villarrubia VG, Tumor regression of advanced carcinomas following intra- and/or peri-tumoral inoculation with VRCTC-310 in humans: preliminary report of two cases. *Immunopharmacology Immunotoxicology*. 1998;20:15-25.

Corin RE, Viskatis LJ, Vidal JC, Etcheverry MA. Cytotoxicity of crotoxin on murine erythroleukemia cells *in vitro*. *Investigational New Drugs*. 1993;11:11-5.

Cotrans RS, Kumar V, Collins T. *Robbins patologia estrutural e funcional*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000;14-22;233-93.

Cura EC, Blanzaco DP, Brisson C, Cura MA, Cabrol R, Larrateguy L et al. Phase I and Pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA2, NSC-62424) in patients with advanced cancer. *Clinical Cancer Research*. 2002;8:1033.

Dagli MLZ, Loris SCS, Guerra JL. Effect of  $\beta$ -carotene on development of the Ehrlich tumor in mice. *Life Science*. 2002;71:717-24.

David JP, David JM. *Plantas medicinais: Fármacos derivados de plantas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2004;53:153-9.

Decker RH, Levin J, Kramer LB, Dai Y, Grants S. Enforce expression of the tumor suppressor p53 renders human leukemia cells (V937) more sensitive to 1-( $\beta$ -D-arabino-furanosyl) cytosine (ara-c) induced apoptosis. *Biological Pharmacology*. 2003; 65:1997-2008.

Dennis EA. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(18):13057-60.

Doley R, Kini RM. Protein Complexes in Snake Venom. *Cellular and Molecular Life Science*. 2009;66:2851-71.

Donato NJ, Martin CA, Perez M, Newman RA, Vidal JC, Etcheverry M. Regulation of epidermal growth factor receptor activity by crotoxin, a snake venom phospholipase A2 toxin: a novel growth inhibitory mechanism. *Biochem Pharmacol*. 1996;51:1535-43.

Ferguson EL, Duncan R. Dextrin-Phospholipase A2: synthesis and evaluation as a bioresponsive anticancer conjugate. *Biomacromolecules*. 2009;10:1364-8.

Ferguson EL, Richardson SCW, Duncan R. Studies on the mechanism of action of dextrin-phospholipase A2 and its suitability for use in combination therapy. *Molecular pharmaceutics*. 2010;7:510-21.

Fidler IJ. Selection of successive tumor lines for metastasis. *Nature new biology*. 1973;242:148-9.

Fidler IJ. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival *in vivo*. *Cancer research*. 1975;35(1):218-24.

Fraenkel-Conrat H, Jeng TW, Hsiang M. Biological activities of crotoxin and amino acid sequence of crotoxin B. *Natural Toxins*. Oxford: Pergamon; 1980. p. 561-7.

Franklin CC, Krejsa CM, Pierce R, White CC, Fausto N, Kavanager JJ. Caspase 3 dependent cleavage of the glutamate-L cysteine ligase catalytic subunit cleaning apoptotic cell death. *American Journal of Pathology*. 2002;160(5):1887-94.

Garcia F, Toyama MH, Castro FR, Proença PL, Marangoni S, Santos LMB. Crotopotin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE2 synthesis. *Toxicol*. 2003;42:433-7.

Gebrim LC, Marcussi S, Menaldo DL, Menezes CSR, Nomizo A, Hamaguchi A, Silveira-Lacerda EP, Homsí-Brandeburgo MI, Sampaio SV, Soares AM, Rodrigues VMR. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. *Biologicals*. 2009;37:222-9.

Gruber C, Heukel M, Budash W, Belka C, Jendrossek V. Involvement of tyrosine kinase p56/LCK in apoptosis induction by anticancer drug. *Biochemical Pharmacology*. 2004;20:1-14.

Huang P, Olf A. Signaling pathways in apoptosis as potential targets for cancer therapy. *Cell Biology*. 2001;11(8):11-22.

Huigsloot M, Tijdens IB, Mulder GJ, Walter BV. Differential regulation of doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction apoptosis by Bcl2 in mammary adenocarcinoma (MTL313) cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 227(39):35869-79.

Instituto Nacional do Câncer (INCA) [homepage on the internet]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. [2010 set 20]

Jubb KV, Kennedy NC. Transmissible venereal tumor canine. *Pathology of Domestic Animals*. 1993;3:452.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972;26(4): 239-57.

Kini RM, Evans HJA. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A2. *Toxicon*. 1989;27(6):613-35.

Kirkin V, Joos S, Zorning M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004;1664:229-49.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.

Landucci ECT, Antunes G, Donato JL, Faro R, Hyslop S, Marangoni S, Oliveira B, Cirino G, De Nucci G. Inhibition of carrageenan-induced rat paw oedema by

crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. *Br J Pharmacol.* 1995; 114: 578-83.

Lane SD. p53 from pathway to therapy. *Carcinogenesis.* 2002;25(7):1077-81.

Lehninger AL. *Princípios de bioquímica.* 6. ed. São Paulo: Sarvier; 2004. 1232 p.

Lewis JM, Truong TN, Schwants MA. Integrins regulate the apoptotic response to DNA damage through moderation of p53. *Cell Biology.* 2002;99(6):3627-32.

Leytin V, Freedman J. Plated apoptosis instored plated concentrates and other models. *Transfusion and Apheresis Science.* 2003;28:285-95.

Li M, Zhou JY, Ge Y, Matherly LH, Wu GS. The phosphatase M KP1 is a transcriptional target of p53 involved in cell cycle regulation. *The Journal of Biological Chemistry.* 2003;278(42):41059-68.

Lomonte B, Angulo Y, Rufini S, Cho W, Giglio JR, Ohno M, Daniele JJ, Geoghegan P, Gutierrez JM. Comparative study of cytotoxic activity of myotoxic phospholipase A2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells *in vitro*. *Toxicol.* 1999;37:145-58.

Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 2000;21(3):485-95.

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.* 2002;277(51):49374-82.

Miller AJ, Mihm MC. Mechanisms of disease: melanoma. *The New England Journal of Medicine.* 2006;355:51-65.

Moffat J, Hashimoto M, Kojima A, Kenned DO, Murakami A, Koshimizu K, Ohigashi H, Yuasa IM. Apoptosis induced by acetoxycarbazole acetate in Erlich ascites tumor cells is associated with modulation. *Carcinogenesis.* 2000;21(12):2151-7.

Montecucco C, Gutiérrez JM, 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.* 2008;65:2897-912.



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

Newman RA, Vidal JC, Viskatis LJ, Johnson J, Etchverry MA. VRCTC-310- A novel compound of purified animal toxins separates antitumor efficacy from neurotoxicity. *Investigational New Drugs*. 1993;11:151-9.

Nicolson GL, Brunson KW, Fidler IJ. Specificity of arrest, survival and growth of selected metastatic variant cell lines. *Cancer research*. 1978;38:4105-11.

Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlov I, Lee HW, Cordon-Cardo C, Pinho RA. The Ink4a Tumor Suppressor Gene Product, p19Arf, Interacts with MDM2 and Neutralizes MDM2's Inhibition of p53. *Cell*. 1998;96:713-23.

Putz T, Ramoner R, Gander H, Rahm A, Bartsch G, Thurnher M. Antitumor action and immune activation through cooperation of bee venom secretory phospholipase A2 and phosphatidylinositol-(3,4)biphosphate. *Cancer Immunol. Immunother*. 2006;55:1374-83.

Putz T, Ramoner R, Gander H, Rahm A, Bartsch G, Bernardo K, Ramsay S, Thurnher M. Bee venom secretory phospholipase A2 and phosphatidylinositol-homologues cooperatively disrupt membrane integrity, abrogate signal transduction and inhibit proliferation of renal cancer cells. *Cancer Immunol. Immunother*. 2007;56:627-40.

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*. 1999;456:113-8.

Rangel-Santos A, Lima C, Lopes- Ferreira M, Cardoso DF. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. 2004;44:609-6.

Reed JC, Warner L. Mechanisms of apoptosis. *American Journal of Pathology*. 2000; 57(5):1415-30.

Renner C, Amberger A, Konwalinka G, Kofler R, Gnaiger E. Changes of mitochondrial respiration content and cell size after induction of apoptosis in leukemia cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003;20:1-9.

Ricotti C, Bouzari N, Agadi A, Cockerell CJ. Malignant skin neoplasms. *Medical Clinics of North America*. 2009;93:1241-64.

Rizzo MT, Nguyen E, Aldo-Benson M, Lambeau G. Secreted phospholipase A2 induces vascular endothelial cell migration. *Blood*. 2000;96:3809-15.

Roninson IB, Broud EV, Chang B. It's not apoptosis, then what? Treatment- induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug resistance*. 2002;4:303-13.

Rother J, Jones D. Molecular markers of tumor progression in melanoma. *Current Genomics*. 2009;10(4):231-9.

Sampaio SC, Sousa-e-Silva MCC, Borelli P, Curi R, Cury Y. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. *J. Leukoc. Biol*. 2001;70:551-8.

Sampaio SC, Brigatte P, Sousa-e-Silva MC, Dos-Santos EC, Rangel-Santos AC, Curi R, Cury Y. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. *Toxicon*. 2003;41:899-907.

Sampaio SC, Rangel-Santos AC, Peres CM, Cury R, Cury Y. Inhibitory effect of phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. *Toxicon*. 2005;45:671-6.

Sampaio SC, Alba-Loureiro TC, Brigatte P, Landgraf RG, Santos EC, Curi R, Cury I. Lipoxygenase – derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. *Toxicon*. 2006a;47:313-21.

Sampaio SC, Santos MF, Costa EP, Rangel-Santos AC, Carneiro SM, Curi R, Cury Y. Crotoxin induces actin reorganization and inhibits tyrosine phosphorylation and activity of small GTPases in rat macrophages. *Toxicon*. 2006b;47:909-19.

Sampaio SC, Hyslop S, Fontes MRM, Franceschi JP, Zambelli VO, Magro AJ, Brigatte P, Gutierrez VP, Cury Y. Crotoxin: novel activities for a classic  $\beta$ -neurotoxin. *Toxicon*. 2010;55:1045-60.

Sano-Martins IS, Tomy SC, Campolina D, Dias MB, Castro SCB, Solsa e Silva MCC, Amaral CFS, Rezende NA, Kamiguti AS, Warrel DA, Theakston RDG Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. Q J Med. 2001;94:551-9.

Sarasin M. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. Reviews in Mutation Research. 2003;544:99-106.

Schaloske, RH, Dennis EA. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. Biochim Biophys Acta, 2006;1761(11):1246-59.

Shimada K, Matsuyoshi S, Nakamura M, Ishida E, Kisli M, Konishi N. Phosphorylation of FADD is critical for sensitivity to anticancer drug-induced apoptosis. Carcinogenesis. 2004;25(7):1089-97.

Silva JAA. Aspectos Estruturais e de Atividade Biológica da Giroxina (enzima trombina similar) do Veneno da Cascavel Brasileira, *Crotalus durissus terrificus*. [dissertação (Mestrado)]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2004.

Slotta KH, Frankel-Conrad H. Estudos químicos sobre venenos ofídicos. Memórias do Instituto Butantan. 1938.

Smith WS, Dewitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. Annu Rev Biochem. 2000;69:145-82.

Soares MA, Pujatti PB, Fortes –Dias CL, Antonelli L, Santos RG. *Crotalus durissus terrificus*. Venom as a source of antitumoral agents. The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases. 2010;16:480-92.

Soini Y, Pahkko P, Lehto VP. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. American Journal of Pathology. 1998;153(4):1041-53.

Tamietti BP, Damatta RA, Cogo JC, Da Silva NS, Mittmann J, Pacheco- Soares C, Cytoskeleton endoplasmic reticulum and nucleus alterations in CHO-K1 cell line after *Crotalus durissus terrificus* (south american rattlesnake) venom treatment. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop Dis. 2007;13:56-68.

Takeda AK, Barbosa SFC, Costa LM, Adelino MGF. Fracionamento do veneno *Crotalus durissus terrificus* por cromatografia de exclusão molecular. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1985;27(3):115-22.

Vargaftig B B, Joseph D, Wal F, Marlas G, Chignard M, Chevancem I G. Convulxin induced activation of intact and of thrombin degranulated rabbit platelets: specific crossed desensitization with collagen. Eur J Pharmacol.1983;92:57-68.

Vorherr H. Adjuvant chemotherapy of breast cancer: Hope – Reality – Hazard? Journal of Molecular Medicine. 1984;62(4):149-61.

Vousden KH. Activation of p53 tumor suppressor protein. Biochimica et Biophysica Acta. 2002;1602:47-59.

Wang Z, Malone MH, He H, Macolle KS, Distelhorst CW. Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3- only protein BIM in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis. The Journal of Biological Chemistry. 2003;278(26): 23861-7.

Yan CH, Liang ZQ, Gu ZL, Yang YP, Reid P, Qin ZH. Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to Crtx-induced death of K562 cells. Toxicon. 2006;47: 521-30.

Yan CH, Yang YP, Qin ZH, Gu ZL, Reid P, Liang ZQ. Autophagy is involved in cytotoxic effects of crotoxin in human breast cancer cell line MCF-7 cells. Acta Pharmacol Sin. 2007;28:540-58.

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. 2007;246: 24-33.

Zambelli VO, Sampaio SC, Sudo-Hayashi, Greco K, Britto LRG, Alves AS, Zychar BC, Gonçalves LRC, Spadacci-Morena DD, Otton Rosemari, Della- Casa MS, Curi R, Cury Yara. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxygenase – derived mediators. Toxicon. 2008;51:1357-67.

Zhaug M, Guo R, Zhai Y, Yang D. Light sensitive IFN $\gamma$ -mediated apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells leading to family members. Cancer Letters. 2003;195: 201-10.

Zhivotovsky B, Orrenius S. Apoptosis and cancer: where are and where to go. *Cancer Biology*. 2003;13:93-5.

Zhou Y, Mehta KR, Choi AP, Scolavino S, Zangi X. DNA damage induced inhibition of securing expression is mediated by p53. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(1):462-70.

Zorning M, Huedr AD, Baum W, Evan G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2001;155:1-37.