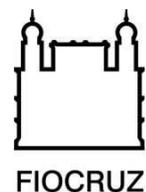




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO VENENO DE *BOTHRUPS LEUCURUS* E
TÓXINAS ISOLADAS EM LINHAGENS CELULARES DE GLIOMAS**

MILA DE OLIVEIRA HUGHES VEIGA DO ROSÁRIO

Salvador – Bahia

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO VENENO DE *BOTHRUPS LEUCURUS* E
TOXINAS ISOLADAS EM LINHAGENS CELULARES DE GLIOMAS**

MILA DE OLIVEIRA HUGHES VEIGA DO ROSÁRIO

Orientador: Dr. Ramon dos Santos El-Bachá

Co-orientador: Dr^a Luciana Lyra Casais e Silva

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Patologia
Humana, para obtenção do
grau de Doutor.

**Salvador – Bahia
2018**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

R789a Rosário, Mila de Oliveira Hughes Veiga do
Avaliação da citotoxicidade do veneno de *Bothrops leucurus* e toxinas isoladas
em linhagens celulares de gliomas. / Mila de Oliveira Hughes Veiga do Rosário.
- 2018.

125 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Ramon dos Santos El-Bachá, Laboratório de
Imunologia.

Tese (Doutorado em Patologia) –Faculdade de Medicina, Universidade
Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

1. Gliomas. 2. Veneno. 3. Atividade antitumoral. 4. *Bothrops leucurus*.
I. Título.

CDU 616-006:615.9

Título da Tese: " AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO VENENO DE BOTHROPS LEUCURUS E TOXINAS ISOLADAS EM LINHAGENS CELULARES DE GLIOMAS "

MILA DE OLIVEIRA HUGHES VEIGA DO ROSÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 20 de dezembro de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Camila Alexandrina Viana de
Figueiredo
Professora
UFBA



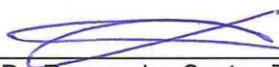
Dr. Vitor Antonio Fortuna
Professor
UFBA



Dra. Simone Garcia Macambira
Professora
UFBA



Dr. Bruno Solano de Freitas Souza
Pesquisador
IGM/Fiocruz



Dr. Ramon dos Santos El-Bachá
Professor
UFBA

Dedico este trabalho aos meus pais, em especial à minha mãe, e a todos que já enfrentaram ou continuam a lutar contra o câncer. Esta é definitivamente uma batalha cruel e dolorosa que suplica pelo amparo da ciência. Que um dia a compaixão e necessidade da cura falem mais alto no meio científico do que o ego e que os cientistas reencontrem o verdadeiro propósito da ciência: a ajuda!

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao universo, sempre generosos comigo, colocando em momentos de fraqueza e dificuldade pessoas especiais que me amparam e confortam, me dando forças internas para continuar.

Ao meu pai, por todo o amor devotado a mim, por sempre mostrar sua face risonha e carinhosa até nos momentos mais difíceis e por me passar este amor pela vida acadêmica, Professor Jurandir Veiga do Rosário, sinto saudades suas todos os dias.

À minha mãe, Jandira de Oliveira Hughes, por abdicar de tantas coisas para me dar o melhor sempre, sem titubear. Você foi e sempre será a minha melhor amiga e a melhor mãe que Deus poderia ter me dado. Nenhum agradecimento jamais será o suficiente, porque todas as conquistas que eu obtive e obtiver em minha vida estarão intrinsecamente relacionadas a você e ao meu pai.

À minha namorada e amiga, Tacila Vieira Lima, por segurar minha barra durante todo o processo difícil de desenvolvimento deste projeto, muito obrigada por ouvir minhas reclamações acerca de experimentos e comemorar comigo quando finalmente os mesmos davam certo. Obrigada pelo incentivo e pela paciência. Acima de tudo agradeço por todo seu amor, carinho e conselhos.

Aos meus amigos e família (de sangue ou não), que participam da minha vida me ensinando lições importantes para prosseguir e contribuindo para minha evolução como profissional e ser humano.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Ramon dos Santos El-Bachá e Prof.^a Dr.^a Luciana Lyra Casais e Silva, por serem profissionais íntegros e exemplos de pessoas, que me acolheram e tiveram paciência com toda a fase difícil pela qual passei. Agradeço por todo o conhecimento compartilhado aquém da bancada e pelos laços de amizade criados. Vocês são exemplos para mim!

A toda a equipe do LabNq, em especial às amigas maravilhosas que tive a felicidade em conhecer: Tatiana Damasceno (minha irmã), Livia Bacelar, Erica Novaes. Agradeço por ouvirem todas as minhas lamúrias, por me auxiliarem em etapas cruciais dos experimentos (nem que seja com conselhos extremamente válidos) e por me proporcionarem experiências maravilhosas fora do ambiente de trabalho.

A toda a equipe do IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) e do Instituto BUTANTAN, da Universidade de São Paulo, pelo auxílio nas etapas fundamentais para desenvolvimento deste projeto, pela paciência e conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Jorge Clarêncio, pela paciência e disposição em colaborar com as análises de citometria de fluxo.

Aos meus colegas da pós-graduação, melhor turma à qual tive a felicidade em fazer parte.

Às cobaias, imprescindíveis para meu trabalho. Respeito e agradeço a estas vidinhas por todo o auxílio indispensável para o desenvolvimento da ciência.

A mim mesma, sim, sem nenhuma modéstia nem soberba; pois, mesmo com auxílio dos que amo, muitas vezes só insisti nessa jornada por me agarrar a minha própria força de vontade.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Minha maior felicidade é saber que sou rodeada por pessoas maravilhosas às quais posso agradecer!

Aos funcionários do CPqGM (Pós-graduação, Biblioteca e Laboratório de Microscopia) pelo profissionalismo, dedicação, atenção e respeito aos alunos de pós-graduação.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

ROSÁRIO, Mila de Oliveira Hughes Veiga do. Avaliação da citotoxicidade do veneno de *Bothrops leucurus* e toxinas isoladas em linhagens celulares de gliomas. 125 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Gliomas são os tumores do sistema nervoso central com prognóstico extremamente desfavorável necessitando o desenvolvimento de drogas mais eficazes. **OBJETIVO:** avaliar o potencial antitumoral do veneno total, frações cromatográficas e algumas proteínas de interesse provenientes do veneno de *Bothrops leucurus*, um viperídeo amplamente distribuído no nordeste brasileiro em linhagens celulares de gliomas. **MATERIAL E MÉTODOS:** As frações que exibiram atividade antitumoral para células C6 e U251 foram purificadas por cromatografia e as proteínas foram identificadas por espectrometria de massa. As frações cromatográficas foram testadas quanto à pureza por eletroforese em gel de poliacrilamida. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT e o tipo de morte celular por citometria de fluxo, com dupla marcação celular por anexina V e iodeto de propídio após tratamentos. A morfologia das células foi observada por microscopia de contraste de fase. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** O tratamento com o veneno total demonstrou uma citotoxicidade dependente da concentração mais relevante para as células tumorais do que para os astrócitos. Diminuição da celularidade e alterações morfológicas foram observadas. O veneno total a 3 µg/mL matou as células de tumor por necrose, mas não induziu a morte de astrócitos. Ensaio de citotoxicidade foram realizados para as frações cromatográficas e as proteínas relevantes foram purificadas. A metaloprotease P-III leucurolisina-b demonstrou uma citotoxicidade dependente da concentração para células de tumor de glioma de rato C6 apresentando a mediana da EC₅₀ de 1,44 µg/mL (variação: 1,29-1,48 µg/mL; n = 3) e de 2,25 µg/mL (variação: 2,07-2,49 µg/mL; n = 3) para células de glioblastoma humano U251. Além disso, esta proteína não afetou a viabilidade de astrócitos. A principal causa de morte celular foi apoptose. A fosfolipase A₂ básica demonstrou uma citotoxicidade dependente da concentração para células de tumor C6 apresentando a mediana da EC₅₀ de 30,00 µg/mL (variação: 27,36-32,16 µg/mL; n = 3) e de 39,81 µg/mL (variação: 38,12-41,86 µg/mL; n = 3) para células U251. Esta proteína também não afetou a viabilidade dos astrócitos. No entanto, a principal causa de morte celular foi devido a necrose. **CONCLUSÕES:** Estes resultados demonstram um enorme potencial para a concepção e desenvolvimento de novos medicamentos anticancerígenos derivados de proteínas do veneno de *Bothrops leucurus*.

Palavras-chave: Gliomas, Venenos ofídicos, Atividade antitumoral, *Bothrops leucurus*.

ROSÁRIO, Mila de Oliveira Hughes Veiga do. Evaluation of the cytotoxicity of *Bothrops leucurus* venom and isolated toxins in glioma cell lines. 125 f. il. Thesis (Ph. D in Pathology) - Federal University of Bahia. Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Gliomas are tumors of the central nervous system with extremely unfavorable prognosis necessitating the development of more effective drugs. **OBJECTIVE:** To evaluate the antitumor potential of total venom, chromatographic fractions and some proteins of interest from *Bothrops leucurus* venom, a viper that is widely distributed in Brazilian northeast, to glioma cell lines. **MATERIALS AND METHODS:** Fractions that exhibited antitumor activity to C6 and U251 cell lines were further purified by chromatography and proteins were identified by mass spectrometry. Chromatographic fractions were tested for purity by polyacrylamide gel electrophoresis. Cell viability was evaluated by the MTT assay, and the type of cell death, by flow cytometry, double labeling cells with annexin V and propidium iodide after treatments. The cell morphology was observed by phase contrast microscopy. **RESULTS AND DISCUSSION:** Treatment with total venom demonstrated a concentration- dependent cytotoxicity more relevant to tumor cells than to astrocytes. A decreased in the cellularity and morphological changes were observed. Total venom at 3 µg/mL killed tumor cells by necrosis, but this did not induce cell death to astrocytes. Cytotoxicity tests were performed for chromatographic fractions and the relevant proteins were purified. The metalloprotease P-III leucurolysin-b demonstrated a concentration-dependent cytotoxicity to tumor cells presenting a median EC₅₀ of 1.44 µg/mL (Range: 1.29-1.48 µg/mL; n=3) to rat C6 glioma cells and of 2.25 µg/mL (Range: 2.07-2.49 µg/mL; n=3) to U251 human glioblastoma cells. Furthermore, this protein did not affect the astrocytes viability. The main cause of cell death was apoptosis. Basic phospholipase A₂ demonstrated a concentration-dependent cytotoxicity to tumor cells presenting a median EC₅₀ of 30.00 µg/ml (Range: 27.36-32.16 µg/mL; n=3) to C6 cells and of 39.81 µg/ml (Range: 38.12-41.86 µg/mL; n=3) to U251 cells. This also did not affect the viability of astrocytes. However, the main cause of cell death was due to necrosis. **CONCLUSIONS:** These results demonstrate an enormous potential for the design and development of new anticancer drugs derived from proteins of the *Bothrops leucurus* venom.

Key words: Gliomas, Ophidian venoms, Antitumor activity, *Bothrops leucurus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição proporcional do total de casos de câncer segundo localização primária em homens e mulheres no Brasil em 2018 até o dado momento.....	19
Figura 2. O amplo espectro de ação e recentes aplicações para as toxinas provenientes de venenos ofídicos	24
Figura 3. Citotoxicidade do veneno total de <i>Bothrops leucurus</i> para células C6 de glioma de rato.....	43
Figura 4. Citotoxicidade do veneno total de <i>Bothrops leucurus</i> para astrócitos de rato obtidos através do protocolo 1.....	44
Figura 5. Citotoxicidade do veneno total de <i>Bothrops leucurus</i> para astrócitos de rato obtidos através do protocolo 2.....	45
Figura 6. Comparação entre os valores obtidos através do cálculo da EC ₅₀ para diferentes protocolos de isolamento de astrócitos.....	46
Figura 7. Comparação entre os valores obtidos através do cálculo da EC ₅₀ para células de C6 de glioma de rato e astrócitos obtidos através do protocolo 1.....	46
Figura 8. Citotoxicidade do veneno total de <i>Bothrops leucurus</i> para células U251 de glioblastoma humano	47
Figura 9. Comparação entre os valores obtidos através do cálculo da EC ₅₀ para células de glioma de rato C6 e células de glioblastoma humano U251.....	48
Figura 10. Avaliação através de microscopia de fase da morfologia de células C6 não tratadas (DMEM) ou tratadas com a concentração de 1 µg/mL do veneno total, após um período de 72 horas.....	49
Figura 11. Avaliação através de microscopia de fase da morfologia de células C6 tratadas com as concentrações de 2 a 6 µg/mL do veneno total após um período de 72 horas.....	49
Figura 12. Avaliação através de microscopia de fase da morfologia de células C6 tratadas com a concentração de 10 µg/mL do veneno total após um período de 72 horas	50
Figura 13. Avaliação através de microscopia de fase da morfologia celular dos astrócitos obtidos através dos diferentes protocolos estabelecidos no LabNq não tratados (DMEM) ou tratados com a concentração de 3 µg/mL do veneno total, após um período de 72 horas.	51
Figura 14. Avaliação através de microscopia de fase da morfologia celular dos astrócitos obtidos através dos diferentes protocolos estabelecidos no LabNq tratados com as concentrações de 6 e 10 µg/mL do veneno total após um período de 72 horas	

.....	52
Figura 15. Avaliação através de microscopia de fase da morfologia celular dos astrócitos obtidos através dos diferentes protocolos estabelecidos no LabNq tratados com a concentração de 20 µg/mL do veneno total após um período de 72 horas.....	53
Figura 16. Avaliação através de microscopia de fase da morfologia de células U251 não tratadas (DMEM) ou tratadas com a concentração de 1 µg/mL do veneno total, após um período de 72 horas.....	54
Figura 17. Avaliação através de microscopia de fase da morfologia de células U251 tratadas com as concentrações de 2 a 6 µg/mL do veneno total após um período de 72 horas	54
Figura 18. Avaliação através de microscopia de fase da morfologia de células U251 tratadas com a concentração de 10 µg/mL do veneno total após um período de 72 horas	55
Figura 19. Avaliação através de microscopia de fase da morfologia das diferentes linhagens celulares tumorais não tratadas (DMEM) e tratadas com as concentrações 2 e 3 µg/mL do veneno total em comparação com as células utilizadas como controle (astrócitos) não tratadas (DMEM) ou tratadas com as concentrações supracitadas, após um período de 72 horas.....	56
Figura 20. Avaliação do tipo de morte celular promovida pelo tratamento (72 horas) com veneno total a 3 µg/mL em comparação com o tratamento apenas com o veículo da droga (PBS)	57
Figura 21. Cromatografia em Superdex 75 (Sistema HPLC) do veneno total de <i>Bothrops leucurus</i> em tampão de formiato de amônio 100mM, pH 3,0. Fluxo de trabalho de 0,6 mL/min	59
Figura 22. SDS-PAGE (12%) em condições não redutoras das frações obtidas através da cromatografia por exclusão molecular	61
Figura 23. Gel de zimografia utilizando como substrato a gelatina (12%) em condições não redutoras das frações obtidas através da cromatografia por exclusão molecular	62
Figura 24. Gel de zimografia utilizando como substrato a caseína (12%) em condições não redutoras das frações obtidas através da cromatografia por exclusão molecular	63
Figura 25. <i>Western blotting</i> em gel de gradiente de poliacrilamida (4-20%) em condições redutoras com a fração 1 resultante da cromatografia porexclusão molecular	64
Figura 26. Citotoxicidade da fração 1 obtida por cromatografia por exclusão molecular do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> para células C6 de glioma de rato.....	65
Figura 27. Viabilidade celular de astrócitos murinos após tratamento com a fração 1.....	66

Figura 28. Citotoxicidade da fração 4 obtida por cromatografia por exclusão molecular do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> para células C6 de glioma de rato.....	67
Figura 29. Viabilidade celular de astrócitos murinos após tratamento com a fração 4.....	67
Figura 30. Viabilidade celular após tratamento com a fração 3.....	68
Figura 31. Viabilidade celular após tratamento com a fração 2.....	69
Figura 32. Viabilidade celular após tratamento com a fração 5.....	70
Figura 33. Viabilidade celular após tratamento com a fração 6.....	71
Figura 34. Avaliação através de microscopia de fase da morfologia de células C6 e astrócitos não tratados (DMEM) ou tratados com a concentração de 0,6 µg/mL da fração cromatográfica 1, após um período de 72 horas	72
Figura 35. Avaliação através de microscopia de fase da morfologia de células C6 e astrócitos tratados com as concentrações de 1,2 a 4 µg/mL da fração cromatográfica 1, após um período de 72 horas.....	73
Figura 36. Avaliação através de microscopia de fase da morfologia de células C6 e astrócitos tratados com a concentração de 6 µg/mL da fração cromatográfica 1, após um período de 72 horas.....	74
Figura 37. Histograma produzido pelo software PEAKS demonstrando as correspondências de espectro peptídico da amostra com peptídeos da sequência da fosfolipase A ₂ básica presente no banco de dados	75
Figura 38. Resultado obtido pelo PEAKS demonstrando proteínas presentes no banco de dados que possuem os peptídeos da amostra analisada, entre elas a proteína fosfolipase A ₂ básica do veneno de <i>Bothrops leucurus</i>	75
Figura 39. Resultado obtido pelo PEAKS evidenciando os peptídeos identificados na sequência proveniente da proteína fosfolipase A ₂ básica do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> 76	
Figura 40. Cromatografia em coluna Superdex 200 10/300 GL do veneno total de <i>Bothrops leucurus</i> tampão de acetato de amônio a 50 mM e NaCl a 300 mM, pH 7,3. Fluxo de trabalho de 0,8 mL/min	77
Figura 41. SDS-PAGE (12%) em condições redutoras das frações obtidas através da cromatografia por exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300 GL.....	77
Figura 42. Cromatografia da fração 1 obtida em coluna Superdex 200 10/300 GL, após eluição em coluna Superdex 75 10/300 GL em tampão de acetato de amônio a 50 mM e NaCl a 300 mM, pH 7,3. Fluxo de trabalho de 0,8 mL/min	78
Figura 43. SDS-PAGE (12%) em condições redutoras das frações obtidas após cromatografia em Superdex 75 10/300 GL	79

Figura 44. Cromatografia da fração 2 (obtida em coluna Superdex 75 10/300 GL), após eluição em coluna DEAE Sepharose FF em tampão a 25 mM de HEPES, 2 mM de CaCl ₂ , pH 7,5 e o mesmo tampão contendo 300 mM de NaCl a um fluxo constante de 1 mL/min.....	80
Figura 45. SDS-PAGE (12%) em condições redutoras da fração coletada após cromatografia em coluna DEAE Sepharose FF.....	80
Figura 46. Cromatografia das frações 3 e 4 (obtidas em coluna Superdex 200 10/300 GL), após eluição em HiPrep Q Sepharose FF com eluição em gradientes de 20, 30, 50 e 100% do tampão B, sendo o tampão A = 20 mM de Tris-HCl (pH 7,5) e tampão B = 20 mM de Tris- HCl (pH 7,5) e 1 M de NaCl, fluxo constante em 4mL/min	81
Figura 47. Cromatografia da fração coletada (obtida em coluna HiPrep Q Sepharose FF de troca aniônica), após eluição em coluna c4 com eluição em gradiente linear de 0 a 100% do tampão B, sendo o solvente A = TFA 0,1% e solvente B = ACN 90% em água contendo TFA 0,1%, em fluxo constante de 1 mL/min	82
Figura 48. SDS-PAGE (12%) em condições redutoras das frações coletadas após cromatografia em coluna C4.....	82
Figura 49. Perfil cromatográfico após digestão triptica da banda contendo a leucurolisina-b obtida após cromatografia em coluna DEAE Sepharose FF	83
Figura 50. Identificação dos peptídeos através da comparação do espectro com peptídeos pertencentes à proteína leucurolisina-b através do software MASCOT	84
Figura 51. Resultado obtido pelo MASCOT demonstrando em vermelho a localização dos aminoácidos presentes nos peptídeos identificados na proteína de interesse (leucurolisina- b).....	85
Figura 52. Perfil cromatográfico após digestão triptica da banda contendo a fosfolipase A ₂ básica obtida após cromatografia em coluna C4	86
Figura 53. Identificação dos peptídeos através da comparação do espectro com peptídeos pertencentes à proteína fosfolipase A ₂ básica através do software MASCOT.....	86
Figura 54. Resultado obtido pelo MASCOT demonstrando em vermelho a localização dos aminoácidos presentes nos peptídeos identificados na proteína de interesse (fosfolipase A ₂ básica).....	87
Figura 55. Perfil cromatográfico após digestão triptica da banda contendo a leucurolisina-A obtida após cromatografia em coluna C4.....	88
Figura 56. Identificação de um dos peptídeos através da comparação do espectro com peptídeos pertencentes à proteína leucurolisina-A através do software MASCOT.	88
Figura 57. Identificação de um dos peptídeos através da comparação do espectro com peptídeos pertencentes à proteína leucurolisina-A através do software MASCOT.	

.....	89
Figura 58. Resultado obtido pelo MASCOT demonstrando em vermelho a localização dos aminoácidos presentes nos peptídeos identificados na proteína de interesse (leucurolisina- A)	90
Figura 59. Citotoxicidade da leucurolisina-b para células C6 de glioma de rato	91
Figura 60. Citotoxicidade da leucurolisina-b para células U251 de glioblastoma humano	92
Figura 61. Viabilidade de astrócitos murinos após tratamento com a leucurolisina-b	93
Figura 62. Avaliação através de microscopia de fase da morfologia de células C6, U251 e astrócitos não tratados (DMEM) ou tratados com a concentração de 0,6 µg/mL da leucurolisina-b, após um período de 72 horas	94
Figura 63. Avaliação através de microscopia de fase da morfologia de células C6, U251 e astrócitos tratados com as concentrações de 1,2 e 2 µg/mL da leucurolisina-b, após um período de 72 horas	95
Figura 64. Avaliação através de microscopia de fase da morfologia de células C6, U251 e astrócitos tratados com a concentração de 4 µg/mL da leucurolisina-b, após um período de 72 horas	96
Figura 65. Avaliação do tipo de morte celular promovida pelo tratamento (72 horas) com a leucurolisina-b a 2 µg/mL em comparação com o tratamento apenas com o veículo da droga (PBS)	97
Figura 66. Citotoxicidade da fosfolipase A ₂ básica para células C6 de glioma de rato	99
Figura 67. Citotoxicidade da fosfolipase A ₂ básica para células U251 de glioblastoma humano	100
Figura 68. Viabilidade de astrócitos murinos após tratamento com a fosfolipase A ₂ básica.	101
Figura 69. Avaliação através de microscopia de fase da morfologia de células C6, U251 e astrócitos não tratados (DMEM) ou tratados com a concentração de 10 µg/mL da fosfolipase A ₂ básica, após um período de 72 horas	102
Figura 70. Avaliação através de microscopia de fase da morfologia de células C6, U251 e astrócitos tratados com as concentrações de 30 a 60 µg/mL da fosfolipase A ₂ básica, após um período de 72 horas	103
Figura 71. Avaliação através de microscopia de fase da morfologia de células C6, U251 e astrócitos tratados com a concentração de 100 µg/mL da fosfolipase A ₂ básica, após um período de 72 horas	104
Figura 72. Avaliação do tipo de morte celular promovida pelo tratamento (72 horas) a proteína fosfolipase A ₂ básica a 30 µg/mL em comparação com o tratamento apenas com o veículo da droga (PBS)	105

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Mediana dos percentuais e variações de células C6, U251 e astrócitos marcadas com anexina V e IP após 72 horas de tratamento com veneno total a 3 µg/mL ... 58
- Tabela 2.** Dosagem de proteínas das frações obtidas por cromatografia por exclusão molecular 60
- Tabela 3.** Mediana dos percentuais e variações de células C6, U251 e astrócitos marcadas com anexina V e IP após 72 horas de tratamento com a leucurolisina-b a 2 µg/mL 97
- Tabela 4.** Mediana dos percentuais e variações de células C6, U251 e astrócitos marcadas com anexina V e IP após 72 horas de tratamento com a fosfolipase A₂ básica a 30 µg/mL 105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina sérica bovina
DAB	3,3' Diaminobenzidina tetrahidrocloro
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EC ₅₀	Concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GBM	Glioblastoma multiforme humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LAO	L-aminoácido oxidase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão salina fosfato
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
RPM	Rotação por minuto
SDS	Duodecilsulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SVMP	Metaloprotease de veneno de serpentes
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletlenodiamina
Tris	Trisaminometano
UFBA	Universidade Federal da Bahia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 CÂNCER	17
1.2 GLIOMA E GLIOBLASTOMA	19
1.3 VENENOS OFÍDICOS: PROPRIEDADES ANTITUMORAIS	22
1.4 PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DO VENENO BOTRÓPICO	27
2. OBJETIVO GERAL	30
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 VENENO DE <i>BOTHROPS LEUCURUS</i>	31
3.2 FRACIONAMENTO DO VENENO TOTAL	31
3.3 PURIFICAÇÃO DAS POR CROMATOGRAFIA	31
3.3.1 Purificação da Leucurolisina-B	32
3.3.2 Purificação da Fosfolipase A₂ Básica	32
3.4 DOSAGEM PROTEICA	32
3.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	33
3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA	34
3.7 <i>WESTERN BLOTTING</i>	34
3.8 ESPECTROMETRIA DE MASSA	35
3.9 CULTURA CELULAR	36
3.9.1 Cultura de Células de Glioma Murino (C6) d Glioblastoma Humano (U251)	36
3.9.2 Cultura Primária de Astrócitos	37
3.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE DESIDROGENASES MITOCONDRIAIS PELO TESTE DO MTT	38
3.11 DETECÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	39
3.12 MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE	40
3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
4. RESULTADOS	42
4.1 VENENO TOTAL	42
4.1.1 Dosagem Proteica	42
4.1.2 Ensaio de Citotoxicidade	42
4.1.3 Avaliação da Morfologia Celular d Celularidade	48

4.1.4	Identificação do Tipo de Morte Celular por Citometria de Fluxo	57
4.2	FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS	58
4.2.1	Cromatografia por Exclusão Molecular	58
4.2.2	Dosagem Proteica	59
4.2.3	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	60
4.2.4	Avaliação da Atividade Proteolítica	61
4.2.5	<i>Western Blotting</i>	63
4.2.6	Ensaio de Citotoxicidade	64
4.2.7	Avaliação da Morfologia Celular e Celularidade após Tratamento com a Fração 1	71
4.2.8	Espectrometria de Massa	74
4.3	PROTEÍNAS DO VENENO DE <i>BOTHROPS LEUCURUS</i>	76
4.3.3	Purificação da Leucurolisina-B e da Fosfolipase A₂ Básica	76
4.3.4	Identificação das Proteínas por Espectrometria de Massa	83
4.4	LEUCUROLISINA-B	90
4.4.1	Ensaio de Citotoxicidade	90
4.4.2	Avaliação da Morfologia Celular e Celularidade	93
4.4.3	Identificação do Tipo de Morte Celular por Citometria de Fluxo	96
4.5	FOSFOLIPASE A₂ BÁSICA	98
4.5.1	Ensaio de Citotoxicidade	98
4.5.2	Avaliação da Morfologia Celular e Celularidade	101
4.5.3	Identificação do Tipo de Morte Celular por Citometria de Fluxo	104
5	DISCUSSÃO	106
6	CONCLUSÕES	116
	REFERÊNCIAS	117
	ANEXO A – Certificado da CEUA	127

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Câncer é um termo utilizado para designar neoplasias que são classificadas como malignas, ou seja, que possuem grande potencial de invasão e destruição de estruturas adjacentes, bem como capacidade em disseminar-se para locais distantes (metástases) (ROBBINS et al., 2000). Uma definição clássica, sugerida há mais de meio século, descreve neoplasia como sendo uma massa de tecido anormal, cujo crescimento é excessivo e não coordenado com os dos tecidos normais, e que mesmo com a interrupção dos estímulos que conduziram à sua mudança, persiste com seu desenvolvimento (WILLIS, 1952). Em todos os tipos de câncer, mutações genéticas dão origem a alterações na expressão, ativação ou localização de proteínas reguladoras nas células, afetando as vias de sinalização que alteram a sua resposta a estímulos reguladores e permitem o crescimento celular sem restrições (JAIN; KUMAR, 2012). Para que as mutações genéticas sucedam, dando início ao processo da carcinogênese, deve haver contato prévio com agentes ditos carcinógenos (agentes químicos como aminas aromáticas, físicos como radiação eletromagnética e/ou particulados ou biológicos como vírus Epstein-Barr). Também é necessário que o sistema de reparo do DNA falhe, perturbando a homeostasia do organismo. Quando isso ocorre, os proto-oncogenes tornam-se oncogenes (genes carcinógenos) que alteram diversas vias de sinalização a exemplo do proto-oncogene *RAS* que monitora o ciclo celular e quando alterado, as células não mais obedecem às vias de inibição da proliferação (RIVOIRE et al., 2001; RIBEIRO- SILVA e ZUCOLOTO, 2003). Além de reprogramar seu metabolismo com o intuito de alimentar seu rápido crescimento, as células malignas conseguem desenvolver uma comunicação através da troca de sinais moleculares com o ambiente para evadir da resposta imune do hospedeiro, criando assim um “microambiente do tumor” (HANAHAN e WEINBERG, 2011; SPANOA et al., 2012), demonstrando o quanto complexa esta doença é de fato.

Segundo Hanahan e Weinberg (2011), para o crescimento e progressão do tumor, as células neoplásicas devem possuir a capacidade de sustentar sinais proliferativos, evadir supressores do crescimento e destruição pelo sistema imune do

organismo, ter potencial ilimitado replicativo, possuir resistência a morte celular, estimular a formação de novos vasos sanguíneos que as nutrirão e manterão as atividades de crescimento descontrolado (angiogênese), possuir instabilidade genômica e mutação, reprogramar seu metabolismo energético de maneira a satisfazer suas demandas energéticas e de biomassa e capacidade de invasão e metástase. Processos inflamatórios crônicos também podem cooperar para o desenvolvimento da neoplasia, uma vez que as células inflamatórias são capazes de produzir enzimas que degradam a matriz extracelular, atuando como facilitadoras da invasão de células neoplásicas.

A identificação de genes e moléculas que podem estar associadas às etapas relacionadas com o crescimento e progressão da neoplasia e a elucidação de seu papel no processo são importantes para avaliação de novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento de quimioterápicos eficazes. Receptores de membrana celular, como as proteínas denominadas integrinas, já foram apontados como moléculas cruciais na tumorigênese. As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas de subunidades α e β , ligadas não-covalentemente, que podem se associar num total de 24 combinações diferentes, formando receptores com diferentes afinidades distribuídos pelos tecidos de forma diferente, que interagem especificamente com proteínas da matriz extracelular, como o colágeno, a fibronectina e a laminina. Esta interação com a membrana basal é exigida para garantir a integridade estrutural e funcional do tecido, modulando a proliferação, diferenciação e sobrevivência das células que o constituem (MANGINI et al., 2002). Normalmente estas integrinas medeiam a adesão de células epiteliais à membrana basal, mas em células tumorais podem contribuir para a proliferação, migração, invasão e sobrevivência. Além disso, a expressão da integrina pode variar consideravelmente entre o tecido normal e tumoral, por exemplo, as integrinas $\alpha\beta3$, $\alpha5\beta1$ e $\alpha\beta6$ são geralmente expressas em níveis baixos ou indetectáveis em epitélios adultos, mas podem ser altamente expressas em alguns tumores (MACEDO; FOX; CASTRO, 2015).

O câncer é uma das principais causas de morte em países economicamente desenvolvidos e subdesenvolvidos; espera-se que este fato cresça mundialmente devido ao aumento e ao envelhecimento da população, em particular nos países subdesenvolvidos, nos quais cerca de 82% da população mundial reside (TORRE et al., 2015). As neoplasias cerebrais têm sido cada vez mais frequentes atualmente.

Até o dado momento no Brasil foram registrados 5.810 casos novos em homens e 5.510 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019 (Fig. 1). Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,62 casos novos a cada 100 mil homens e 5,17 para cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do SNC é o nono mais frequente na Região Nordeste (3,71/100 mil) segundo dados apontados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2018).

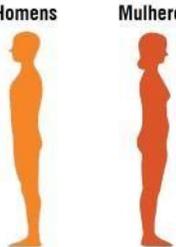
Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		Homens Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Figura 1. Distribuição proporcional do total de casos de câncer segundo localização primária em homens e mulheres no Brasil em 2018 até o dado momento. FONTE: Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2018.

Fica evidenciada, dessa forma, a relevância que tem o câncer, em particular os tumores do sistema nervoso central (SNC), como um problema de saúde pública, especialmente levando em consideração a possibilidade de subnotificações. Dentre as neoplasias malignas que acometem o encéfalo, os gliomas destacam-se, uma vez que são mais frequentes e agressivos, com prognóstico extremamente desfavorável, mesmo quando se utiliza todos os recursos terapêuticos disponíveis (NIYAZI et al., 2011).

1.2 GLIOMA E GLIOBLASTOMA

O termo glioma é utilizado para nomear genericamente as neoplasias originárias das células da glia encefálica que correspondem a 80% dos tumores malignos primários do sistema nervoso central (SCHWARTZBAUM et al., 2006). As células gliais são células do tecido cerebral que proporcionam suporte para células neurais, como nutrientes, oxigênio, suporte mecânico, a orientação do desenvolvimento, algumas funções do sistema imunológico e eliminação de

resíduos. Funcionam como verdadeiras parceiras para neurônios e estão envolvidas em processos complexos, incluindo a transdução de sinal e neurotransmissão (VAN MEIR et al., 2010). A neuroglia compreende a microglia, que possui um importante papel no desenvolvimento e processos fagocíticos no cérebro, e a macroglia, que é constituída por tipos celulares como os oligodendrócitos e astrócitos (DOETSCH, 2003). Os astrócitos constituem cerca de metade de toda a população glial. Possuem inúmeros prolongamentos que emergem do corpo celular e que se ramificam profusamente formando uma densa arborização (LENT, 2005).

Os gliomas são classificados a partir de suas características histológicas, de acordo com a origem das células tumorais de diferentes tipos de células gliais. São denominados astrocitomas (derivados de astrócitos), oligodendrogliomas (derivados oligodendrócitos), oligoastrocitomas (derivados de astrócitos e oligodendrócitos) e ependimomas (derivados de células ependimárias) (KLEIHUES; CAVENEE, 2000).

Além do agrupamento morfológico dos tumores cerebrais tendo como base uma histogênese presumida, a Organização Mundial de Saúde (OMS) também classifica os tumores individuais em graus (I, II, III e IV), como um meio de refletir de forma antecipada o comportamento biológico destes. Desta forma, os tumores de grau mais elevado (graus III e IV), na ausência de tratamento, devem seguir um curso clínico mais agressivo do que os seus homólogos inferiores (graus I e II) (HUSE; HOLLAND, 2010).

Pacientes com tumores de grau II segundo a classificação da OMS normalmente sobrevivem mais de 5 anos e aqueles com tumores de grau III sobrevivem de 2 a 3 anos. O prognóstico dos pacientes com tumores de grau IV da OMS depende, em grande parte, da disponibilidade de tratamentos efetivos. A maioria dos pacientes com tumores de grau IV, especialmente os idosos, sucumbem à doença dentro de um ano (LOUIS et al., 2007). Os astrocitomas correspondem ao tipo de glioma mais representativo e de acordo com o grau de malignidade atribuído pela OMS são classificados em 4 grupos. São eles: o astrocitoma pilocítico (grau I), único considerado benigno; o astrocitoma fibrilar (grau II); o astrocitoma anaplásico (grau III) e o glioblastoma multiforme (GBM; grau IV) (LOUIS et al., 2007). O glioblastoma ou GBM é o astrocitoma maligno primário mais letal do sistema nervoso central e representa aproximadamente 50% de todos os gliomas (CHESLER; BERGER; QUINONES-HINOJOSA, 2013), e apresenta características avançadas de

malignidade, que incluem necrose, proliferação vascular e pleomorfismo (MARUMOTO; SAYA, 2012).

O GBM representa um grande desafio para a medicina, pois além de ser frequente, possui prognóstico extremamente desfavorável, com sobrevida inferior a 12 meses mesmo após intervenção terapêutica (LOUIS et al., 2007; TRAN; ROSENTHAL, 2010). Assim como a maioria dos tumores malignos, o GBM é caracterizado pela supressão da resposta imunológica antitumoral, angiogênese para suprir suas necessidades metabólicas, resistência a estímulos apoptóticos, proliferação celular em demasia e capacidade de invasão de tecidos, porém diferencia-se quanto à capacidade de gerar metástase, característica comum da maioria dos cânceres. Tais características provocam alguns sinais clínicos que podem se manifestar como hipertensão intracraniana que resulta do aumento da pressão do crânio devido à avançada proliferação celular, enxaquecas, náuseas e alguns pacientes apresentam convulsões epiléticas (LU; SHERVINGTON, 2008).

Com relação às terapias utilizadas para o tratamento de pacientes com glioma é possível citar ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Como previamente citado, gliomas malignos possuem capacidade elevada de invasão cerebral difusa. As células tumorais invadem o tecido cerebral circundante, sem uma linha de demarcação clara do tumor cerebral (PYRKO et al., 2005). Esta natureza invasiva é uma das características fundamentais de gliomas malignos e está relacionada com a incapacidade de procedimentos cirúrgicos removerem por completo a massa tumoral mesmo quando estas surgem em áreas em que a ressecção cirúrgica ampla é possível (MAHER et al., 2001).

A radioterapia melhora a sobrevida global para cada grau do tumor, mas nenhuma neoplasia é curada por esta modalidade de tratamento (MAHER et al., 2001), além disso, existem vários casos documentando a toxicidade para radiação, seja ela aguda ou tardia, o que por consequência, limita o uso da terapia de radiação (BARNETT et al., 2009).

A quimioterapia continua a ser a opção predominante. Um dos principais obstáculos na quimioterapia é que os pacientes eventualmente demonstram resistência depois de algum tempo (LAI et al., 2012), uma vez que o cérebro é capaz de metabolizar diversas substâncias e inativá-las por expressar diversas enzimas do

metabolismo de fármacos a exemplo da família das glucuronil transferases (EC 2.4.1.17) (EL-BACHÁ et al., 2000).

Diversos compostos têm sido amplamente pesquisados para o tratamento de gliomas. Entre estes compostos estão quimioterápicos eficientes em outros tipos de tumores sólidos, como a cisplatina, a carmustina e a lomustina, bem como moduladores do sistema imune e do metabolismo celular, como o interferon e a dexametasona (KAUP et al., 2001; KIM et al., 2004; NATSUME et al., 2005). No entanto, nenhum destes compostos se mostrou eficiente em aumentar a sobrevida e melhorar o prognóstico dos pacientes e, atualmente não são utilizados como terapia primária em GBM. Além disso, diferentemente de outros tipos tumorais, o prognóstico de pacientes com GBM pouco se alterou nos últimos anos. (TRAN; ROSENTHAL, 2010). A temozolomida é um quimioterápico clinicamente aprovado de escolha, entretanto aumenta a sobrevida média dos pacientes em apenas 2 anos (juntamente com radioterapia) (STUPP et al., 2009). A presença de células tipo tronco-tumorais resistentes aos quimioterápicos também se apresenta como um desafio para a terapêutica (FU et al., 2009). O tratamento com a temozolomida *in vitro*, por exemplo, não foi capaz de reduzir a viabilidade de células tipo tronco de glioblastoma mesmo posteriormente a 4 dias de tratamento (BEIER et al., 2008).

Todos esses dados corroboram uma reflexão da urgente necessidade em desenvolver tratamentos mais efetivos para esse letal câncer cerebral. Isso leva à bioprospecção, uma busca sistemática por produtos naturais com potencial para novos produtos ou fármacos. Neste contexto, a biodiversidade dos venenos ou toxinas tornou-os uma ferramenta única a partir da qual podem ser desenvolvidos novos agentes terapêuticos para a oncologia (JAIN; KUMAR, 2012).

1.3 VENENOS OFÍDICOS: PROPRIEDADES ANTITUMORAIS

Os venenos são misturas únicas de peptídeos e proteínas naturalmente adaptados pela seleção natural para agir sobre os sistemas vitais de um organismo (CALVETE et al., 2009). Os venenos de serpentes possuem tipicamente de 30 a 100 toxinas proteicas. Algumas dessas proteínas exibem atividade enzimática enquanto várias outras são proteínas e peptídeos sem atividade enzimática, mas podendo apresentar atividade farmacológica (KANG et al., 2011). Essas moléculas

compreendem cerca de 90 a 95% do peso seco do veneno. As frações não proteicas são compostas por cátions metálicos, carboidratos, nucleosídeos, aminas biogênicas e níveis menores de aminoácidos livres e lipídios (CUNHA; MARTINS, 2012). Cada população de serpentes terá os seus próprios requisitos específicos para a ação do veneno, sendo, pelo menos em parte, determinada pelo tipo de presa que procura. A distribuição geográfica e características do habitat, variações ontogênicas e até a sazonalidade influenciam nas diferenças da fisiopatologia e composição dos venenos entre gêneros, espécies e indivíduos de serpentes (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991).

Dentre o grupo das enzimas encontradas, as mais comuns são: serinoproteases (E.C. 3.4.21), acetilcolinesterases (E.C. 3.1.1.7), L-aminoácido oxidases (E.C. 1.4.3.2) (LAAOs), nucleotidases (E.C. 3.1.3.31), hialuronidases (E.C. 3.2.1.35), fosfolipases A₂ (PLA₂) (E.C. 3.1.1.4) e metaloproteases (E.C. 3.4.17) (KANG et al., 2011). As proteínas e peptídeos sem atividade enzimática são agrupados em toxinas tipo *three-finger*, inibidores de proteinases, lectinas, sarafotoxinas, fatores de crescimento de nervos, peptídeos natriuréticos atriais, peptídeos potenciadores de bradicinina, helveprinas/proteínas CRISP, desintegrinas e waprinas (PUNG et al., 2005).

Diversos trabalhos utilizando frações purificadas do veneno total das serpentes já demonstraram as propriedades farmacológicas dos venenos ofídicos (CALDERON et al., 2014) (Fig. 2), como exemplo clássico, é possível citar a mistura de peptídeos denominada como fator potenciador da bradicinina isolada do veneno de *Bothrops jararaca* utilizada para confecção do anti-hipertensivo Captopril (CUSHMAN; ONDETTI, 1991). Dentre os componentes químicos com efeito antitumoral já evidenciado é possível citar: as LAAOs, as lectinas, as PLA₂, as desintegrinas e as metaloproteases.

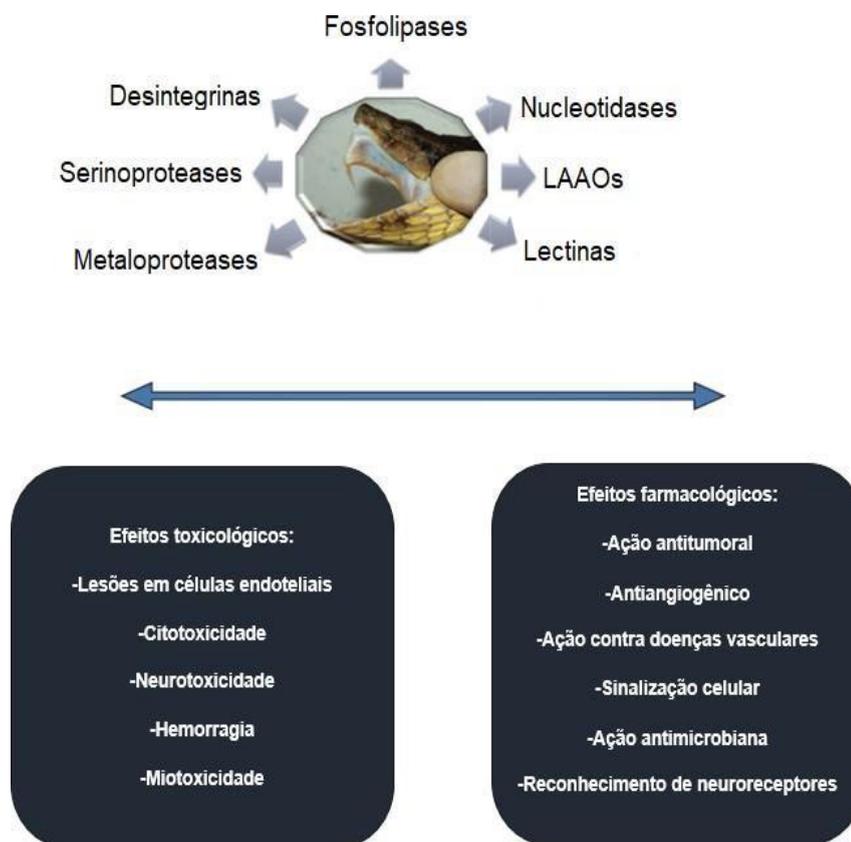


Figura 2. O amplo espectro de ação e recentes aplicações para as toxinas provenientes de venenos ofídicos. A figura retrata os paradigmas entre os efeitos toxicológicos e farmacológicos de proteínas já isoladas. Diferentes células-alvo estão relacionadas com diferentes mecanismos. FONTE: Adaptado de CALDERON e colaboradores (2014).

As LAAOs são enzimas difusamente distribuídas em diversos organismos, tais como bactérias, fungos, algas e serpentes. Elas são flavoenzimas diméricas, que catalisam a desaminação oxidativa de L-aminoácidos em amoníaco, alfa- cetoácidos e peróxido de hidrogênio por meio de um aminoácido intermediário (DU; CLEMETSON, 2002). As LAAOs de venenos de serpentes tornaram-se objeto de interesse em estudos biomédicos devido a suas atividades antimicrobianas, anti- HIV, anticoagulante, propriedades indutoras e inibidoras de agregação plaquetária, indução de apoptose celular, assim como atividades antitumorais (TAN; FUNG, 2009). Uma LAAO isolada do veneno da cobra-real (*Ophiophagus hannah*) demonstrou atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* em células de câncer de próstata (PC-3), com atividade citotóxica e indução de apoptose, sem danos às células normais (LEE et al., 2014). Zhang e Wu (2008) purificaram uma LAAO do veneno de

Agkistrodon acutus que demonstrou citotoxicidade *in vitro* em linhagem celular de câncer de colo de útero (HELA) e de inibir o crescimento do tumor *in vivo*. O acúmulo de células tumorais identificadas em sub-G1 do ciclo celular por citometria sugeriu a indução de apoptose celular e revelou o potencial de desenvolvimento de uma droga antitumoral a partir desta fração isolada.

As lectinas são proteínas polivalentes de ligação a carboidratos de origem não-imune e têm sido amplamente utilizadas como sondas histoquímicas para descrever as alterações na superfície da célula tumoral (CALDERON et al., 2014). A lebecetina, uma lectina tipo C isolada do veneno de *Macrovipera lebetina* demonstrou uma potente atividade anti-integrina, prevenindo a adesão, migração, invasão e proliferação de células tumorais de melanoma e adenocarcinoma humanos utilizadas em ensaios *in vitro* (SARRAY et al., 2004).

As PLA₂ são enzimas de grande interesse científico e médico devido ao seu envolvimento em várias doenças inflamatórias humanas e em casos de envenenamento por serpentes (CALDERON et al., 2014). São enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise de fosfolipídeos de membrana, liberando ácido araquidônico, dando início ao processo inflamatório. As PLA₂ exibem uma variedade de efeitos que são caracterizados pelo aumento da permeabilidade microvascular e formação de edema (VERHEIJ et al., 1980) e são bastante fascinantes de um ponto de vista biológico e estrutural, exibindo uma ampla gama de atividades farmacológicas (BAZAA et al., 2009).

Uma PLA₂ purificada do veneno da víbora *Daboia russelii siamensis* exibiu efeito citotóxico e inibiu a migração celular em uma linhagem celular de melanoma da pele humana (SK-MEL-28), além de reduzir a colonização do pulmão por células tumorais de melanoma (B16F10) em camundongos BALB/c *in vitro* e *in vivo* (KHUNSAP et al., 2011). Chwetzoff e colaboradores (1989) isolaram uma PLA₂ do veneno de *Naja nigricollis* com importante citotoxicidade sobre as culturas de células de vários tumores, tais como tumores epiteliais, neuroblastoma e leucemia. Os mecanismos de atividade antitumoral exibidos por essas moléculas ainda não estão totalmente esclarecidos.

As metaloproteases de veneno de serpentes (SVMs) são os principais fatores responsáveis pela hemorragia, interferindo no sistema hemostático,

facilitando assim a perda de sangue a partir da vasculatura da presa (TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012). Estas enzimas degradam as proteínas da matriz extracelular e componentes do sistema hemostático, que também podem ter efeito citotóxico sobre as células endoteliais (PANFOLI et al., 2010). Também conhecidas como proteases de zinco, as SVMPs são proteínas com multidomínios que, através da autoproteólise, podem gerar produtos biologicamente ativos. De acordo com sua estrutura, essas proteínas são classificadas como classe P-I, que possui apenas um domínio metaloprotease, P-II, que contém um domínio de metaloprotease seguido de um domínio desintegrina, P-III, uma metaloprotease com domínios ricos em desintegrina e cisteína, ou P-IV, a classe heterotrimérica de SVMPs, que possui um domínio adicional tipo-lectina (CALDERON et al., 2014). Um estudo realizado com uma metaloprotease purificada do veneno de *Trimeresurus stejnegeri* em linhagem celular de carcinoma de bexiga humano (ECV304) inibiu a proliferação celular e induziu alterações morfológicas transitoriamente nas células tumorais, porém sem induzir apoptose (WAN et al., 2006).

As desintegrinas presentes no veneno da família das Viperidae podem se apresentar na forma livre ou ligadas ao domínio metaloproteinase, conforme explanado anteriormente. As desintegrinas representam uma família de baixo peso molecular não tóxica e não enzimática (CALDERON et al., 2014). São potentes inibidores da agregação plaquetária, ligando-se aos receptores de integrina, inibindo assim, a via final comum da agregação de plaquetas (TRIKHA; DE CLERCK; MARKLAND, 1994). Uma vez que as integrinas estão intimamente envolvidas na motilidade celular do câncer, invasão e outros processos críticos para a progressão tumoral e metástases, as desintegrinas têm um potencial significativo para a terapia do câncer (CALVETE, 2013). A contortrostatina, uma desintegrina isolada do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix contortrix* demonstrou a habilidade de inibir a progressão de gliomas, inibindo seu crescimento e a angiogênese, através da interação com integrinas da superfície celular, prolongando a sobrevivência do animal, sem apresentar toxicidade neuronal ou sistêmica, sendo bem tolerada pelos animais (PYRKO et al., 2005).

A composição do veneno é extremamente rica, desta forma, outros componentes já estão sendo isolados e avaliados quanto à sua atividade antitumoral. PIVL, um inibidor de serinoprotease isolado do veneno de *Macrovipera*

lebetina, por exemplo, apresentou um efeito antitumoral e atividade inibidora de integrina sem ser citotóxica, inibindo a adesão, migração e invasão de células de glioblastoma humano (U87), com efeito dose-dependente (MORJEN et al., 2013).

Segundo Calixto (2003), o Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio possui um valor econômico-estratégico inestimável nos dias atuais principalmente no desenvolvimento de novos medicamentos.

Em se tratando de serpentes, a fauna brasileira é muito rica, apresentando 265 espécies, classificadas dentro de 73 gêneros, reunidos em 9 famílias. Muitas espécies dessa fauna são ainda mal conhecidas ou pouco estudadas, apesar dessa situação vir se modificando nos últimos anos (MELGAREJO, 2003). As serpentes de interesse médico no Brasil estão representadas pelo gênero *Micrurus*, única representante de interesse médico da Família Elapidae e pelos gêneros representantes da Família Viperidae: *Crotalus*, *Lachesis* e *Bothrops* (BRASIL, 2001, 2005).

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos em território nacional, sendo responsável por cerca de 90% dos envenenamentos (BRASIL, 2001). Seu veneno possui uma variedade de substâncias e alguns de seus componentes químicos já demonstraram potencial antitumoral, como explanado a seguir.

1.4 PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DO VENENO BOTRÓPICO

As serpentes do gênero *Bothrops* compreendem cerca de 30 espécies, distribuídas por todo o território nacional. Possuem cauda lisa e as suas cores apresentam grande variedade, dependendo da espécie e da região onde vivem. São popularmente conhecidas como jararaca, ouricana, jararacuçu, urutu-cruzeira, jararaca-do-rabo-branco, malha-de-sapo, patrona, surucucurana, comboia e caiçaca (PINHO; PEREIRA, 2001).

Aproximadamente 90% dos constituintes do veneno botrópico são proteicos, tratando-se de uma mistura com enorme variedade de substâncias farmacologicamente ativas que atuam isoladamente ou sinergicamente na indução das alterações fisiopatológicas decorrentes do envenenamento (SOUSA et al.,

2001). Seu veneno é responsável por três atividades principais: proteolítica ou necrosante, que induz inflamação na região da picada; coagulante, atua através de uma ou mais ações como trombina símile (semelhante à ação da trombina), ativadora de protrombina e do fator X, promovendo consumo dos fatores de coagulação com consequente alteração da coagulação sanguínea; hemorrágica, que atua no endotélio vascular na região da picada e, provavelmente, também à distância. Outras atividades que podem participar da fisiopatologia do envenenamento são a miotóxica, fibrinogenolítica, fibrinolítica e agregadora de plaquetas (RIBEIRO; JORGE, 1997).

Roberto e colaboradores (2004) demonstraram que uma PLA₂ ácida do veneno de *Bothrops jararacussu*, apresentou efeitos antitumorais possivelmente relacionados com a apoptose sobre linhagens de tumor ascítico de Ehrlich, leucemia (Jurkat) e células de mama, utilizando várias concentrações da enzima. A partir da concentração de 100 µg/mL, a toxicidade foi próxima da apresentada pela droga de controle (Metotrexato), uma droga antifolato usada no tratamento do câncer e doenças autoimunes.

Carvalho e colaboradores (2001) testaram uma lectina isolada da serpente *Bothrops jararacussu* denominada BJcuL em diferentes linhagens tumorais. As células de câncer de mama metastático humano (MDAMB-435) e carcinoma do ovário humano (OVCAR-5) se aderiram, embora fracamente, a BJcuL, além disso, a viabilidade destas células tumorais e células de outras linhagens tumorais humanas foi suprimida por BJcuL, demonstrando seu potencial clínico na diminuição da progressão do tumor. Esta lectina também demonstrou ser um inibidor potente do crescimento em linhagens tumorais renais (Caki-1 e A-498), e pancreáticas (CFPAC- 1). Estes resultados sugerem que a lectina BJcuL é um inibidor eficaz do crescimento celular em algumas linhagens celulares de câncer (PEREIRA- BITTENCOURT et al., 1999).

Santos e colaboradores (2008) isolaram uma LAAO (BjarLAAO-I) do veneno de *Bothrops jararaca* que demonstrou atividade inibitória significativa no crescimento do tumor ascítico de Ehrlich e induziu um influxo de células polimorfonucleares, bem como a liberação espontânea de peróxido de hidrogênio a partir de macrófagos peritoneais. Posteriormente, a LAAO estimulou o influxo de células mononucleares e

espalhamento de macrófagos peritoneais. Os animais com tumor ascítico de Ehrlich tratados com BjarLAAO-I apresentaram maior tempo de sobrevivência.

Dentre as espécies do gênero *Bothrops*, a mais comum na Zona da Mata do Nordeste, que compreende desde a Paraíba até o norte do Espírito Santo, é a espécie *Bothrops leucurus* (MELGAREJO, 2003). Existem trabalhos demonstrando efeitos antitumorais promissores de componentes químicos isolados do veneno desta espécie. A BI-LAAO, isolada do veneno de *B. leucurus*, apresentou citotoxicidade em linhagens de câncer humano de estômago (MKN-45), adenocarcinoma (HUTU), colorretal (RKO) e fibroblastos (LL-24). A enzima libera suficiente peróxido de hidrogênio em meio de cultura para induzir a apoptose em células de uma forma dependente da dose e do tempo (NAUMANN et al., 2011). A desintegrina denominada Leucurogina inibiu o crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos, inibiu a agregação plaquetária induzida por colágeno e exibiu efeito antiangiogênico (dose dependente) (HIGUCHI et al., 2011). Uma lectina do veneno de *B. leucurus* testada exibiu citotoxicidade para diferentes linhagens celulares tumorais (K562, NCI-H292, Hep-2), além de induzir a apoptose em células de leucemia (K562) sem afetar células normais (NUNES et al., 2012). Gabriel e colaboradores (2012) isolaram uma metaloprotease do veneno de *Bothrops leucurus* denominada Leucurolisina-B, com elevada citotoxicidade em diversas linhagens tumorais incluindo linhagens de glioblastoma humano (RT2, T98, Ehrlich, MCF7, UACC,U87), sendo visualizadas mudanças morfológicas características de apoptose celular.

Todas as pesquisas realizadas permitem inferir a nítida e promissora utilização de venenos ofídicos com o intuito de identificar novos compostos com ação antitumoral, visando a inibição do crescimento do câncer e atividade metastática, principalmente em tumores com elevada agressividade e prognóstico desfavorável, como os gliomas.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antitumoral do veneno total, frações cromatográficas e algumas proteínas de interesse provenientes do veneno de *Bothrops leucurus* sobre linhagens de glioma de rato (C6) e humano (U251) em comparação com células normais do SNC (astrócitos).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do tratamento com o veneno total de *Bothrops leucurus* na viabilidade de células da linhagem tumoral de glioma de rato (C6) e comparar com os efeitos em células normais cerebrais (astrócitos),
- Investigar o efeito do veneno total de *Bothrops leucurus* sobre linhagem tumoral de glioblastoma humano (U251),
- Investigar os efeitos do tratamento com as frações cromatográficas do veneno na viabilidade da linhagem tumoral de glioma de rato e comparar com os efeitos em células normais cerebrais (astrócitos),
- Purificar e identificar as proteínas de interesse e avaliar os efeitos do tratamento com as mesmas na viabilidade de células tumorais e comparar com os efeitos em células normais cerebrais (astrócitos),
- Investigar o tipo de morte induzida pelos diferentes tratamentos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 VENENO DE *BOTHROPS LEUCURUS*

O veneno foi extraído de espécimes de *Bothrops leucurus* provenientes do estado da Bahia e armazenado no Laboratório de Neuroimunoendocrinologia e Toxicologia (LABNIET), localizado no Instituto de Ciências da Saúde na Universidade Federal da Bahia (UFBA). As amostras foram coletadas das serpentes por extração manual, sendo, em seguida, secas a vácuo e imediatamente armazenadas no laboratório a uma temperatura de -20 °C até o uso.

3.2 FRACIONAMENTO DO VENENO TOTAL

Uma massa de 11 mg do veneno total foi solubilizada em um volume de 600 µL do tampão de formiato de amônio (100 mM), pH 3,0, e centrifugada a 12.000 g por 5 minutos para remoção do material insolúvel. Um volume de 500 µL (equivalente a 18 mg/mL de proteína) foi aplicado a uma coluna de Superdex 75 10/300 GL, previamente equilibrada. O fluxo de trabalho foi de 0,6 mL/min e frações de 0,5 mL foram coletadas. Imediatamente após o término da corrida cromatográfica os tubos foram mantidos em uma temperatura de 4 °C.

3.3 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFIA

Para a purificação das proteínas foi realizada uma etapa inicial de fracionamento por cromatografia por exclusão molecular. Uma massa de 300 mg de veneno de *B. leucurus* foi solubilizada em 1 mL de tampão de acetato de amônio a 50 mM e NaCl a 300 mM, pH 7,3. A solução foi centrifugada a 12.000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi aplicado na cromatografia. Foi utilizada uma coluna Superdex 200 10/300 GL com eluição isocrática no mesmo tampão no qual a amostra foi solubilizada (tampão acetato de amônio a 50 mM e NaCl a 300 mM, pH 7,3). O fluxo de trabalho foi de 0,8 mL/min. Foram feitas 4 corridas, em que em cada uma foram aplicados 160 µL de amostra (48 mg/mL).

3.3.1 Purificação da Leucurolisina-B

A fração 1 resultante da primeira etapa do fracionamento supracitada foi concentrada em Amicon com corte de 3 kDa. Posteriormente foi submetida a uma segunda etapa cromatográfica por exclusão molecular em uma coluna Superdex 75 10/300 GL, com eluição isocrática em tampão acetato de amônio a 50 mM e NaCl a 300 mM, pH 7,3 a um fluxo constante de 0,8 mL/min. A fração 2 resultante da segunda cromatografia por exclusão molecular (massa molecular de ~60 kDa) foi submetida a uma última etapa de purificação em uma coluna DEAE Sepharose FF (2 x 1 mL) de troca aniônica, com eluição com gradiente linear do tampão a 25 mM de Hepes, 2 mM de CaCl₂ (pH 7,5), e o mesmo tampão contendo 300 mM de NaCl a um fluxo constante de 1 mL/min. O maior pico foi coletado e submetido a análises por espectrometria de massas.

3.3.2 Purificação da Fosfolipase A₂Básica

As frações 3 e 4 resultantes da primeira etapa do fracionamento por exclusão molecular foram coletadas e submetidas a uma coluna HiPrep Q Sepharose FF (20 mL) de troca aniônica com eluição em gradientes de 20, 30, 50 e 100% do tampão B, sendo o tampão A = 20 mM de Tris-HCl (pH 7,5) e tampão B = 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) e 1 M de NaCl, fluxo constante de 4mL/min. O maior pico resultante da cromatografia por troca aniônica foi coletado e a amostra foi carregada em coluna C4 (Supelco, 4,6 x 100 mm), com gradiente linear de 0 a 100% do tampão B, sendo o solvente A = ácido trifluoracético (TFA) a 0,1% e solvente B = acetonitrila (ACN) a 90% em água contendo TFA a 0,1%, em fluxo constante de 1 mL/min.

3.4 DOSAGEM PROTEICA

A concentração de proteínas do veneno total foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Para a realização deste método foi realizada uma curva padrão com diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA). A

leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 750 nm em espectrofotômetro.

As frações resultantes dos processos cromatográficos bem como as proteínas purificadas foram avaliados quanto ao teor proteico através de espectrofotometria pelo aparelho NanoDrop 2000c, que determina a concentração proteica sem necessidade de diluições e utilizando uma quantidade mínima da amostra (2 μ L), entretanto sem perder a sensibilidade (DESJARDINS; HANSEN; ALLEN, 2009), com o intuito de preservar ao máximo as amostras obtidas. Como branco foi utilizado o mesmo tampão no qual os picos foram eluídos na cromatografia. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 280 nm.

3.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

A pureza das frações resultantes dos processos cromatográficos e a eficiência dos métodos de purificação foram avaliadas qualitativamente por eletroforese, sob condições não redutoras, de acordo com o método previamente descrito por LAEMMLI (1970). O gel de empilhamento, contendo poliacrilamida a 30%, Tris a 1,5 M (pH 6,8), SDS a 10% e H₂O destilada (q.s.p), e o gel de resolução, contendo poliacrilamida a 30%, Tris a 1,5 M (pH 8,8), SDS a 10% e H₂O destilada (q.s.p), foram preparados a uma concentração de 4% e 12% de poliacrilamida respectivamente. Para que ocorresse a polimerização dos géis, foram adicionados agentes catalisadores (persulfato de amônio e *N,N,N,N*-tetrametil etilenodiamina - TEMED). Posteriormente, 30 μ g/mL por poço de cada amostra foram aplicados no gel juntamente com o padrão de peso molecular. O gel de poliacrilamida foi submetido à eletroforese sob uma voltagem constante de 90 V utilizando um equipamento Mighty Slim sx 250 da Hoefer®. Após a corrida eletroforética, os géis foram imediatamente corados com solução de Coomassie Brilliant Blue G-250 a 2,5% durante duas horas à temperatura ambiente em um agitador de Kline. Em seguida os géis foram transferidos para a solução descorante de ácido acético glacial a 10 % (v/v) em etanol.

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A zimografia é um método simples e eficiente para avaliação de atividade proteolítica. Para esta análise foram utilizados como substratos a gelatina e a caseína (2 mg/mL). O substrato foi copolimerizado com o gel de resolução. Os géis de empilhamento e resolução foram preparados sob as mesmas condições citadas no item 3.5. Posteriormente, 30 µg/mL por poço de cada amostra foram aplicados no gel. Como controle positivo foi empregado o veneno total de *Bothrops jararaca*, que possui uma concentração elevada de proteases. Como padrão de peso molecular, foi utilizado *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Scientific). O gel de poliacrilamida foi submetido à eletroforese sob uma voltagem constante de 90 V utilizando um equipamento Mighty Slim sx 250 da Hoefer®. Após a corrida, o gel foi agitado em solução de Triton-X 100 a 2,5 % para remoção do SDS durante 15 minutos. Este procedimento foi repetido 3 vezes. O gel foi então mantido em solução de incubação (Tris-HCl a 50 mM, CaCl₂ a 5 mM e H₂O destilada q.s.p.) *overnight* a 37 °C. Posteriormente, o gel foi transferido para corante Coomassie Brilliant Blue G- 250 a 2,5% durante duas horas à temperatura ambiente em um agitador de Kline. Em seguida os géis foram transferidos para a solução descorante de ácido acético glacial a 10% (v/v) em etanol.

3.7 WESTERN BLOTTING

A técnica de *Western Blotting* foi realizada utilizando um gel de gradiente de poliacrilamida (4-20 %) da GE Healthcare com a fração 1 resultante da primeira cromatografia por exclusão molecular realizada com o veneno total. A separação eletroforética foi realizada em condições redutoras, utilizando um tampão de amostra contendo beta-mercaptoetanol aquecendo as amostras em termobloco próprio para tubos tipo Eppendorf até ferver durante 5 minutos antes da eletroforese. A corrida eletroforética foi realizada sob as mesmas condições explicitadas anteriormente (item 3.5 do manuscrito). As amostras foram então transferidas para uma membrana de nitrocelulose durante uma hora sob corrente de 90 V utilizando um equipamento Mighty Slim sx 250 da Hoefer®. Para a realização da transferência foi utilizado um

tampão contendo glicina a 192 mM, Tris a 25 mM, SDS a 0,037% e metanol a 10%, com pH 8,3. Após lavagem com tampão fosfato salino (PBS), a membrana foi incubada durante uma hora com solução de bloqueio contendo 5% de leite em pó, desnatado. A membrana foi posteriormente incubada *overnight* a 4 °C, em solução de anticorpo primário de coelho anti-jararagina (metaloprotease PIII do veneno de *Bothrops jararaca*), em uma diluição 1:5000 em solução de bloqueio. Após lavagem da membrana com PBS, a mesma foi incubada com o anticorpo secundário anti-igG de coelho conjugado com peroxidase (1:5000). Para revelação, utilizou-se solução cromogênica (peróxido de hidrogênio a 30%, 10 mg de Diaminobenzidina (DAB) e 50 mL de PBS). Como controle positivo foi utilizado o veneno bruto de *Bothrops jararaca* (2 mg/mL). Como padrão de peso molecular, foi utilizado o *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific), contendo 10 proteínas recombinantes variando de 10 kDa a 170 kDa.

3.8 ESPECTROMETRIA DE MASSA

Para espectrometria de massa tipo *electrospray*, as análises foram realizadas em um instrumento IT-ToF (Shimadzu Co., Japan), no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan. As bandas de interesse provenientes do SDS PAGE foram recortadas, descoradas em solução a 75 mM de NH_4HCO_3 em etanol a 40% durante duas horas ou até que as bandas ficassem totalmente descoradas. Em seguida, após a remoção da solução descorante, foi adicionada solução redutora (5 mM de DTT em NH_4HCO_3 a 25 mM), posteriormente ao tempo de incubação de 30 minutos a 60°C, adicionou-se a solução alquilante (iodoacetamida a 55 mM em 25 mM de NH_4HCO_3), por 30 minutos em temperatura ambiente, no escuro. Após a remoção da solução alquilante, procedeu-se a etapa de desidratação com acetonitrila 100%, com três lavagens de 10 minutos cada. A acetonitrila foi totalmente removida e o restante da solução evaporou à temperatura ambiente. Após a secagem completa das bandas, os fragmentos de gel foram reidratados em solução de tripsina na concentração 40 ng/ μL , diluída em NH_4HCO_3 a 50 mM e as amostras mantidas no gelo e incubadas durante 45 minutos. Em seguida, a solução de tripsina foi retirada e uma nova lavagem utilizando NH_4HCO_3 a 50 mM foi

adicionada e as amostras foram mantidas *overnight* à temperatura ambiente. A etapa de extração dos peptídeos foi realizada adicionando novamente o NH_4HCO_3 50 mM, e as amostras foram sonicadas durante 10 minutos. Posteriormente foi adicionada solução de acetonitrila com TFA 5% e novamente as amostras foram sonicadas. Em seguida, o sobrenadante com os peptídeos extraídos foi coletado. A etapa de sonicação com solução de acetonitrila com TFA 5% foi repetida mais duas vezes. Por último, as amostras foram sonicadas em acetonitrila 100%, e o sobrenadante foi adicionado aos outros das etapas anteriores. Os peptídeos resultantes foram ressuspensos em solução a 50% de acetonitrila, contendo 0,5% de ácido fórmico e analisados em espectrômetro de massas do tipo *electrospray*, sob fluxo constante de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. O controle do equipamento e aquisição dos dados foi realizado pelo software LCMS Solution e o processamento de dados pelo Mascot (Matrix Science) e Peaks (Bioinformatics Solutions Inc.).

3.9 CULTURA CELULAR

3.9.1 Cultura de Células de Glioma Murino (C6) e Glioblastoma Humano (U251)

As linhagens de glioma de rato (C6) e glioblastoma humano (U251) encontravam-se conservadas em uma solução de 90 % de SFB e 10% de DMSO à razão de $1,5\text{-}2,0 \times 10^6$ células/mL e estocadas em criotubos a $-196\text{ }^\circ\text{C}$ (nitrogênio líquido) no banco de células do Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq), Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia. Para a realização dos experimentos, os criotubos foram descongelados e o conteúdo dos mesmos transferidos para tubos tipo Falcon, nos quais foi adicionado posteriormente meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2 mM de L-glutamina, penicilina a 100 UI./mL e estreptomicina a 100 g/mL. Os tubos foram então centrifugados por 3 min a 12.000 g. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio DMEM para serem cultivadas em condições estéreis, a $37\text{ }^\circ\text{C}$ em atmosfera com 5% de CO_2 em placas de cultura de poliestireno com 100 mm de diâmetro até atingirem 80% de confluência. Para manutenção da cultura, foi utilizado o meio DMEM, nas mesmas condições citadas anteriormente, com troca de meio realizada a cada 48 horas.

Após atingirem a confluência, as células foram descoladas da placa através de uma solução de 0,05% de tripsina (GIBCO® Invitrogen Corporation, Canadá – USA) com 0,02% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e mantidas em incubadora por 3 min a 37 °C. A digestão enzimática foi neutralizada adicionando-se igual volume de meio de cultura suplementado com 10% de SFB e as células foram então semeadas em placas de 24 ou 96 poços ou 35 mm de diâmetro, de acordo com o objetivo do teste (contagem celular realizada em câmara de Neubauer). Os experimentos foram realizados respeitando o número máximo de 10 passagens, as que atingiram passagens superiores foram descartadas, a fim de garantir a homogeneidade dos grupos e máxima reprodutibilidade dos resultados.

3.9.2 Cultura Primária de Astrócitos

Os astrócitos foram obtidos a partir de 2 protocolos bem consolidados no LabNq e utilizados rotineiramente para este tipo de cultura primária. O protocolo 1 teve como base o método de Cookson e Pentreath (1994) adaptado. Foram utilizados ratos *Wistar* neonatos (0–1 dia) obtidos do Biotério do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS-UFBA). Para o procedimento, os animais foram decapitados e seus hemisférios cerebrais expostos e removidos assepticamente, as meninges e os vasos sanguíneos foram retirados do córtex cirurgicamente e em seguida, o córtex foi dissociado mecanicamente. As células dissociadas foram suspensas e semeadas em garrafas de cultura de poliestireno de 75 cm² juntamente com meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As células da microglia foram removidas a cada 48 horas após semeadura por meio de agitação mecânica, tal procedimento teve como objetivo garantir a predominância de células astrocitárias. As células foram cultivadas nas mesmas condições estabelecidas para as células tumorais descritas anteriormente e a confluência ocorreu em aproximadamente três semanas (21 dias) após o estabelecimento da cultura.

Para o protocolo 2, foram utilizados animais nas mesmas condições do protocolo anterior (ratos *Wistar* com no máximo 1 dia de vida). O processo cirúrgico foi realizado da mesma forma como anteriormente descrita. As células dissociadas foram suspensas e semeadas em garrafas de cultura de poliestireno de 75 cm²,

previamente sensibilizadas com poli-D-lisina e mantidas a 37 °C em atmosfera com 5 % de CO₂ por 7 dias, sem troca de meio durante o período. Após os 7 dias, as garrafas foram submetidas a agitação por 3 horas utilizando uma câmara incubadora com agitação orbital (Shaker), com o intuito de garantir a prevalência astrocitária na cultura. O sobrenadante (contendo microglia descolada), foi desprezado e as garrafas receberam meio DMEM novo, permanecendo posteriormente na incubadora sem troca de meio por mais 5 dias, até confluência da garrafa e utilização para os experimentos.

Após atingirem a confluência, as células foram descoladas das garrafas através de uma solução de 0,05% de tripsina (GIBCO® Invitrogen Corporation) com 0,02% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e mantidas em incubadora por 3 min a 37 °C. A digestão enzimática foi neutralizada adicionando-se igual volume de meio de cultura suplementado com 10% de SFB e as células foram então semeadas em placas de 24 ou 96 poços ou 35 mm de diâmetro, de acordo com o objetivo do teste (contagem celular realizada em câmara de Neubauer).

Para a realização dos experimentos o projeto foi submetido e aprovado pelo Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICS–UFBA (Protocolo de aprovação nº 068/2014) e todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas por este e obedeceram as normas éticas de uso de animais de laboratório propostas pela Sociedade Brasileira de Animais de laboratório (SBCAL) e normatizadas pela legislação vigente e todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas por este. O certificado de aprovação está no Anexo A do manuscrito.

3.10 Avaliação da Atividade de Desidrogenases Mitocondriais pelo Teste do MTT

A atividade de desidrogenases mitocondriais foi mensurada através do método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) estabelecido por Mosmann (1983). O teste colorimétrico baseia-se na capacidade das células viáveis em metabolizar através das desidrogenases mitocondriais, o MTT (de coloração amarela), culminando na formação de cristais de formazan de coloração púrpura. A técnica foi realizada em placas de 96 poços. As

células foram lançadas com densidade de aproximadamente 30.000 células/cm² para linhagens celulares tumorais (C6 e U251) e aproximadamente 90.000 células/cm² para culturas primárias de astrócitos. As células foram submetidas aos tratamentos de interesse, por tempo determinado. Posteriormente, o meio de cultura foi trocado e o MTT, solubilizado previamente em PBS (tampão fosfato), foi diluído em cada poço contendo meio de cultura resultando em uma concentração final 1 mg/mL por poço. Após o período de incubação predeterminado, as células foram lisadas pela adição de 100 µL de duodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% (p/v) em dimetilformamida a 50% (v/v). As placas foram submetidas a espectrofotometria e a absorbância medida em um comprimento de onda de 595 nm, usando um leitor de microplacas.

Em um dos poços de cada placa foi adicionado meio de cultura e MTT, porém sem células. O mesmo foi usado como branco, e o valor de absorbância deste foi descontado de todos os outros. Os experimentos possuíram um grupo controle no qual as células foram tratadas apenas com meio DMEM e um grupo em que as células foram tratadas com meio DMEM e PBS, utilizado para solubilizar o veneno e as frações. Elevados valores de absorbância, sugerindo presença de formazan, foram relacionados positivamente a alta viabilidade celular. Os dados foram submetidos às análises estatísticas adequadas, incluindo cálculo de EC₅₀ por regressão não linear, quando foi o caso e expressos relativamente como percentual do grupo controle sem tratamento, cuja média, ou mediana (a depender da distribuição dos dados), corresponde a 100% de viabilidade.

3.11 Detecção do Tipo de Morte Celular por Citometria De Fluxo após 72 horas

de exposição às concentrações escolhidas de veneno total e proteínas purificadas, as células cultivadas em placas de Petri (3,5mm de diâmetro), foram tripsinizadas e centrifugadas (2.000 g por 5 minutos). Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em PBS duas vezes para lavagem de remanescentes de meio de cultura e posteriormente ressuspensas no tampão do kit e incubadas, durante 15 minutos, com anexina V-FITC e iodeto de propídio (IP), conforme o protocolo estabelecido pelo fabricante (TACS TM Annexin-V-Kit, Trevigen, Gaithersburg, Alemanha). A anexina V é uma proteína com propriedades de ligação à

fosfatidilserina. Em células normais a fosfatidilserina está localizada na região interna da membrana plasmática. Na apoptose a fosfatidilserina é translocada para a região externa da membrana, ficando exposta a marcadores celulares como a anexina-V. Entretanto, recomenda-se a utilização de IP, que marca somente as células necrosadas, ou em estágio tardio de apoptose, permitindo a diferenciação dos dois processos. As células vivas não serão marcadas nem por anexina V, nem por IP. As análises das respostas aos tratamentos foram padronizadas para 10.000 células usando o programa Cell quest 3.1 para FACSort (Becton Dickinson San Jose, E.U.A.). Foram usados os detectores de FL-1 para aquisição dos dados correspondentes à marcação com anexina V e o FL-2 para IP.

3.12 Microscopia de Contraste de Fase

As culturas foram acompanhadas com microscopia de contraste de fase, que também foi usada para avaliação da celularidade e morfologia celular. As imagens foram adquiridas através de câmera digital de alta resolução (Labomed iVu5000) acoplada ao microscópio invertido. Uma régua micrométrica foi fotografada em mesmo aumento para confecção da barra de escala das fotomicrografias.

3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados gerados receberam tratamento estatístico adequado, sendo expressos como média e erro padrão da média, ou mediana e percentil. Como o número amostral não foi superior a 20 em nenhum dos testes, a distribuição foi considerada normal se satisfizesse as seguintes condições: passar no teste de normalidade (teste de D'Agostino e Pearson), no intervalo entre -1 e +1 na assimetria (skewness) e no intervalo entre -1,5 e +1,5 no curtose (kurtosis); e considerada não normal se satisfizesse as seguintes condições: não passar no teste de normalidade ou apresentar assimetria ou curtose fora dos intervalos citados. Para conjuntos de dados representados por média (portanto, com distribuição normal), testes estatísticos paramétricos foram usados nas comparações entre grupos tratados e controles, enquanto testes não paramétricos foram usados para aqueles

representados por mediana (com distribuição não-normal). O teste usado para cada análise está especificado na apresentação dos resultados; os mais utilizados foram os paramétricos t de Student não pareado para análise binária, One-Way ANOVA (seguido do teste de Dunnett), e os não paramétricos de Mann-Whitney para análise binária ou de Kruskal-Wallis (seguido do teste de Dunns) para múltipla comparação. O software GraphPad Prism, versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA) foi utilizado nas análises. Regressões não lineares, como a utilizada para cálculo de EC_{50} , foram feitas utilizando-se modelos de equação logarítmica da biblioteca do programa e só foram consideradas para efeito de cálculos quando o coeficiente de regressão (R^2) foi superior a 0,9. Os valores de p adotados como estatisticamente significantes nas análises foram aqueles superiores a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 VENENO TOTAL

4.1.1 Dosagem Proteica

O veneno total foi analisado quanto à concentração proteica. O teor de proteínas do veneno de *Bothrops leucurus* foi estimado em 0,84 mg/mL (mediana de um experimento com n=3 com variação de 0,78 a 0,86 mg/mL).

4.1.2 Ensaio de Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade com o veneno total de *Bothrops leucurus* foram realizados em três experimentos independentes em triplicatas para cada linhagem celular tumoral ou células de cultura primária utilizadas como controle (astrócitos). As células foram submetidas ao tratamento com veneno em concentrações crescentes (1 a 100 µg/mL) por um período de 72 horas. A viabilidade celular foi mensurada através do método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolium (MTT).

O teste demonstrou claramente um efeito citotóxico dependente da concentração do veneno total para células da linhagem C6 e apontou um valor de EC₅₀ (concentração necessária para diminuir em 50% a viabilidade celular) de 2,66 µg/mL (mediana dos valores de todos os experimentos com variação de 1,93 a 4,73 µg/mL, n=9). Os dados obtidos no experimento correspondendo ao valor mediano da EC₅₀ são mostrados na Fig. 3 e a equação da regressão não linear que melhor se ajustou aos pontos experimentais e que foi usada para calcular a EC₅₀ é apresentada na equação (1)

$$(1) V = \{90,76 / [1 + 10^{(-1,67 + 3,68x)}]\} - 0,76 \quad (R^2 = 0,98)$$

Em que V corresponde à viabilidade celular e x corresponde ao logaritmo da concentração.

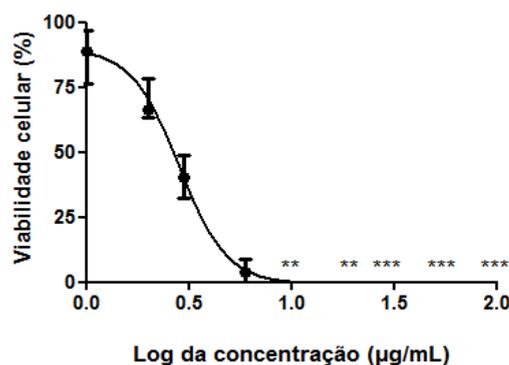


Figura 3. Citotoxicidade do veneno total de *Bothrops leucurus* para células C6 de glioma de rato. O experimento aqui representado corresponde ao valor da mediana da EC₅₀. A citotoxicidade é dependente de concentração do veneno total, mensurada através de medida espectrofotométrica do formazan. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 1,92, com variação entre 1,80 a 2,23). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 83,10% com variação de 76,90 a 102,60 (**p < 0,01; *** p < 0,001). Regressão não linear usada para calcular o valor da EC₅₀ (2,66 µg/mL).

A partir dos resultados com a linhagem C6, o próximo passo consistiu em testar a toxicidade do veneno em células normais do SNC, os astrócitos. A equipe do LabNq (Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular) possui dois protocolos bem estabelecidos para cultivo de astrócitos. Os protocolos são similares quanto ao processo cirúrgico, mas diferem no lançamento da cultura primária na garrafa de cultivo, manutenção da cultura pós-lançamento e retirada da microglia, conforme explanado anteriormente neste trabalho.

Os astrócitos dos diferentes protocolos foram submetidos ao tratamento citado anteriormente para células C6. O efeito citotóxico foi dependente da concentração e apontou um valor de EC₅₀ de 9,46 µg/mL ± 0,59 (média dos valores de todos os experimentos, n=9) para astrócitos obtidos através do protocolo 1, no

qual células da microglia foram removidas a cada 48 horas após semeadura por meio de agitação mecânica. Os dados obtidos no experimento correspondendo ao valor mais próximo à média da EC_{50} são mostrados na Fig. 4 e a equação da regressão não linear que melhor se ajustou aos pontos experimentais e que foi usada para calcular este valor é apresentada na equação (2). Para astrócitos obtidos através do protocolo 2, no qual a microglia só foi retirada 7 dias após semeadura, o valor de EC_{50} foi de $11,14 \mu\text{g/mL} \pm 1,448$ (média dos valores de todos os experimentos, $n=9$). Os dados obtidos no experimento correspondendo ao valor mais próximo à média da EC_{50} são mostrados na Fig. 5 e a equação da regressão não linear que melhor se ajustou aos pontos experimentais e que foi usada para calcular este valor é apresentada na equação (3).

$$(2) V = \{92,77/[1+10^{(-3,80+3,80x)}]\} - 0,96 \quad (R^2 = 0,97)$$

Em que V corresponde à viabilidade celular e x corresponde ao logaritmo da concentração.

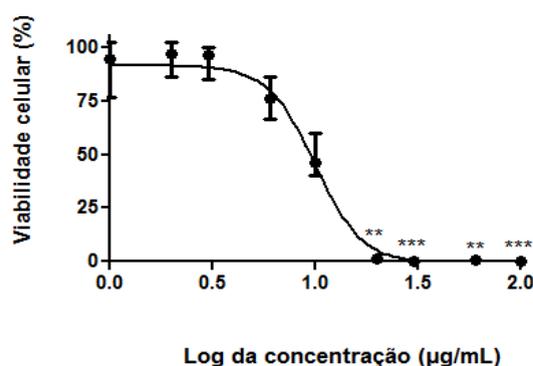


Figura 4. Citotoxicidade do veneno total de *Bothrops leucurus* para astrócitos de rato obtidos através do protocolo 1. O experimento aqui representado corresponde ao valor mais próximo à média da EC_{50} . A citotoxicidade é dependente de concentração do veneno total, mensurada através de medida espectrofotométrica do formazan. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 0,87, com variação de: 0,74 a 0,93. Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 97,97% com variação de 83,34 a 109,10 (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Regressão não linear usada para calcular o valor da EC_{50} (9,48 $\mu\text{g/mL}$).

$$(3) V = 1,25 + \{100,64/[1+10^{(5,79+5,63x)}]\} (R^2 = 0,98)$$

Em que V corresponde à viabilidade celular e x corresponde ao logaritmo da concentração.

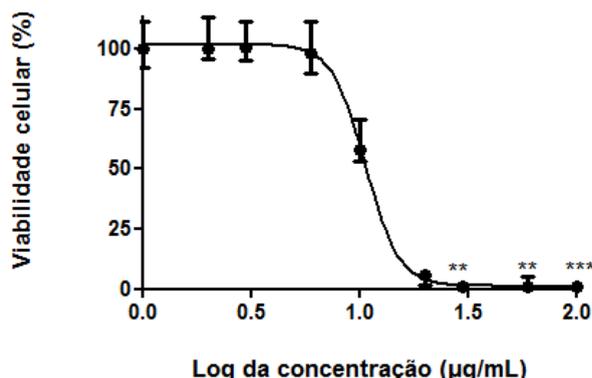


Figura 5. Citotoxicidade do veneno total de *Bothrops leucurus* para astrócitos de rato obtidos através do protocolo 2. O experimento aqui representado corresponde ao valor mais próximo à média da EC_{50} . A citotoxicidade é dependente de concentração do veneno total, mensurada através de medida espectrofotométrica do formazan. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 0,96, com variação de: 0,90 a 1,08). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 99,93% com variação de 95,09 a 117,10 (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Regressão não linear usada para calcular o valor da EC_{50} (10,81 µg/mL).

Os protocolos para isolamento de astrócitos foram comparados com o intuito de averiguar se a diferença no processo de obtenção de cultura primária afetaria de alguma forma a resistência das células frente ao tratamento com diferentes concentrações com o veneno total e avaliar qual protocolo seria adotado como padrão para os próximos experimentos. Os valores da EC_{50} foram comparados através de testes paramétricos e foi possível observar que o protocolo 2 para isolamento astrocitário apresentou células mais resistentes ao tratamento com o veneno total em comparação com as células isoladas a partir do protocolo 1 (Fig. 6).

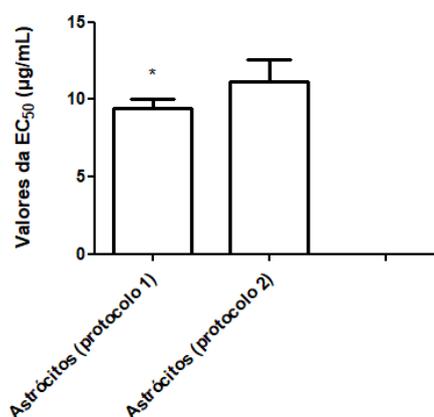


Figura 6. Comparação entre os valores obtidos através do cálculo da EC₅₀ para diferentes protocolos de isolamento de astrócitos (n=9) – os valores obtidos através do cálculo da EC₅₀ de todos os experimentos de citotoxicidade com astrócitos de ambos os protocolos foram comparados através do teste t student paramétrico. Houve diferença significativa entre os protocolos (* p < 0,05).

Os valores obtidos com o cálculo da EC₅₀ para C6 e para os astrócitos obtidos através do protocolo 1 foram colacionados e foi possível perceber uma maior susceptibilidade das células C6 ao tratamento com o veneno total mesmo em comparação com os astrócitos menos resistentes (Fig. 7). O protocolo 1 utilizado para obtenção desses astrócitos foi então adotado como padrão para as próximas análises.

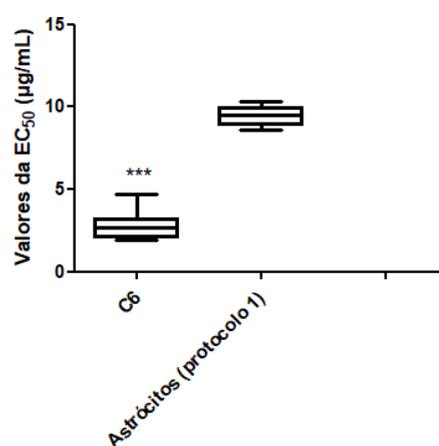


Figura 7. Comparação entre os valores obtidos através do cálculo da EC₅₀ para células de C6 de glioma de rato e astrócitos obtidos através do protocolo 1 (n=9). Os valores obtidos através do cálculo da EC₅₀ foram comparados através do teste não-paramétrico Mann-Whitney. Houve diferença significativa entre as análises (***) p < 0,001).

Posteriormente as células da linhagem U251 foram submetidas aos testes de citotoxicidade. O efeito citotóxico foi dependente da concentração e apontou um valor de EC_{50} de $3,60 \mu\text{g/mL} \pm 0,15$ (média dos valores de todos os experimentos, $n=9$). Os dados obtidos no experimento correspondendo ao valor mais próximo à média da EC_{50} são mostrados na Fig. 8 e a equação da regressão não linear que melhor se ajustou aos pontos experimentais e que foi usada para calcular este valor é apresentada na equação (4).

$$(4) V = 0,20 + \{98,88 / [1 + 10^{(1,97+3,54x)}]\} (R^2 = 0,98)$$

Em que V corresponde à viabilidade celular e x corresponde ao logaritmo da concentração.

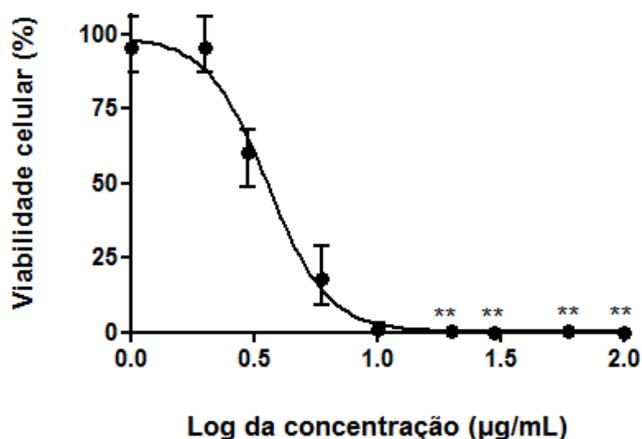


Figura 8. Citotoxicidade do veneno total de *Bothrops leucurus* para células U251 de glioblastoma humano. O experimento aqui representado corresponde ao valor mais próximo à média da EC_{50} . A citotoxicidade é dependente de concentração do veneno total, mensurada através de medida espectrofotométrica do formazan. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 1,55, com variação de: 1,44 a 1,75). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 97,73% com variação de 87,04 a 100,60 (** $p < 0,01$). Regressão não linear usada para calcular o valor da EC_{50} ($3,59 \mu\text{g/mL}$).

Os resultados dos valores provenientes dos cálculos da EC_{50} referentes à citotoxicidade do veneno total para as duas linhagens celulares de gliomas testadas (C6 e U251) foram comparadas com o intuito de averiguar a existência de diferenças relevantes. Foi observado que as células de glioma de rato (C6) foram mais sensíveis ao veneno com efeito citotóxico dependente da concentração (Fig. 9).

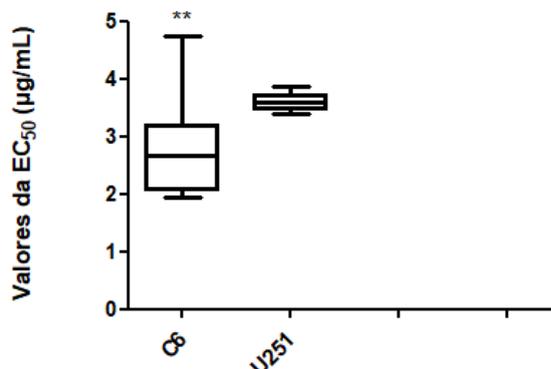


Figura 9. Comparação entre os valores obtidos através do cálculo da EC_{50} para células de glioma de rato C6 e células de glioblastoma humano U251 (n=9). Os valores obtidos através do cálculo da EC_{50} foram comparados através do teste não-paramétrico Mann-Whitney. Houve diferença significativa entre as análises (** $p < 0,01$).

4.1.3 Avaliação da Morfologia Celular e Celularidade

A morfologia de todas as células antes e após período de tratamento foi acompanhada com o auxílio de um microscópio de fase. Foi possível observar que após o tratamento de células de glioma de rato (C6) com a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ do veneno total não houve diminuição da celularidade, sendo possível observar uma monocamada celular homogênea e confluenta de células fusiformes em comparação com as células não tratadas (apenas com meio DMEM) (Fig. 10). A partir do tratamento com a concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ e concentrações posteriores é possível observar uma diminuição da celularidade de forma proporcional ao aumento das concentrações e modificações na morfologia celular de fusiforme para arredondada (Fig. 11), restando apenas *debris* celulares após tratamento com a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 12), demonstrando que de fato o efeito citotóxico do veneno total é dependente da concentração.

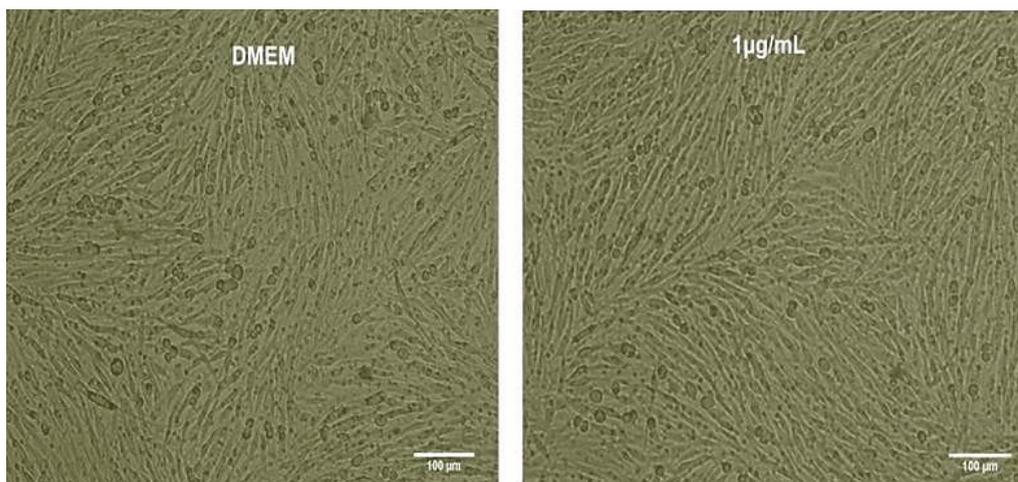


Figura 10. Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de células C6 não tratadas (DMEM) ou tratadas com a concentração de 1 µg/mL do veneno total, após um período de 72 horas. É possível observar uma monocamada celular homogênea e confluenta de células fusiformes na concentração de 1 µg/mL, não havendo diminuição da celularidade comparável com o controle (DMEM). Barra = 100µm.

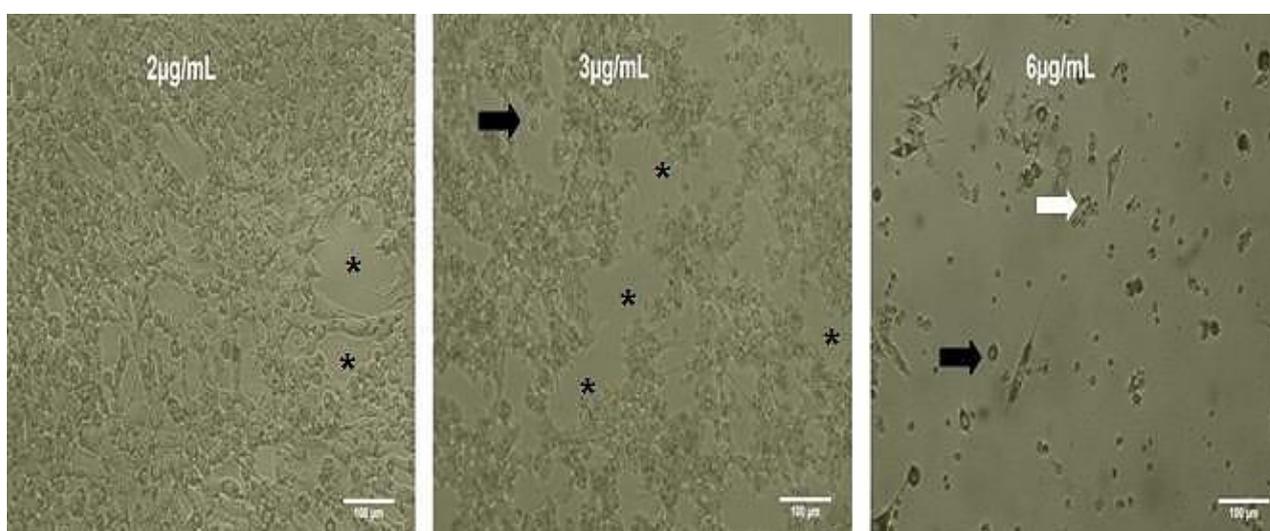


Figura 11. Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de células C6 tratadas com as concentrações de 2 a 6 µg/mL do veneno total após um período de 72 horas. É possível observar que a partir da concentração de 2 µg/mL há uma diminuição da celularidade, sendo esta proporcional ao aumento das concentrações, e mudança na morfologia celular de fusiformes para arredondadas. Os asteriscos representam os espaços vazios, as setas brancas apontam para os *debris* celulares e as setas pretas apontam células arredondadas. Barra = 100 µm.

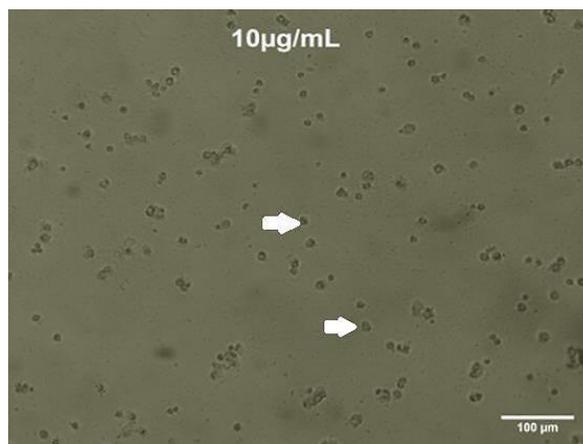


Figura 12. Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de células C6 tratadas com a concentração de 10 µg/mL do veneno total após um período de 72 horas. É possível observar que após tratamento com esta concentração restam apenas *debris* celulares, apontados pelas setas brancas. Barra = 100 µm.

A morfologia dos astrócitos obtidos através dos diferentes protocolos também foi observada antes e após o tratamento com diferentes concentrações do veneno total, sendo possível observar a existência de células retraídas e emitindo prolongamentos de forma mais pronunciada em células obtidas através do protocolo 2, inclusive no controle (células não tratadas com o veneno), devido ao contato prolongado das células com a microglia. Após o tratamento com a concentração de 3 µg/mL do veneno total não é possível observar diminuição da celularidade, havendo uma monocamada celular homogênea e confluenta de células poligonais planas e achatadas comparável com o controle de células não tratadas em astrócitos obtidos através de ambos os protocolos (Fig. 13). A partir do tratamento com a concentração de 6 µg/mL observa-se diminuição da celularidade de forma proporcional ao aumento das concentrações (Fig. 14), restando apenas *debris* celulares após tratamento com a concentração de 20 µg/mL para células astrocíticas provenientes dos dois tipos de protocolo (Fig. 15).

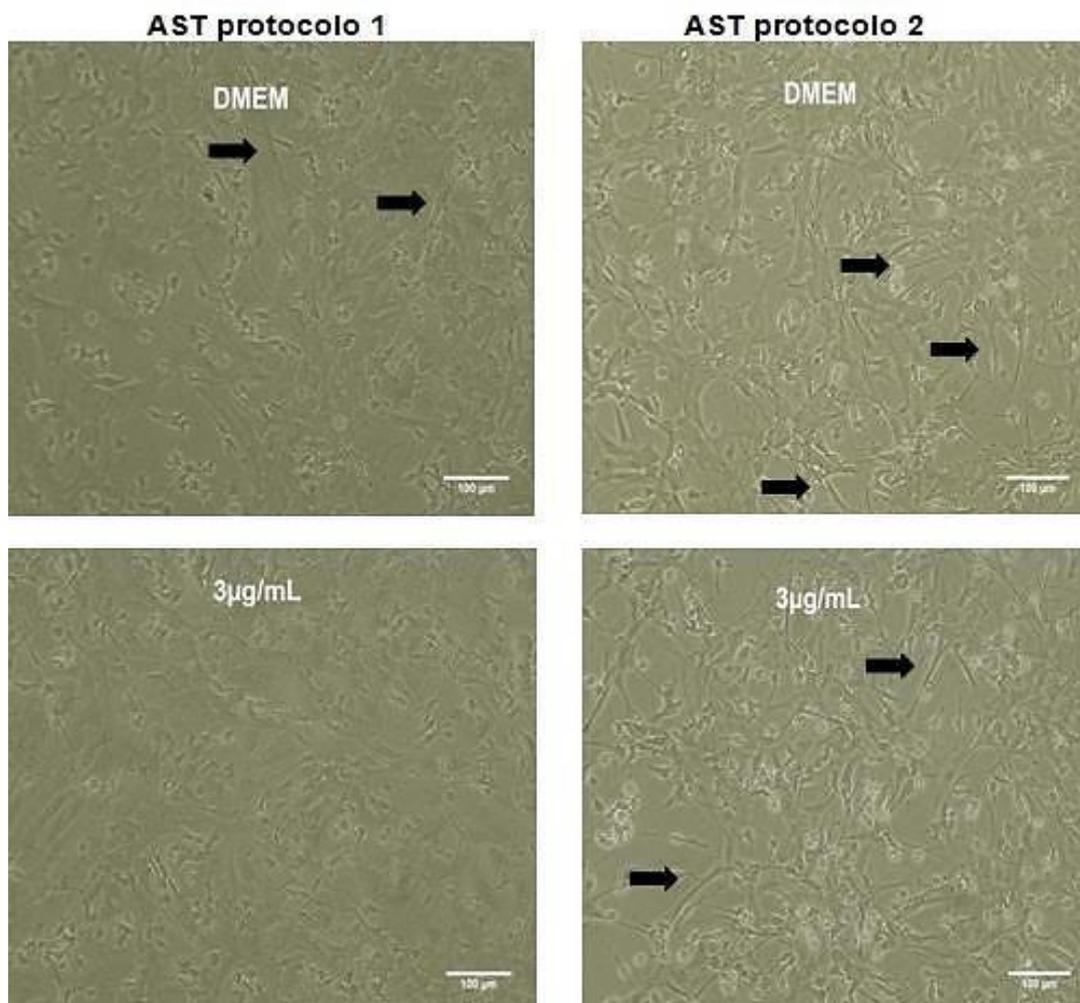


Figura 13. Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia celular dos astrócitos obtidos através dos diferentes protocolos estabelecidos no LabNq não tratados (DMEM) ou tratados com a concentração de 3 µg/mL do veneno total, após um período de 72 horas. É possível observar uma monocamada celular homogênea e confluenta de células poligonais planas e achatadas nas células tratadas com a concentração de 3 µg/mL não havendo diminuição da celularidade comparável com o controle (DMEM). As setas pretas indicam astrócitos retraídos e emitindo prolongamentos. Barra = 100 µm.

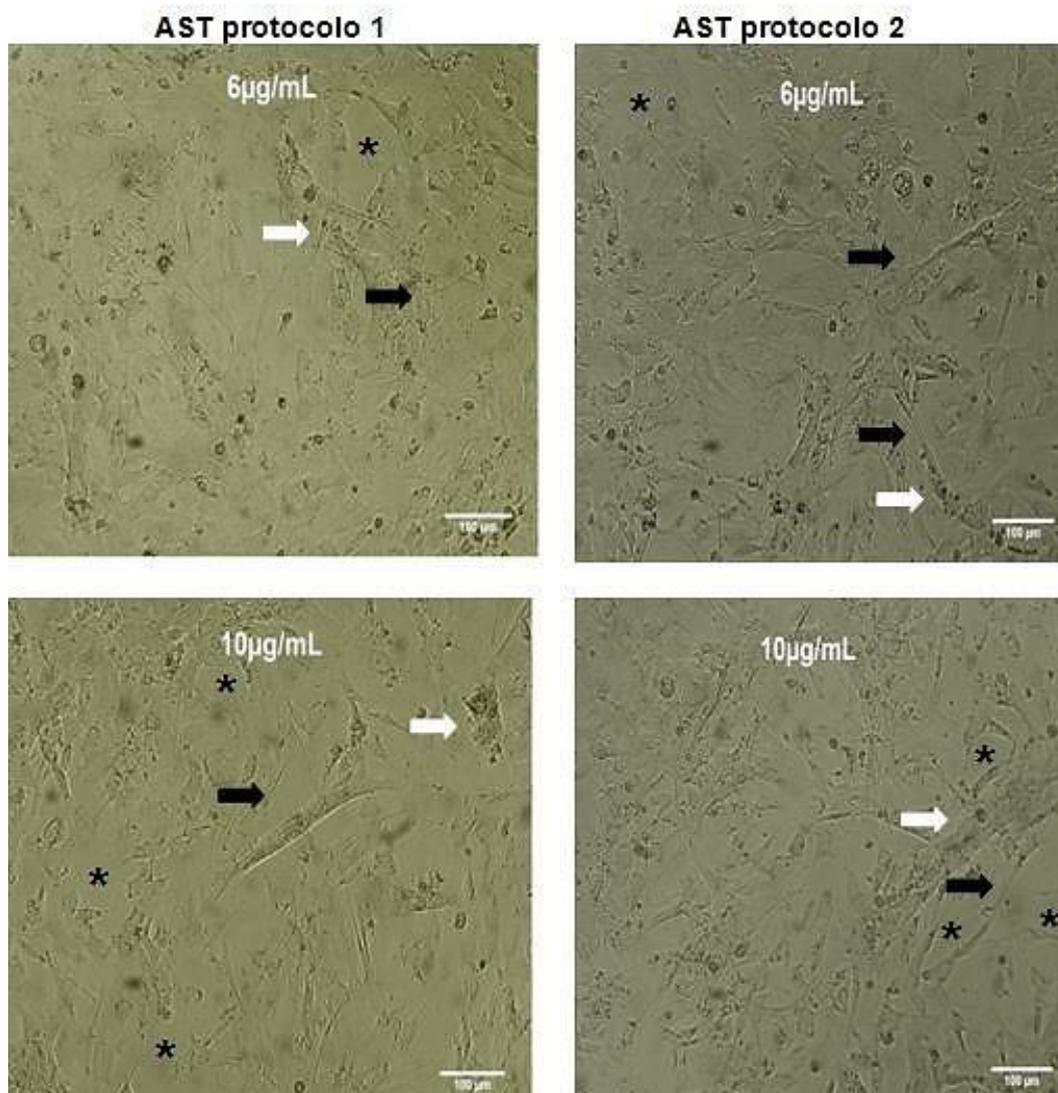


Figura 14. Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia celular dos astrócitos obtidos através dos diferentes protocolos estabelecidos no LabNq tratados com as concentrações de 6 e 10 µg/mL do veneno total após um período de 72 horas. É possível observar que a partir da concentração de 6 µg/mL há uma diminuição da celularidade, sendo esta proporcional ao aumento das concentrações. Os asteriscos representam os espaços vazios, as setas brancas na imagem apontam citoplasma pontilhado e *debris* celulares, as setas pretas apontam para astrócitos retraídos e emitindo prolongamentos. Barra = 100 µm.

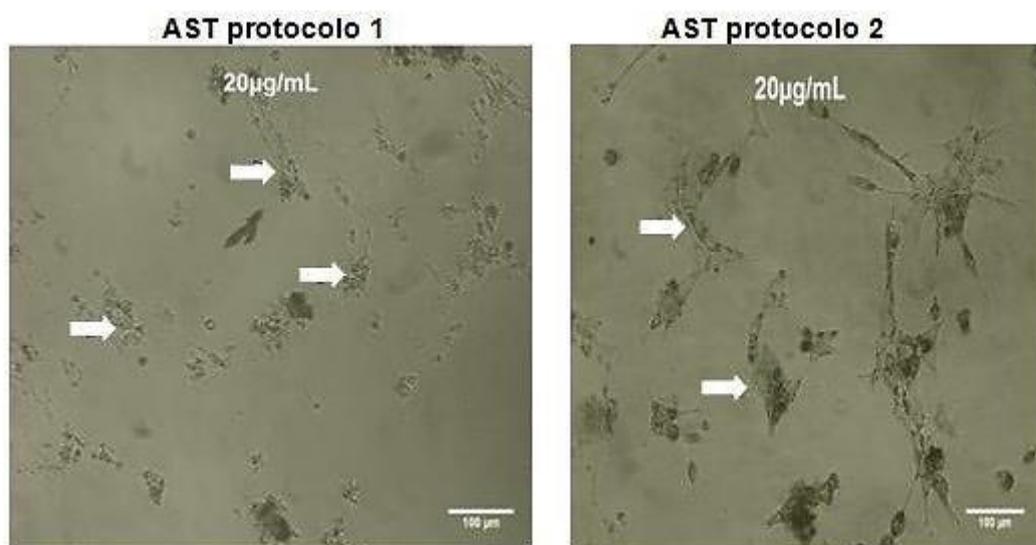


Figura 15. Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia celular dos astrócitos obtidos através dos diferentes protocolos estabelecidos no LabNq tratados com a concentração de 20 µg/mL do veneno total após um período de 72 horas. As setas brancas na imagem apontam citoplasma pontilhado e *debris* celulares. Barra = 100 µm.

Após o tratamento de células de glioblastoma humano (U251) com a concentração de 1 µg/mL do veneno total, observa-se uma monocamada celular homogênea e confluyente comparável com células não tratadas (apenas com meio DMEM) (Fig. 16). Após o tratamento com a concentração de 2 µg/mL é possível observar uma diminuição da celularidade proporcional ao aumento das concentrações e modificações na morfologia celular para arredondada (Fig. 17), restando apenas *debris* celulares após o tratamento com a concentração de 10 µg/mL (Fig. 18).

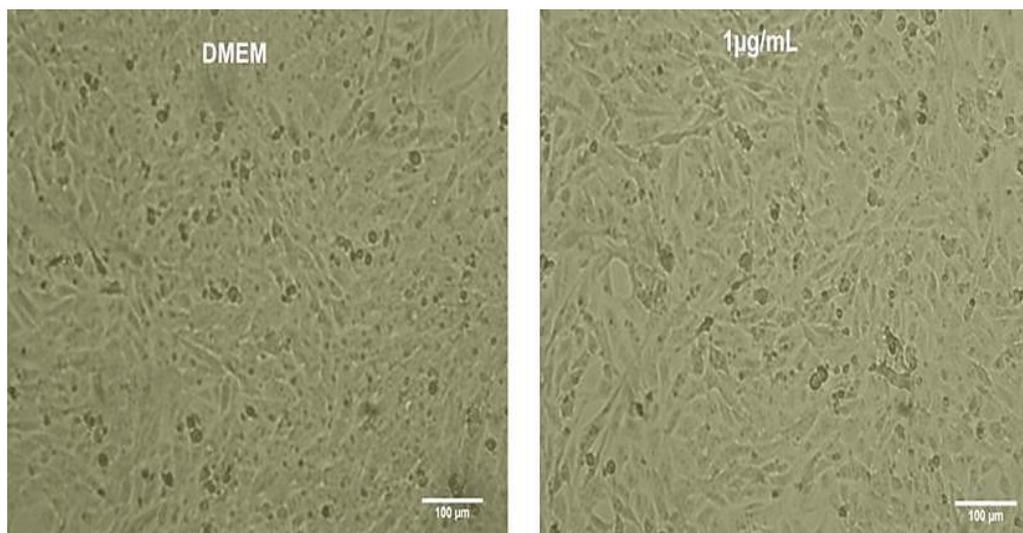


Figura 16. Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de células U251 não tratadas (DMEM) ou tratadas com a concentração de 1 µg/mL do veneno total, após um período de 72 horas. É possível observar uma monocamada celular homogênea e confluenta na concentração de 1 µg/mL, não havendo diminuição da celularidade comparável com o controle (DMEM). Barra = 100 µm.

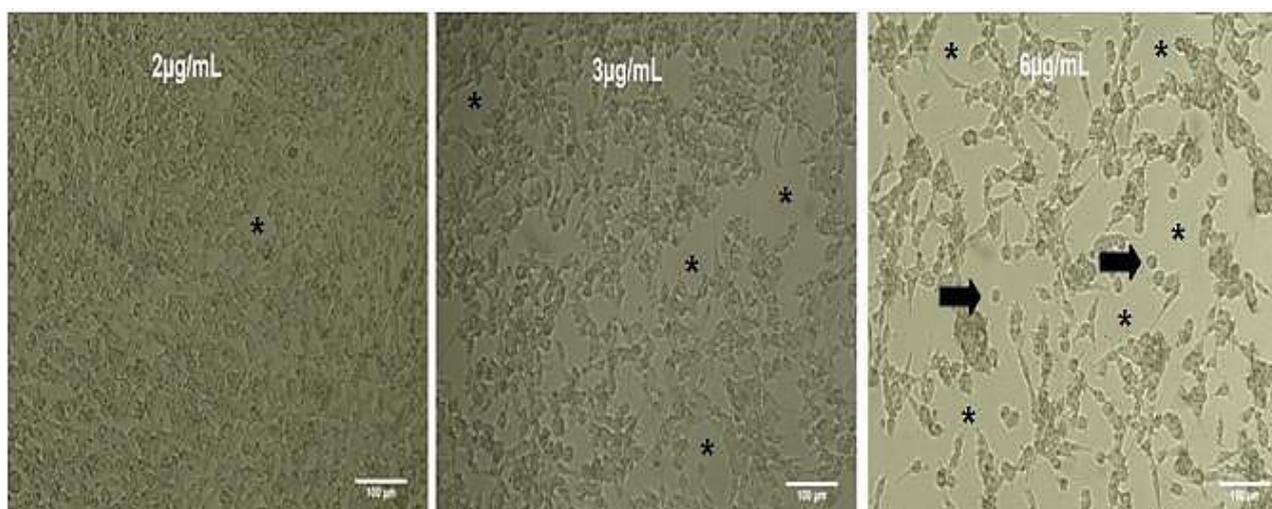


Figura 17. Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de células U251 tratadas com as concentrações de 2 a 6 µg/mL do veneno total após um período de 72 horas. É possível observar que a partir da concentração de 2 µg/mL há uma diminuição da celularidade, sendo esta proporcional ao aumento das concentrações e mudança na morfologia celular para arredondadas. Os asteriscos representam os espaços vazios e as setas pretas apontam células arredondadas. Barra = 100 µm.

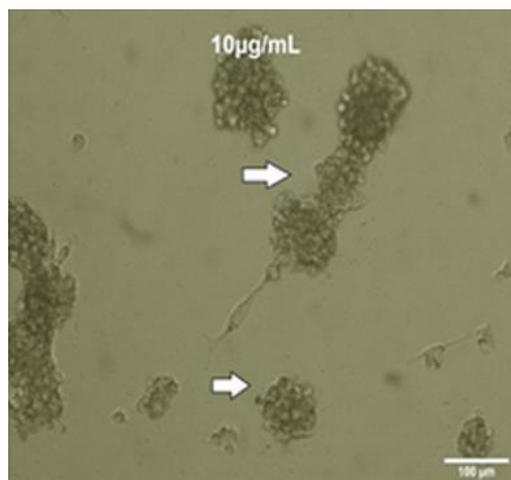


Figura 18. Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de células U251 tratadas com a concentração de 10 µg/mL do veneno total após um período de 72 horas. É possível observar que após tratamento com esta concentração restam apenas *debris* celulares, apontados pelas setas brancas. Barra = 100 µm.

A comparação realizada após o tratamento dos diferentes tipos celulares através da microscopia de fase demonstrou que há uma diminuição da celularidade após tratamento de células tumorais (C6 e U251) com as concentrações de 2 e 3 µg/mL do veneno total sendo possível observar também mudança para uma morfologia arredondada. Entretanto, após o tratamento das células astrocíticas obtidas através do protocolo 1 (consideradas mais susceptíveis ao tratamento com o veneno total em comparação com astrócitos obtidos através do protocolo 2) com as mesmas concentrações supracitadas observa-se uma monocamada homogênea e confluenta de células poligonais planas e achatadas, não havendo diminuição da celularidade nem alteração da morfologia celular (Fig. 19).

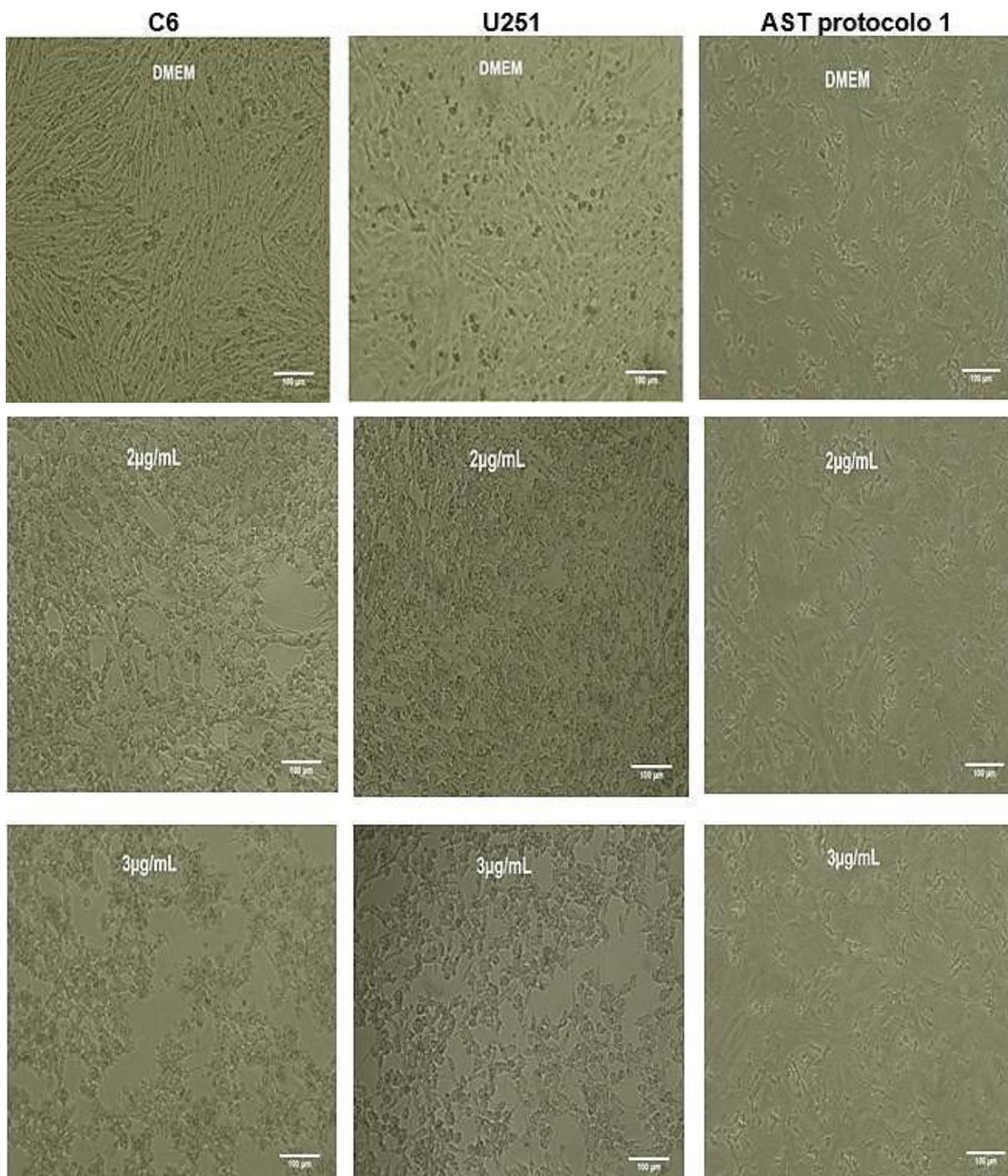


Figura 19. Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia das diferentes linhagens celulares tumorais não tratadas (DMEM) e tratadas com as concentrações 2 e 3 $\mu\text{g/mL}$ do veneno total em comparação com as células utilizadas como controle (astrócitos) não tratadas (DMEM) ou tratadas com as concentrações supracitadas, após um período de 72 horas. É possível observar que após tratamento com as concentrações de 2 e 3 $\mu\text{g/mL}$ do veneno total que não há diminuição da celularidade dos astrócitos, em contrapartida, há uma diminuição da celularidade de células tumorais tratadas com as mesmas concentrações, em comparação às células não tratadas (DMEM), além de mudanças morfológicas para células arredondadas. Barra = 100 μm .

4.1.4 Identificação do Tipo de Morte Celular por Citometria de Fluxo

Após evidenciar a ação citotóxica relevante e dependente de concentração do veneno total nas linhagens tumorais, foi investigado o tipo de morte celular provocada pelo mesmo utilizando a concentração de 3 µg/mL, concentração próxima às obtidas através dos cálculos da EC₅₀ para as linhagens tumorais. O teste utilizado nessa etapa do estudo foi o de dupla marcação com anexina V e iodeto de propídio e a quantificação por citometria de fluxo através de dois experimentos independentes em triplicata (n=6) e mostrou que morte celular das linhagens tumorais ocorre por necrose, mas que a concentração utilizada não afeta os astrócitos, uma vez que a maioria permanece viável após tratamento (Fig. 20). A mediana dos percentuais e variações dos valores obtidos experimentalmente são demonstradas na Tabela 1.

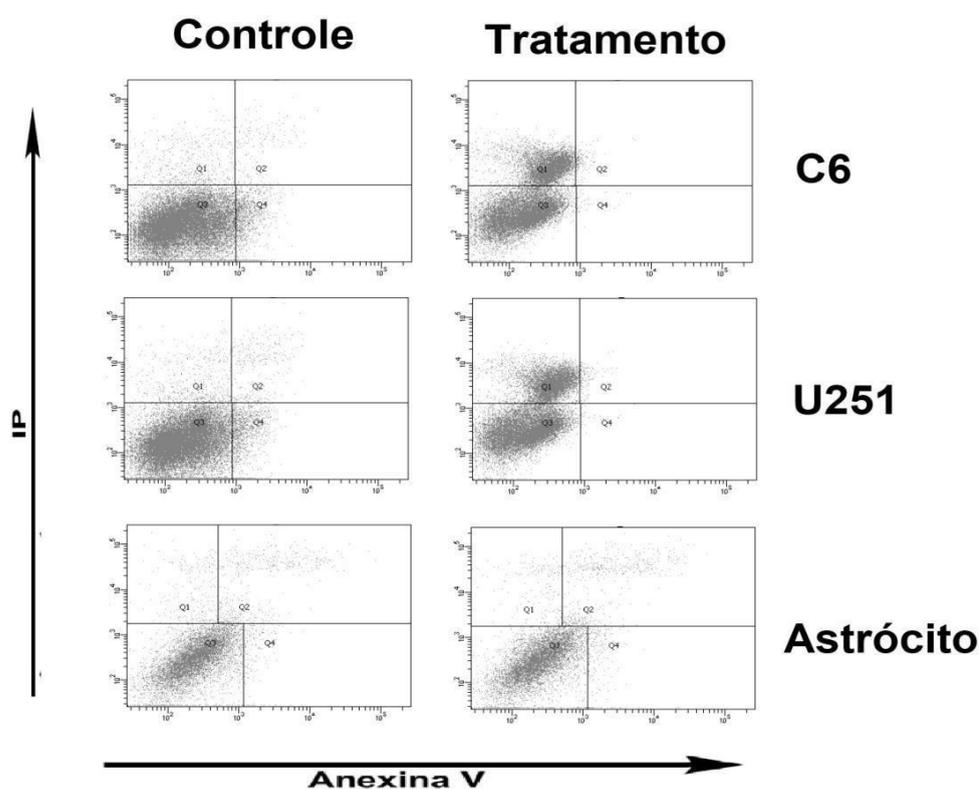


Figura 20. Avaliação do tipo de morte celular promovida pelo tratamento (72 horas) com veneno total a 3 µg/mL em comparação com o tratamento apenas com o veículo da droga (PBS). A morte da maioria das células tumorais ocorre por necrose (quadrante superior esquerdo), mas um percentual de células morreu por apoptose tardia (quadrante superior direito). Os astrócitos mantiveram-se viáveis após o tratamento com a concentração utilizada (quadrante inferior esquerdo).

Tabela 1. Mediana dos percentuais e variações de células C6, U251 e astrócitos marcadas com anexina V e IP após 72 horas de tratamento com veneno total a 3 µg/mL

	C6 (controle)	C6 (tratamento)	U251 (controle)	U251 (tratamento)	Astrócitos (controle)	Astrócitos (tratamento)
Viáveis	89,85 (89,30-91,50)	65,30 (64,30-65,80)	89,70 (87,50-92,00)	74,75 (67,50-78,60)	80,85 (78,70-87,50)	81,60 (74,60-87,20)
Apoptose inicial	5,90 (4,40-6,00)	0,30 (0,10-0,40)	5,70 (3,30-7,10)	0,50 (0,50-0,60)	8,15 (1,60-9,80)	7,15 (2,50-10,30)
Apoptose tardia	0,65 (0,50-0,90)	0,65 (0,50-0,80)	0,95 (0,80-1,50)	2,40 (2,20-2,70)	5,00 (4,70-9,80)	5,55 (4,00-12,10)
Necrose	3,70 (3,20-4,20)	33,70 (33,50-34,70)	3,70 (3,30-4,00)	22,50 (18,60-29,40)	4,90 (1,70-6,40)	4,35 (3,00-5,60)

4.2 FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS

4.2.1 Cromatografia por Exclusão Molecular

O veneno total de *Bothrops leucurus* foi fracionado através da cromatografia por exclusão molecular, em coluna de Superdex 75 10/300 GL e foram obtidos 10 picos ao final da corrida cromatográfica (Fig 21).

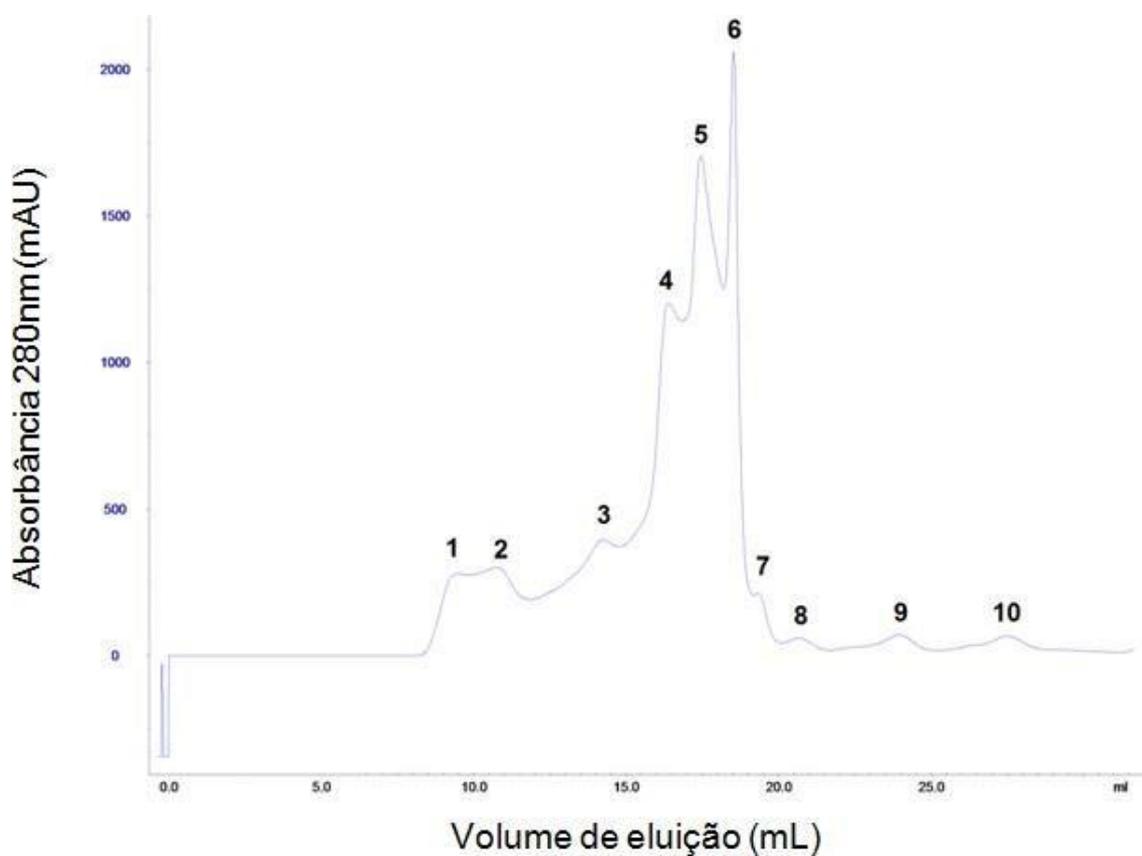


Figura 21. Cromatografia em Superdex 75 (Sistema HPLC) do veneno total de *Bothrops leucurus* em tampão de formiato de amônio 100mM, pH 3,0. Fluxo de trabalho de 0,6 mL/min.

4.2.2 Dosagem Proteica

A concentração proteica das frações foi analisada através do espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) (Tabela 2) e as frações com teor proteico mais elevado (frações 1 a 6) foram utilizadas para os ensaios de citotoxicidade posteriores.

Tabela 2. Dosagem de proteínas das frações obtidas por cromatografia por exclusão molecular

Frações	Concentração de proteínas (mg/mL)
1	0,870
2	0,560
3	0,730
4	2,290
5	2,716
6	1,386
7	0,186
8	0,071
9	0,075
10	0,067

4.2.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

O perfil eletroforético e a estimativa do tamanho molecular relativo das proteínas através da comparação com o marcador de peso molecular, bem como a pureza das frações resultantes da corrida cromatográfica foram analisados através da confecção de um gel de poliacrilamida a 12% em condições não redutoras. A primeira etapa de fracionamento evidenciou que ainda não haviam biomoléculas isoladas nas frações, havendo mais de uma banda visível, e que seriam necessárias novas etapas cromatográficas para obtenção de proteínas purificadas. Ademais, a partir da fração 8 não foi possível evidenciar a presença de bandas, logo, a mesma foi excluída de análises posteriores, bem como as frações com concentração proteica semelhante ou inferior a mesma (frações 9 e 10) (Fig. 22).

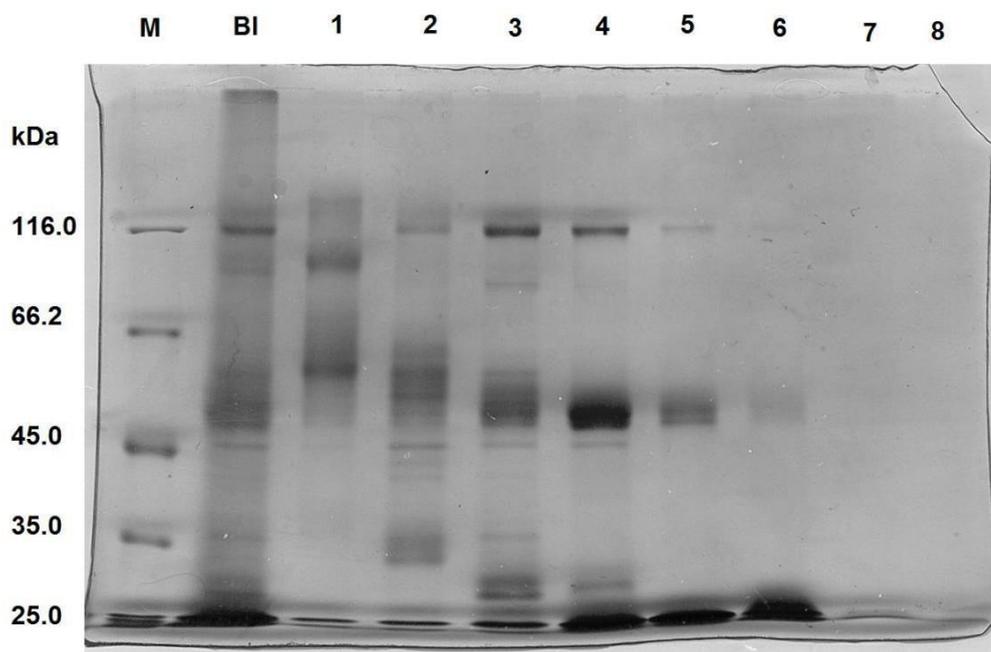


Figura 22. SDS-PAGE (12%) em condições não redutoras das frações obtidas através da cromatografia por exclusão molecular. BI corresponde ao veneno total de *Bothrops leucurus*. M corresponde ao marcador de peso molecular.

4.2.4 Avaliação da Atividade Proteolítica

As proteases presentes nas frações cromatográficas foram evidenciadas através da técnica de zimografia empregando como substratos a gelatina e a caseína na confecção do gel. Foi perceptível uma atividade gelatinolítica proeminente da proteína presente na fração 1, entretanto não foi possível visualizar as bandas provenientes do marcador de peso molecular incluído no gel para inferir o tamanho relativo da protease em questão. As frações 2 e 3 também apresentaram atividade gelatinolítica, embora mais fracas quando comparadas com a fração 1 (Fig. 23).

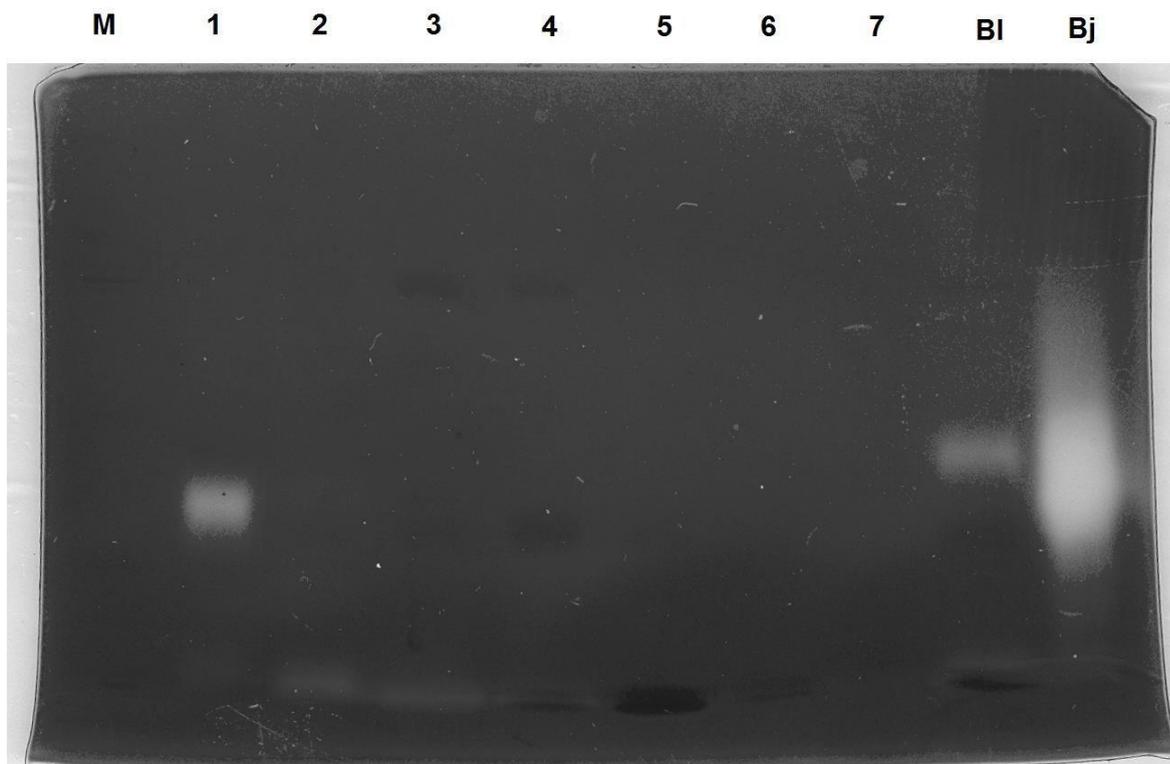


Figura 23. Gel de zimografia utilizando como substrato a gelatina (12%) em condições não redutoras das frações obtidas através da cromatografia por exclusão molecular. BI corresponde ao veneno total de *Bothrops leucurus* e Bj corresponde ao veneno total de *Bothrops jararaca* (controle). M corresponde ao marcador de peso molecular.

A atividade caseinolítica foi observada nas frações 1, 3 e 4, com maior relevância nas duas últimas frações aludidas. Através da comparação com o marcador de peso molecular é possível inferir que a protease presente na fração 1 possui massa molecular entre 45 kDa e 66,2 kDa, e as proteases presentes nas frações 3 e 4 estão em uma região próxima a 25 kDa (Fig. 24).

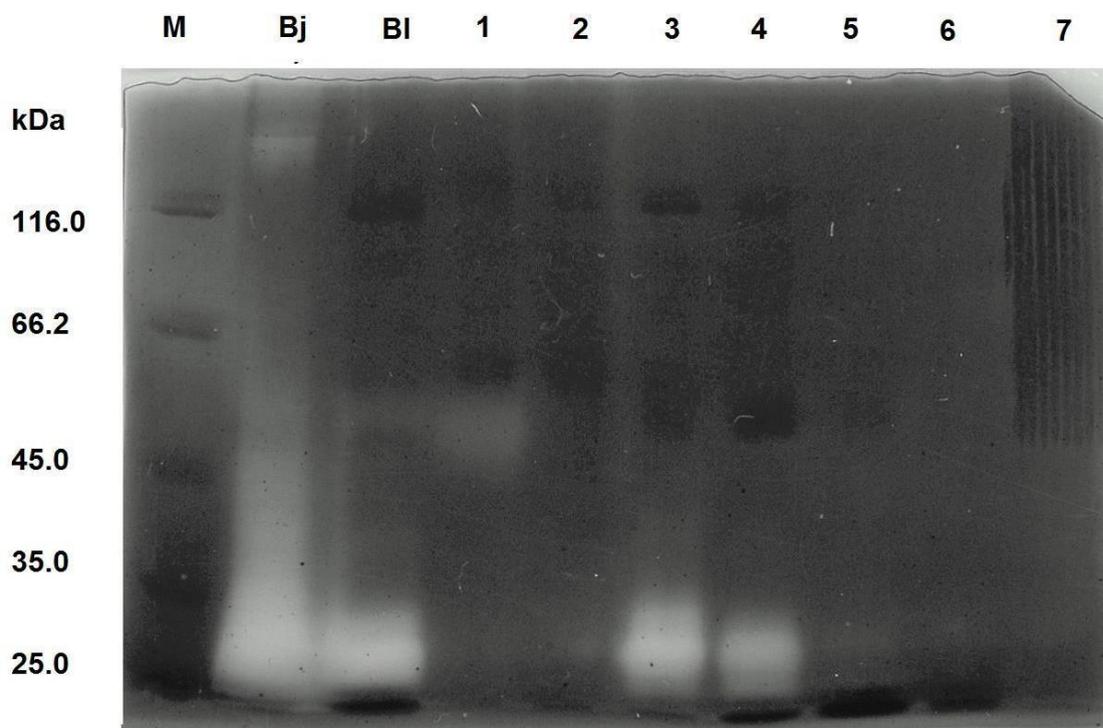


Figura 24. Gel De Zimografia Utilizando Como Substrato A Caseína (12%) Em Condições Não Redutoras Das Frações Obtidas Através Da Cromatografia Por Exclusão Molecular. BI Corresponde Ao Veneno Total De *Bothrops Leucurus* E Bj Corresponde Ao Veneno Total De *Bothrops Jararaca* (Controle). M Corresponde Ao Marcador De Peso Molecular.

4.2.5 WESTERN BLOTTING

Diante dos dados obtidos com a zimografia, foi realizada a técnica de *Western Blotting* utilizando a fração 1, que apresentou atividade gelatinolítica e caseinolítica, evidenciando a presença de uma protease. A eletroforese referente à técnica de *Western Blotting* foi realizada em condições redutoras. Como anticorpo primário foi utilizado o anticorpo de coelho anti-jararagina (metaloprotease da classe PIII do veneno da espécie *Bothrops jararaca*). O resultado obtido evidenciou a presença de uma banda de aproximadamente 55 kDa em comparação com o marcador de peso molecular utilizado (Fig. 25). Foi realizada uma revisão bibliográfica que permitiu inferir através dos dados obtidos por zimografia e *western blotting*, que a proteína presente na fração 1 tratava-se da leucurolisina-b, uma metaloprotease da classe PIII previamente isolada por SANCHEZ e colaboradores (2007).

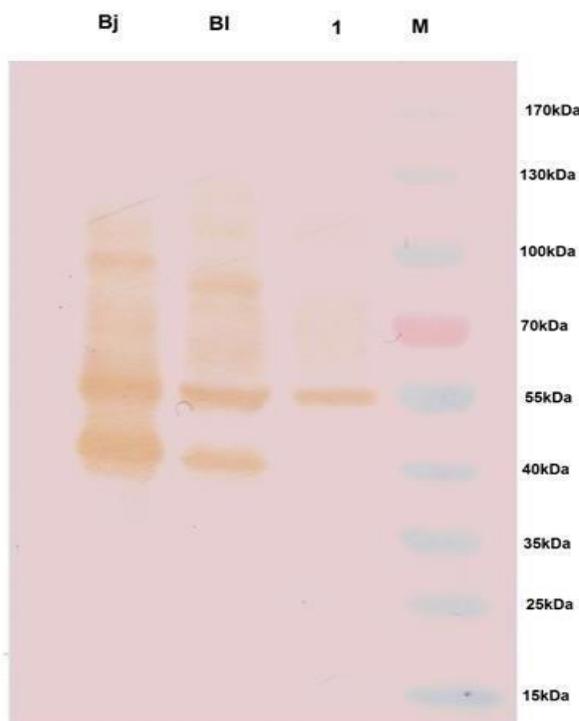


Figura 25. Western blotting em gel de gradiente de poliacrilamida (4-20%) em condições redutoras com a fração 1 resultante da cromatografia por exclusão molecular. BI corresponde ao veneno total de *B. leucurus* e Bj corresponde ao veneno total de *Bothrops jararaca* (controle). M corresponde ao marcador de peso molecular.

4.2.6 Ensaios de Citotoxicidade

Após os ensaios de citotoxicidade com o veneno total, as frações obtidas através da cromatografia por exclusão molecular com concentrações proteicas mais relevantes foram testadas (frações 1 a 6) em células da linhagem C6 e astrócitos com o intuito de averiguar atividade antitumoral relevante. As células foram submetidas ao tratamento com as frações em concentrações crescentes por um período de 72 horas em experimentos em triplicata. A viabilidade celular foi mensurada através do método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolium (MTT). Os resultados posteriores serão demonstrados por ordem de relevância da citotoxicidade da fração testada.

O tratamento com a fração 1 foi realizado com diferentes concentrações (0,12 a 20 $\mu\text{g/mL}$) e apontou um valor de EC_{50} de 2,54 $\mu\text{g/mL}$ (mediana dos valores de

todos os experimentos, n=3) com variação de 2,02 a 2,58 µg/mL para células da linhagem C6. Os dados obtidos no experimento correspondendo ao valor mediano da EC₅₀ são mostrados na Fig. 26 e a equação da regressão não linear que melhor se ajustou aos pontos experimentais e que foi usada para calcular este valor é apresentada na equação (5). Foi evidenciado efeito citotóxico dependente da concentração para células de glioma murino, sem alteração da viabilidade celular das células controle (astrócitos) (Fig. 27).

$$(5) V = \{104,92/[1+10^{(0,74+1,847x)}]\} - 2,32 \quad (R^2 = 0,97)$$

Em que V corresponde à viabilidade celular e x corresponde ao logaritmo da concentração.

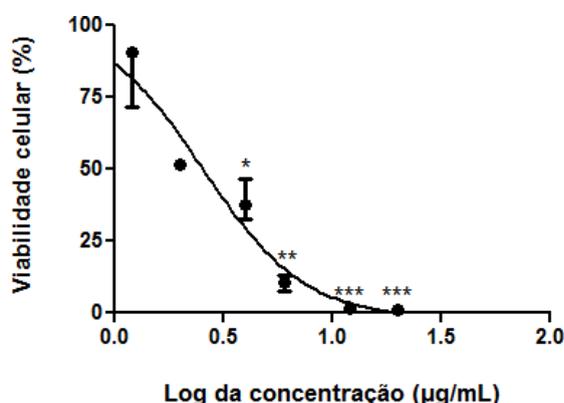


Figura 26. Citotoxicidade da fração 1 obtida por cromatografia por exclusão molecular do veneno de *Bothrops leucurus* para células C6 de glioma de rato. O experimento aqui representado corresponde ao valor da mediana da EC₅₀. A citotoxicidade é dependente de concentração do veneno total, mensurada através de medida espectrofotométrica do formazan. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 2,04 com variação entre 1,97 a 2,17). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 100,00% com variação de 96,44 a 106,20 (* p < 0,05, ** p < 0,01; *** p < 0,001). Regressão não linear usada para calcular o valor da EC₅₀ (2,54 µg/mL).

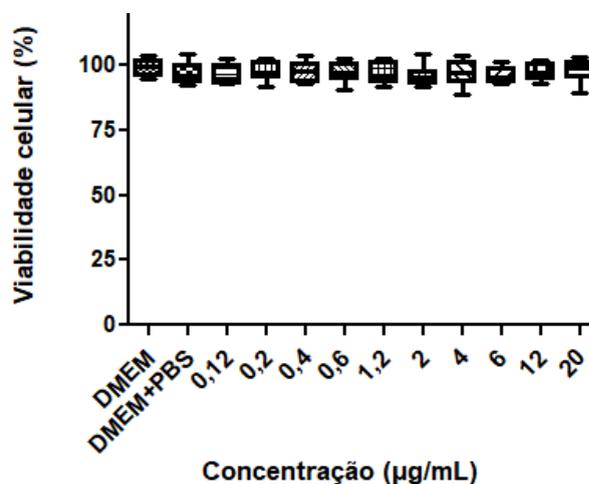


Figura 27. Viabilidade celular de astrócitos murinos após tratamento com a fração 1. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 1,02, com variação de: 0,97 a 1,06). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 96,25% com variação de 92,77 a 104,60, não houve diferença entre os grupos.

O tratamento com a fração 4 com diferentes concentrações (0,6 a 20 µg/mL) evidenciou efeito citotóxico dependente da concentração para células C6 de glioma murino, entretanto não foi possível calcular os valores para a EC_{50} posteriormente ao tratamento com essa fração (Fig. 28). Não houve alteração da viabilidade celular das células controle (astrócitos) (Fig. 29).

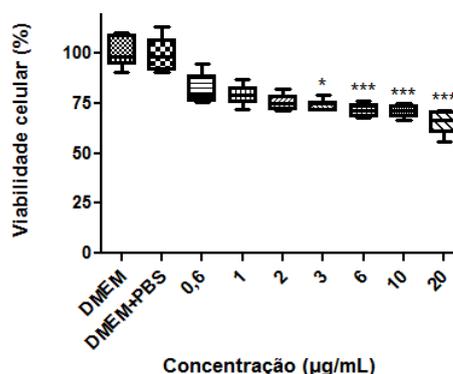


Figura 28. Citotoxicidade da fração 4 obtida por cromatografia por exclusão molecular do veneno de *Bothrops leucurus* para células C6 de glioma de rato. A citotoxicidade é dependente de concentração do veneno total, mensurada através de medida espectrofotométrica do formazan. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 2,54 com variação entre 2,34 a 2,84). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 98,74% com variação de 90,98 a 110,30 (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). A Concentração mínima citotóxica foi 3 µg/mL.

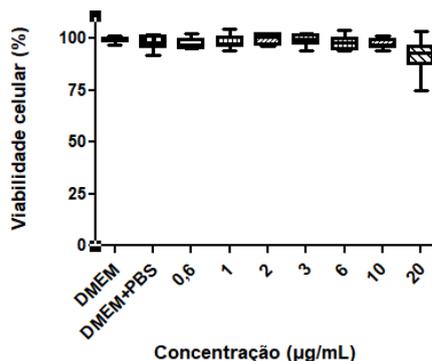


Figura 29. Viabilidade celular de astrócitos murinos após tratamento com a fração 4. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 1,16, com variação de: 1,12 a 1,17). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 100,00% com variação de 96,98 a 101,30, não houve diferença entre os grupos.

O tratamento com diferentes concentrações utilizando a fração 3 demonstrou uma diminuição da viabilidade de células tumorais. Em contrapartida, também demonstrou uma diminuição da viabilidade dos astrócitos em concentrações muito próximas, desta, excluída das análises seguintes (Fig. 30).

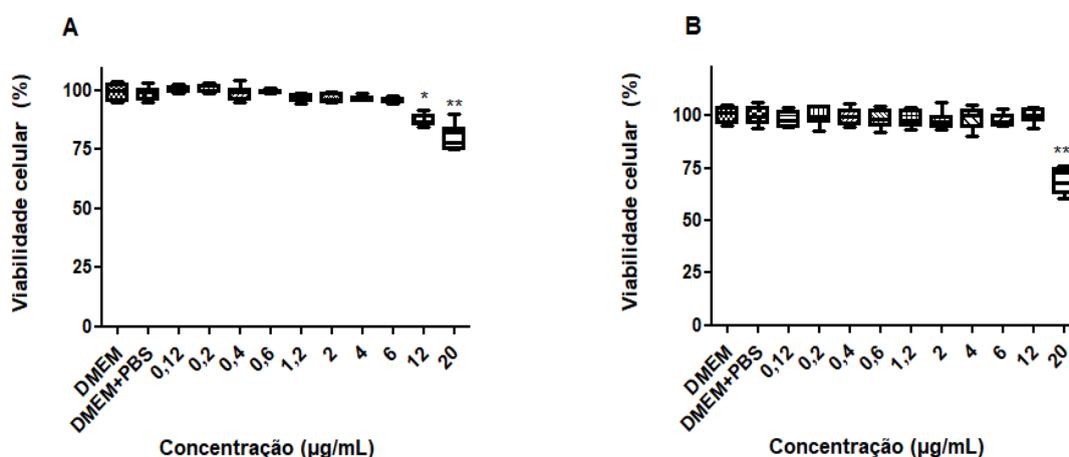


Figura 30. Viabilidade celular após tratamento com a fração 3. A citotoxicidade é dependente de concentração do veneno total, mensurada através de medida espectrofotométrica do formazan. A- Células C6 de glioma murino. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 2,06 com variação entre 1,96 a 2,14). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 99,98% com variação de 95,08 a 104,00 (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$). A Concentração mínima citotóxica foi 12 µg/mL. B- Astrócitos murinos. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 0,99 com variação entre 0,93 a 1,03). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal- Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 99,58% com variação de 94,08 a 106,40 (** $p < 0,01$). A Concentração mínima citotóxica foi 20 µg/mL.

Os tratamentos com diferentes concentrações utilizando a fração 2 (Fig. 31), 5 (Fig. 32) e 6 (Fig. 33) não apresentaram potencial antitumoral sendo descartadas das análises posteriores.

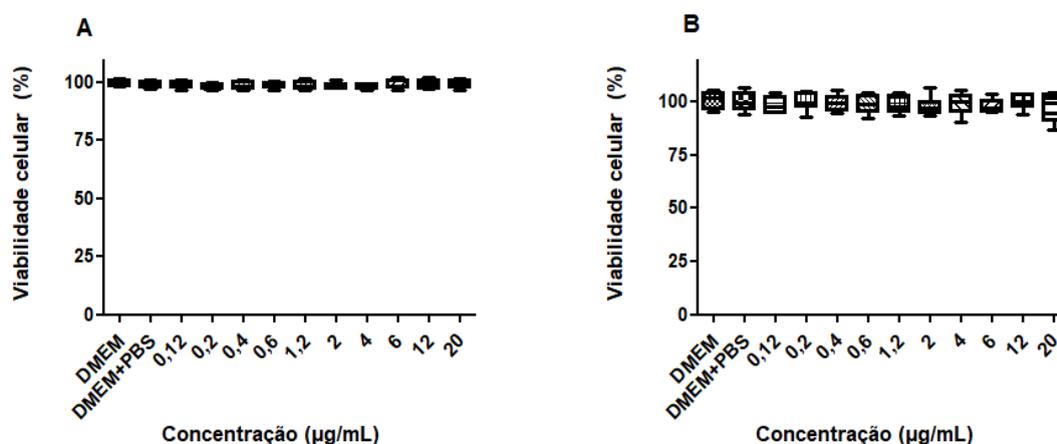


Figura 31. Viabilidade celular após tratamento com a fração 2. A- Células C6 de glioma murino. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 2,00, com variação de: 1,96 a 2,03). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 99,11% com variação de 97,35 a 101,00, não houve diferença entre os grupos. B- Astrócitos murinos. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 0,99, com variação de: 0,93 a 1,03). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 99,58% com variação de 94,08 a 106,40, não houve diferença entre os grupos.

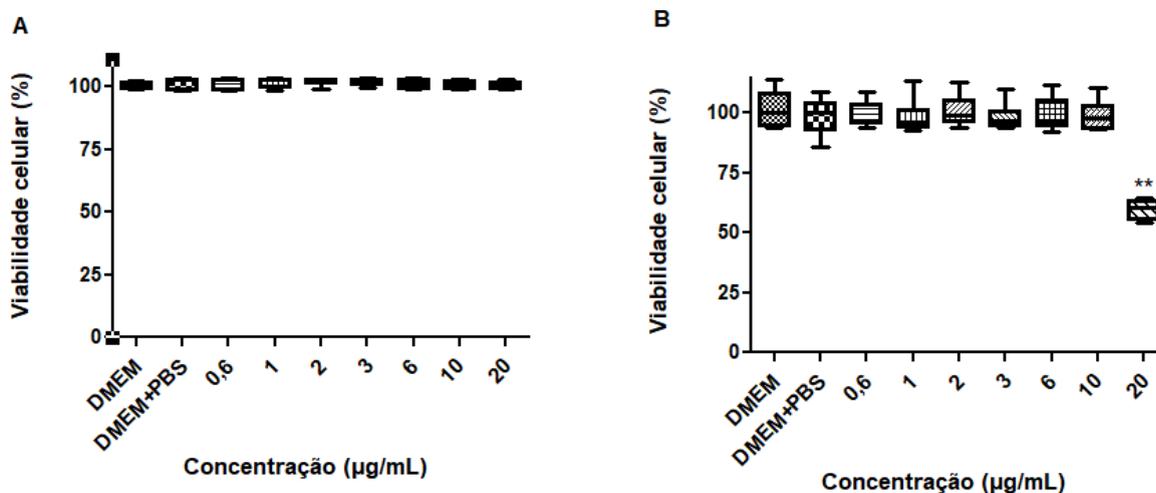


Figura 32. Viabilidade celular após tratamento com a fração 5. A- Células C6 de glioma murino. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 1,99, com variação de: 1,97 a 2,05). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 99,13% com variação de 98,54 a 103,30, não houve diferença entre os grupos. B- Astrócitos murinos. A citotoxicidade é dependente de concentração do veneno total, mensurada através de medida espectrofotométrica do formazan. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 1,07 com variação entre 1,00 a 1,22). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 100,10% com variação de 85,53 a 108,60 (** $p < 0,01$). A Concentração mínima citotóxica foi 20 µg/mL.

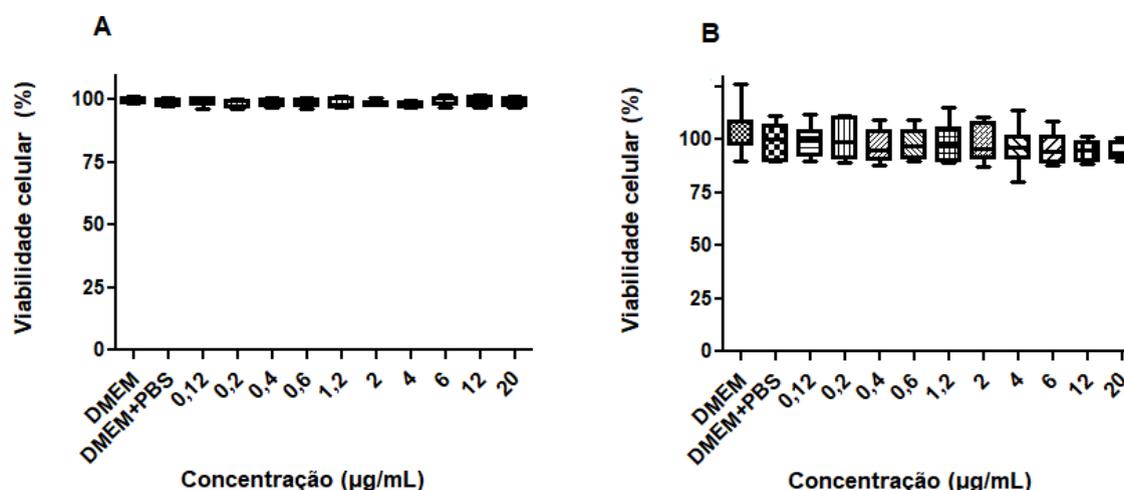


Figura 33. Viabilidade celular após tratamento com a fração 6. A- Células C6 de glioma murino. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 2,03, com variação de: 1,99 a 2,06). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 99,12% com variação de 97,39 a 101,00, não houve diferença entre os grupos. B- Astrócitos murinos. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 1,05, com variação de: 0,96 a 1,35). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 99,97% com variação de 89,58 a 110,90, não houve diferença entre os grupos.

4.2.7 Avaliação da Morfologia Celular e Celularidade após Tratamento com a Fração 1

Após evidenciada a citotoxicidade expressiva e seletiva da fração cromatográfica 1, a morfologia celular da linhagem tumoral C6 antes e após período de tratamento foi acompanhada com o auxílio de um microscópio de fase e comparada com os astrócitos. O tratamento com a concentração de 0,6 µg/mL da fração 1 não resultou na diminuição da celularidade, sendo possível observar uma

monocamada celular homogênea e confluenta em comparação com as células não tratadas (apenas com meio DMEM) para ambas as células utilizadas no experimento (Fig. 34). A partir do tratamento com a concentração de 1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em diante, há uma diminuição da celularidade e modificações na morfologia celular apenas para células tumorais (C6), sem afetar, no entanto, os astrócitos, que continuaram a exibir uma monocamada celular homogênea e confluenta de células poligonais planas e achatadas (Fig. 35). No tratamento com a concentração de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ observa-se apenas *debris* celulares para a linhagem tumoral (Fig 36).

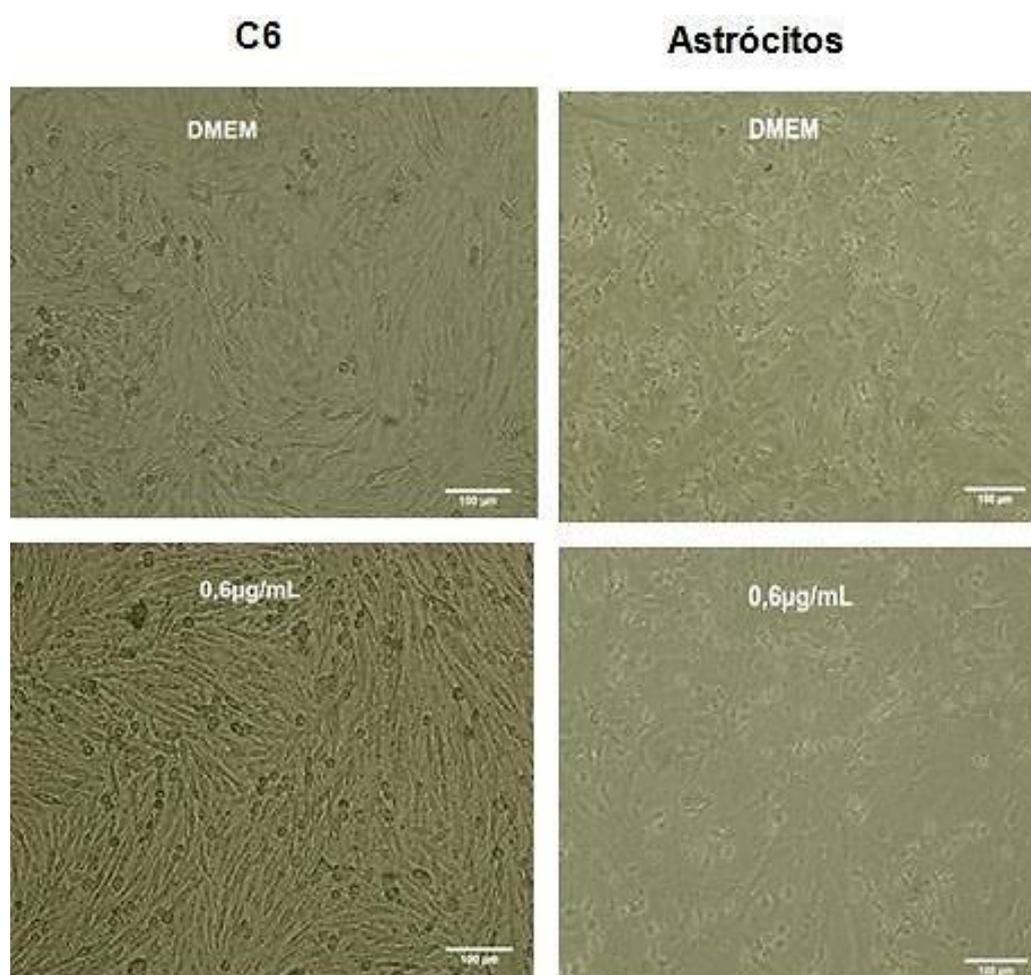


Figura 34. Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de células C6 e astrócitos não tratados (DMEM) ou tratados com a concentração de 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da fração cromatográfica 1, após um período de 72 horas. É possível observar uma monocamada homogênea e confluenta de células após o tratamento com a concentração de 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nos dois tipos celulares utilizados no experimento, comparável com as células não tratadas (DMEM). Barra = 100 μm

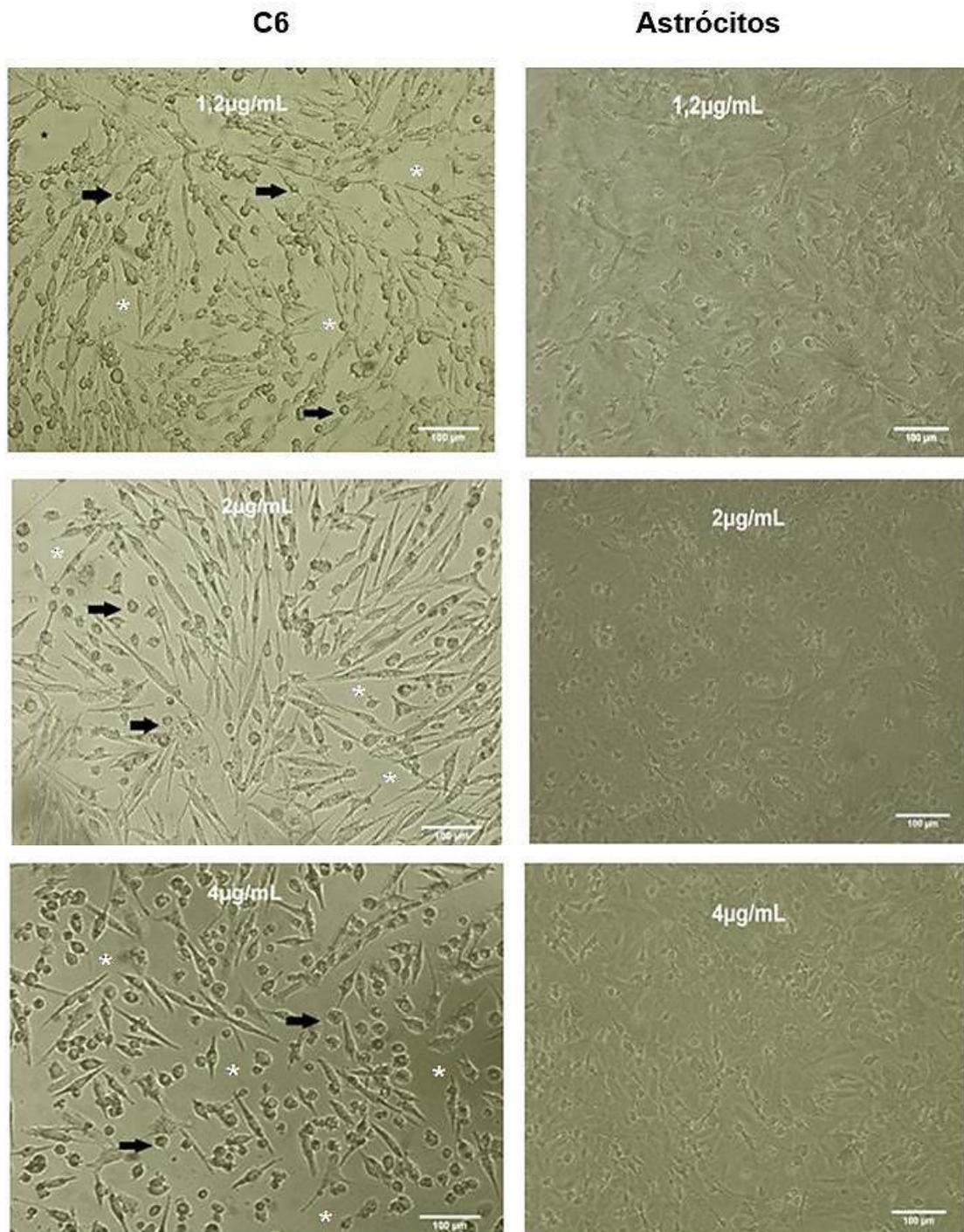


Figura 35. Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de células C6 e astrócitos tratados com as concentrações de 1,2 a 4 µg/mL da fração cromatográfica 1, após um período de 72 horas. É possível observar que a partir da concentração de 1,2 µg/mL há uma diminuição da celularidade apenas para células C6, sendo proporcional ao aumento das concentrações, e mudança na morfologia celular de fusiformes para arredondadas. A celularidade e morfologia de células astrocíticas não foram afetadas após tratamento com as concentrações supracitadas. Os asteriscos representam os espaços vazios e as setas pretas apontam células arredondadas. Barra = 100 µm

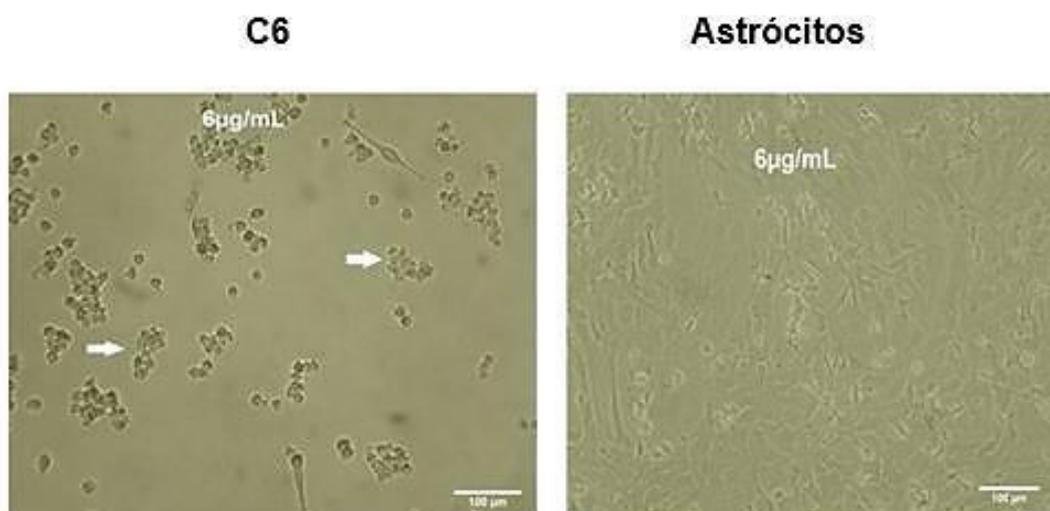


Figura 36. Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de células C6 e astrócitos tratados com a concentração de 6 µg/mL da fração cromatográfica 1, após um período de 72 horas. É possível observar que após tratamento com esta concentração restam apenas *debris* celulares para células C6, apontados pelas setas brancas, entretanto, não há diminuição da celularidade de astrócitos tratados com a mesma concentração. Barra = 100 µm.

4.2.8 Espectrometria de Massa

A partir dos resultados obtidos utilizando como parâmetro para análise de citotoxicidade a viabilidade mitocondrial após exposição celular ao tratamento com diferentes frações cromatográficas, a fração 4 obtida por cromatografia por exclusão molecular do veneno total foi submetida à análise por espectrometria de massa. As bandas provenientes desta fração foram extraídas do gel através do protocolo citado neste manuscrito e submetidas à digestão tríplica, o que gerou um grupo de peptídeos. Posteriormente, os peptídeos foram submetidos à análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC/MS/MS) e avaliados pelo software PEAKS para o sequenciamento e comparação do espectro com peptídeos pertencentes a uma determinada proteína, com o mesmo tipo de clivagem usada experimentalmente (Fig. 37). A partir da identificação dos peptídeos, é possível então determinar qual é a proteína, baseado em cálculos estatísticos para atribuição de *scores* e aumentar a confiança na identificação comparando com sequências disponíveis no banco de dados (Fig. 38). Foi possível identificar na fração 4 uma fosfolipase A_2 básica do veneno de *Bothrops leucurus* (Fig. 39).

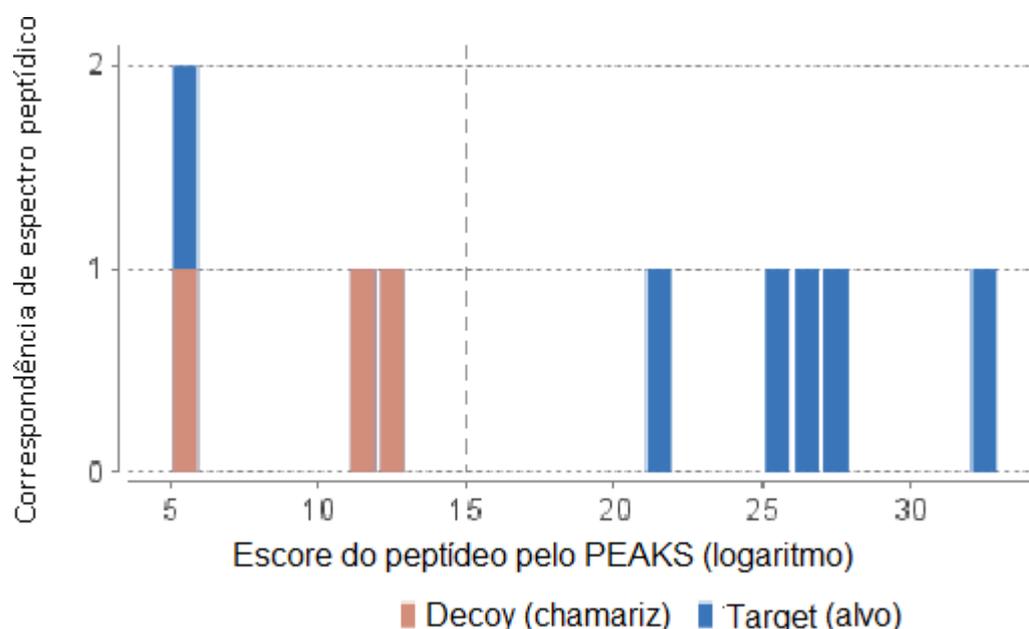


Figura 37. Histograma produzido pelo software PEAKS demonstrando as correspondências de espectro peptídico da amostra com peptídeos da sequência da fosfolipase A₂ básica presente no banco de dados.

Protein Group	Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	PTM	Avg. Mass	Description
1	3064	sp P86453 PA2HB_RHIAN	40.13	12	2	2	N	13897	Basic phospholipase A2 homolog BaTX OS=Rhinocerosphis alternatus PE=1 SV=1
1	3067	sp P58399 PA2H1_BOTPI	40.13	12	2	2	N	13729	Basic phospholipase A2 homolog piratoxin-1 OS=Bothrops pirajai PE=1 SV=2
1	3065	sp P86975 PA2HB_BOTLC	40.13	12	2	2	N	13717	Basic phospholipase A2 homolog OS=Bothrops leucurus PE=1 SV=1
1	3066	sp P82287 PA2H2_BOTPI	40.13	12	2	2	N	13744	Basic phospholipase A2 homolog piratoxin-2 OS=Bothrops pirajai PE=1 SV=1
1	3068	sp Q91834 PA2H2_BOTMO	40.13	12	2	2	N	13887	Basic phospholipase A2 homolog 2 OS=Bothrops moojeni PE=1 SV=2
1	3069	sp P24605 PA2H2_BOTAS	40.13	11	2	2	N	15509	Basic phospholipase A2 homolog 2 OS=Bothrops asper PE=1 SV=3
1	3070	tr L7VGC1 L7VGC1_BOTAN	40.13	11	2	2	N	15566	Myotoxic protein PLA2K49 OS=Bothrops andianus PE=2 SV=1
1	3071	sp Q90249 PA2B1_BOTJR	40.13	11	2	2	N	15497	Basic phospholipase A2 homolog bothropstoxin-1 OS=Bothrops jararacussu PE=1 SV=3
3	4933	tr T1E6S3 T1E6S3_CROHD	33.97	1	1	1	N	73891	DCC-interacting protein 13-beta OS=Crotalus horridus PE=2 SV=1
3	4934	tr U3ETM8 U3ETM8_MICFL	33.97	1	1	1	N	73609	DCC-interacting protein 13-beta OS=Micrurus fulvius PE=2 SV=1
2	1	tr V8PHN7 V8PHN7_OPHHA	26.50	1	1	1	Y	140652	AT-rich interactive domain-containing protein 4A (Fragment) OS=Ophiophagus hannah GN=ARID4A PE=4 SV=1
total 11 proteins									

Figura 38. Resultado obtido pelo PEAKS demonstrando proteínas presentes no banco de dados que possuem os peptídeos da amostra analisada, entre elas a proteína fosfolipase A₂ básica do veneno de *Bothrops leucurus*.

sp|P86975|PA2HB_BOTLC

| Protein Coverage | Supporting Peptides |

Protein Coverage:

1 SLFELGKMIL QETGKNSVKS YGVYGCNCGV GGRGKPKDAT DRCCYVHKCC YKCLTGCDFK KDRYSYSWKD KTIVCGENNP
 81 CLKELCECDK AVAICLRENL GTYNKKYRYH LKPFCKKADP C

Supporting Peptides:

Peptide	Uniq	-10lgP	Mass	ppm	m/z	z	RT	Scan	#Spec	Start	End	PTM
K.MILQETGK.N	Y	27.47	918.4844	171.4	460.3282	2	0.20	485	2	8	15	
SLFELGK.M	Y	25.31	792.4381	-20.3	397.2183	2	0.33	481	1	1	7	
total 2 peptides												

Figura 39. Resultado Obtido Pelo PEAKS Evidenciando Os Peptídeos Identificados Na Sequência Proveniente Da Proteína Fosfolipase A₂ Básica Do Veneno De *Bothrops Leucurus*.

4.3 PROTEÍNAS DO VENENO DE *BOTHROPS LEUCURUS*

4.3.1 Purificação da Leucurolisina-B e da Fosfolipase A₂ Básica

A partir dos resultados de citotoxicidade seletiva apresentados pelas frações 1 e 4 obtidas por cromatografia por exclusão molecular em coluna Superdex 75 10/300 GL do veneno total, foram realizados diferentes processos cromatográficos objetivando a purificação das proteínas presentes.

Inicialmente foi realizada uma primeira etapa cromatográfica (cromatografia por exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300 GL) obtendo-se ao final da cromatografia cinco frações (Fig. 40). Foram feitas quatro corridas idênticas, em cada uma foram aplicados 160 µL de amostra (48 mg/mL). Posteriormente, as frações foram analisadas por SDS-PAGE (Fig. 41).

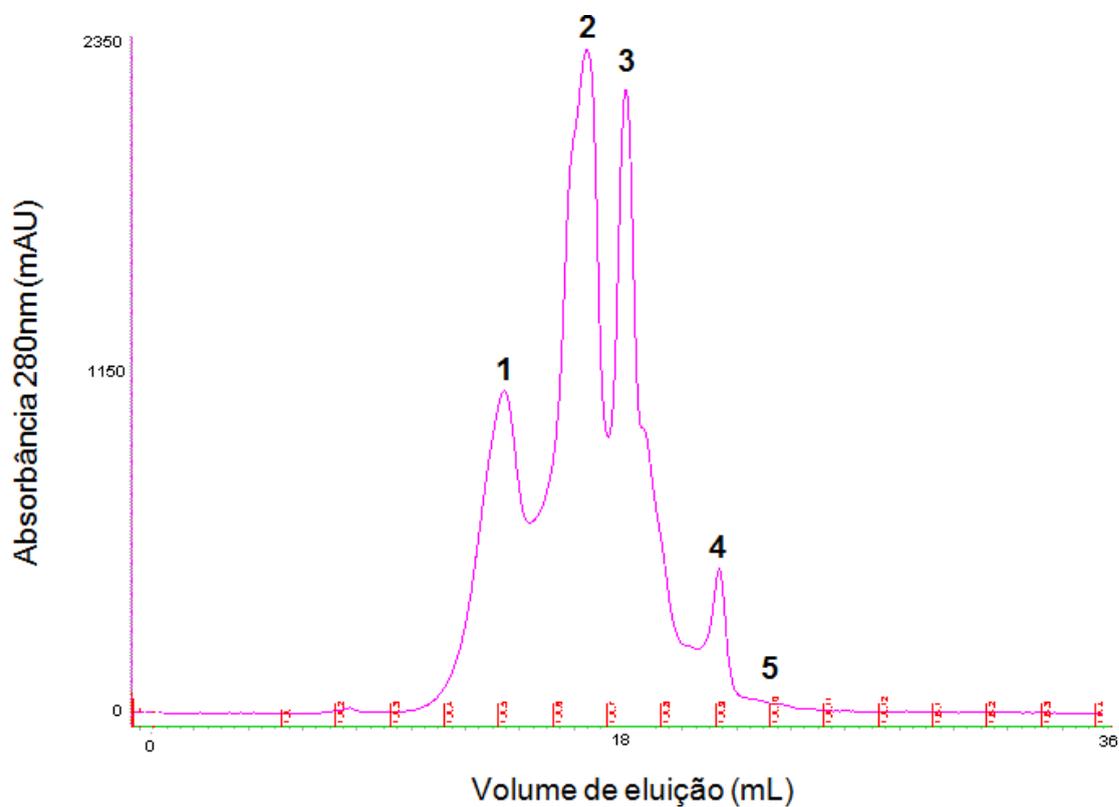


Figura 40. Cromatografia em coluna Superdex 200 10/300 GL do veneno total de *Bothrops leucurus* tampão de acetato de amônio a 50 mM e NaCl a 300 mM, pH 7,3. Fluxo de trabalho de 0,8 mL/min.

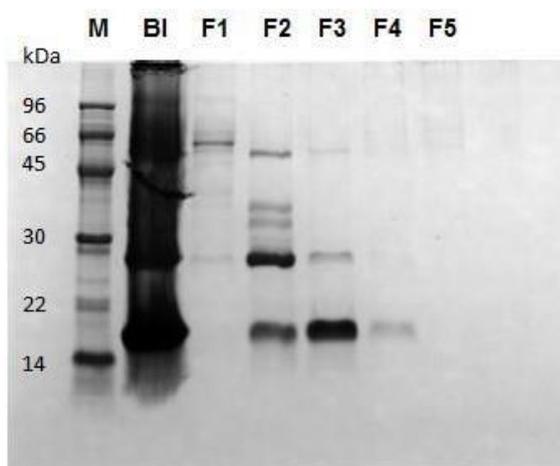


Figura 41. SDS-PAGE (12%) em condições redutoras das frações obtidas através da cromatografia por exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300 GL. BI corresponde ao veneno total de *Bothrops leucurus*. M corresponde ao marcador de peso molecular.

Observou-se que a fração 1 resultante dessa cromatografia possuía massa molecular entre 45 e 66 kDa, condizente com a massa da fração de interesse, inferida anteriormente como sendo a proteína leucurolisina-b, utilizada nos testes de citotoxicidade prévios (também denominada fração 1 nos resultados com as frações previamente apresentados no manuscrito). Desta forma, a mesma foi concentrada em Amicon e submetida a uma segunda etapa cromatográfica por cromatografia por exclusão molecular em coluna Superdex 75 10/300 GL obtendo-se ao final da corrida cromatográfica um total de cinco frações (Fig. 42). As frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE em condições redutoras (Fig. 43).

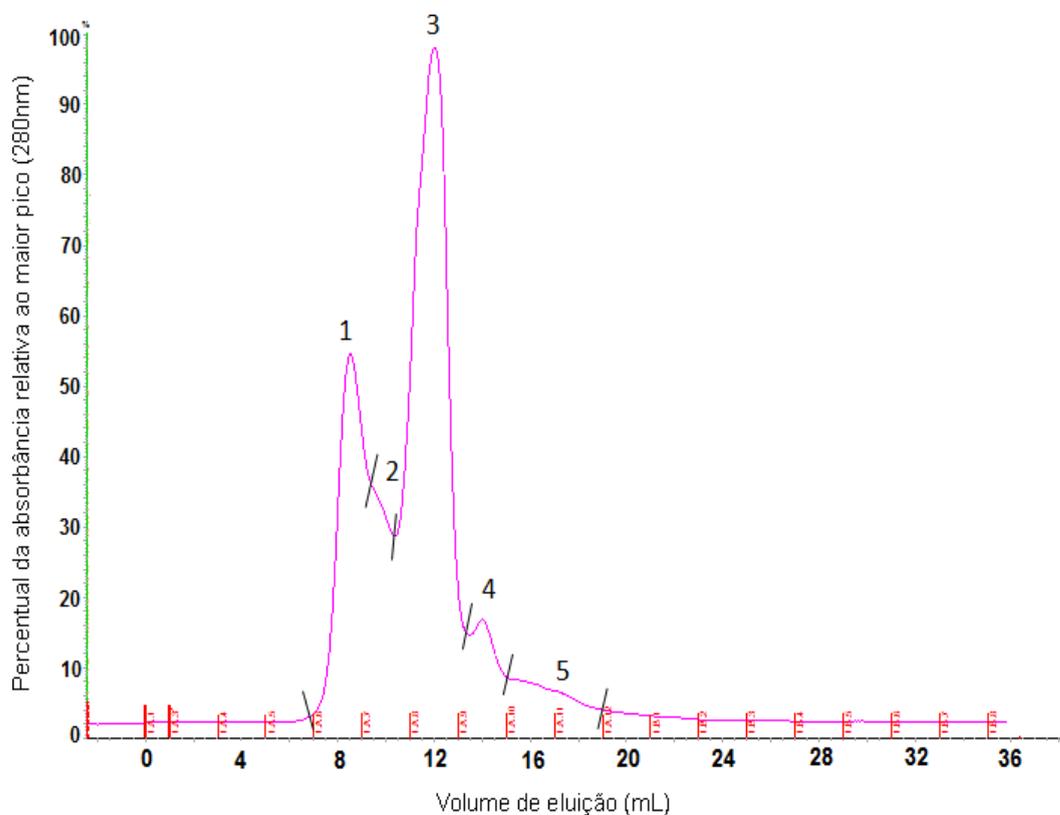


Figura 42. Cromatografia da fração 1 obtida em coluna Superdex 200 10/300 GL, após eluição em coluna Superdex 75 10/300 GL em tampão de acetato de amônio a 50 mM e NaCl a 300 mM, pH 7,3. Fluxo de trabalho de 0,8 mL/min.

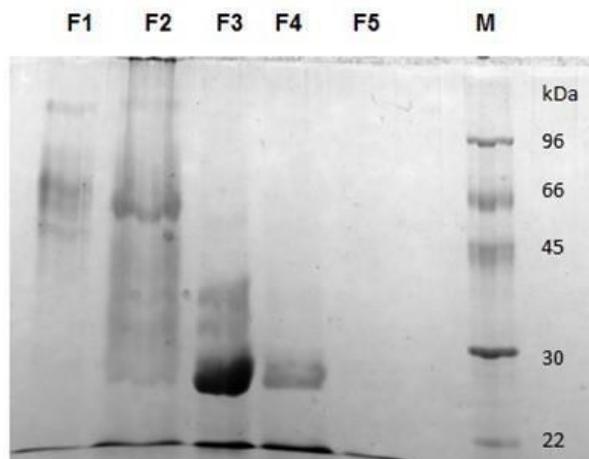


Figura 43. SDS-PAGE (12%) em condições redutoras das frações obtidas após cromatografia em Superdex 75 10/300 GL. M corresponde ao marcador de peso molecular.

A fração 2 (massa molecular de entre 45 e 60 kDa) obtida por cromatografia por exclusão molecular em coluna Superdex 75 10/300 GL foi submetida a uma última etapa de purificação por cromatografia por troca aniônica em uma coluna DEAE Sepharose FF (2 x 1 mL). O maior pico foi coletado (Fig. 44) e sua pureza foi evidenciada através de SDS-PAGE, demonstrando que as etapas cromatográficas conseguiram purificar a proteína de interesse, uma vez que apenas uma banda é evidenciada (Fig. 45).

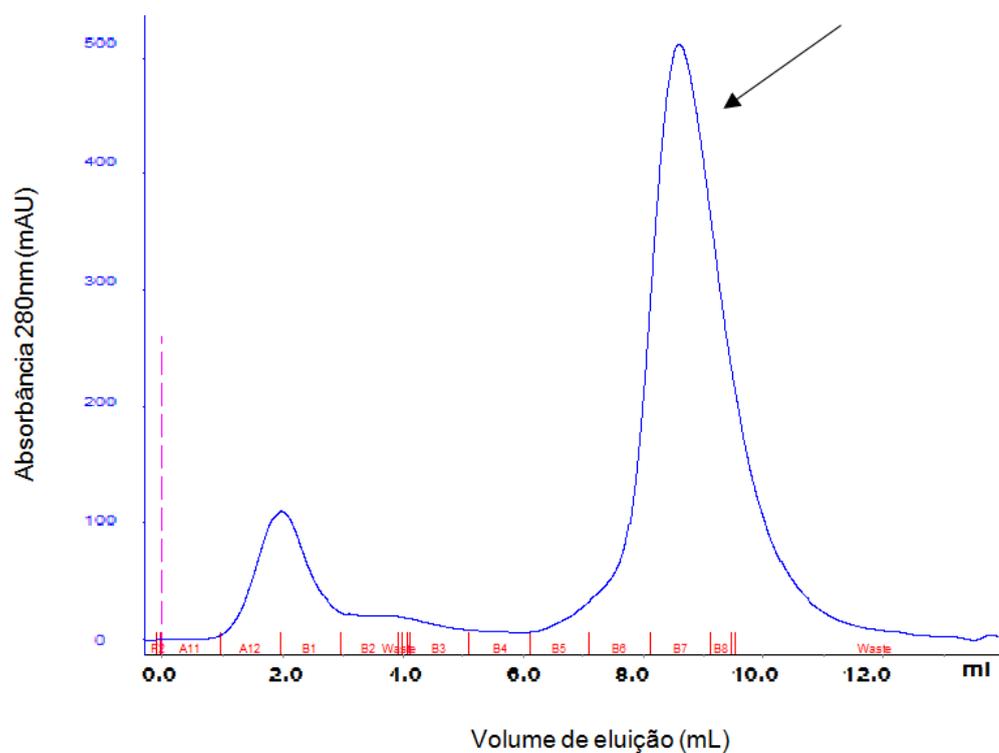


Figura 44. Cromatografia da fração 2 (obtida em coluna Superdex 75 10/300 GL), após eluição em coluna DEAE Sepharose FF em tampão a 25 mM de Hepes, 2 mM de CaCl_2 , pH 7,5 e o mesmo tampão contendo 300 mM de NaCl a um fluxo constante de 1 mL/min. Seta evidenciando o pico coletado.

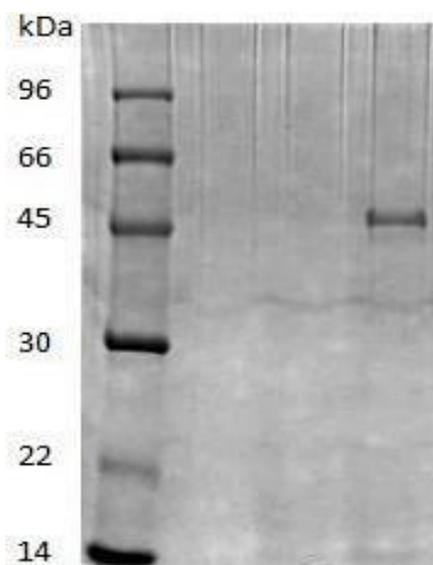


Figura 45. SDS-PAGE (12%) em condições redutoras da fração coletada após cromatografia em coluna DEAE Sepharose FF.

Para a purificação da fosfolipase A₂ básica, as frações 3 e 4 (contendo bandas com a mesma massa molecular) obtidas através da cromatografia por exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300 GL previamente citada, foram submetidas a cromatografia por troca aniônica em uma coluna HiPrep Q Sepharose FF (20 mL), a maior fração (seta) foi coletada (Fig. 46) e a amostra foi carregada em coluna C4 (Supelco, 4,6 x 100 mm). Cinco frações foram coletados ao final da corrida cromatográfica (Fig. 47) e analisados por SDS-PAGE, observando-se que na fração 4 e na fração 5 duas proteínas foram purificadas (Fig. 48).

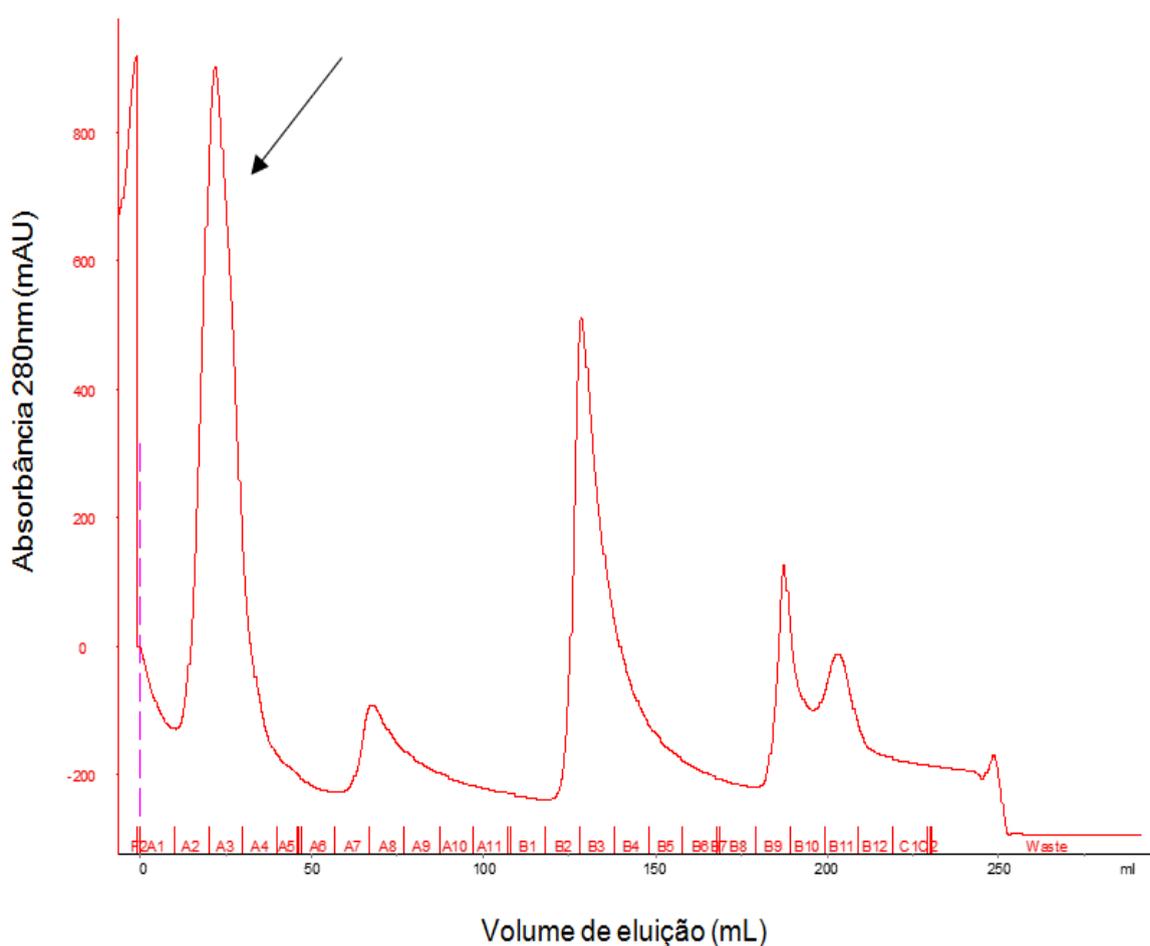


Figura 46. Cromatografia das frações 3 e 4 (obtidas em coluna Superdex 200 10/300 GL), após eluição em HiPrep Q Sepharose FF com eluição em gradientes de 20, 30, 50 e 100% do tampão B, sendo o tampão A = 20 mM de Tris-HCl (pH 7,5) e tampão B = 20 mM de Tris-HCl (pH 7,5) e 1 M de NaCl, fluxo constante em 4mL/min. Seta evidenciando o pico coletado.

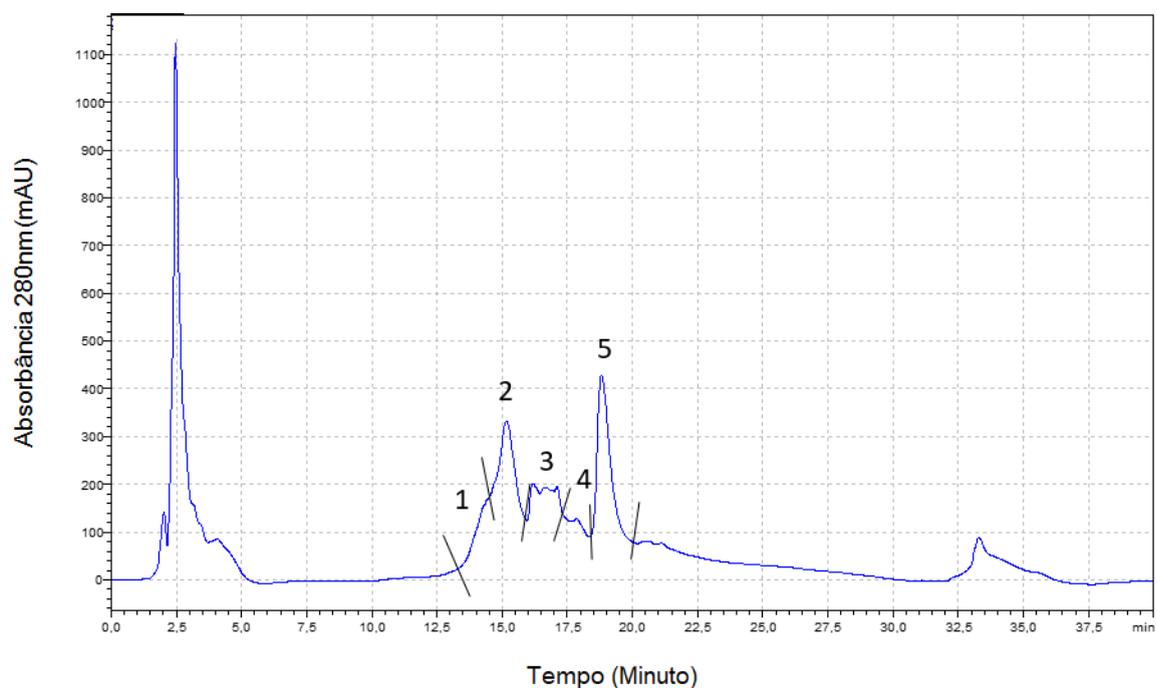


Figura 47. Cromatografia da fração coletada (obtida em coluna HiPrep Q Sepharose FF de troca aniônica), após eluição em coluna c4 com eluição em gradiente linear de 0 a 100% do tampão B, sendo o solvente A = TFA 0,1% e solvente B = ACN 90% em água contendo TFA 0,1%, em fluxo constante de 1 mL/min.

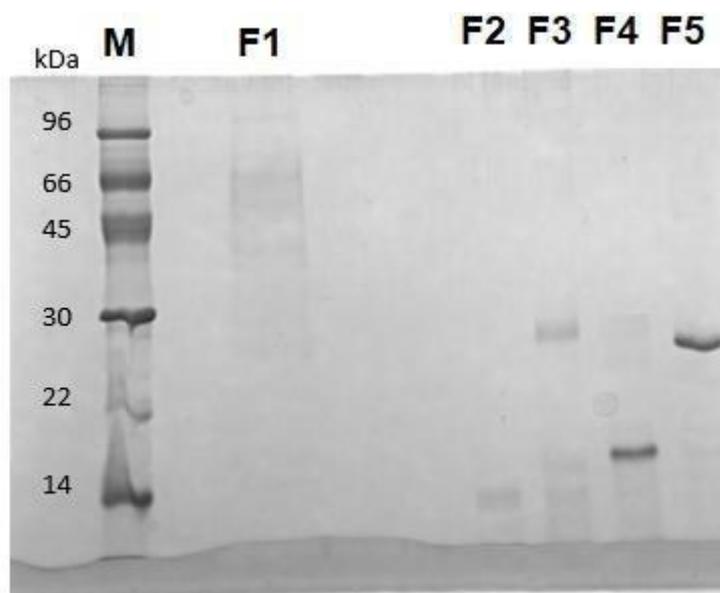


Figura 48. SDS-PAGE (12%) em condições redutoras das frações coletadas após cromatografia em coluna C4. M corresponde ao marcador de peso molecular.

4.3.2 Identificação das Proteínas por Espectrometria de Massa

Após a confirmação por SDS-PAGE que o processo de purificação foi concluído com sucesso, as proteínas foram identificadas através da técnica de espectrometria de massa. Foi realizada a digestão com tripsina da banda de interesse que possivelmente possuía a proteína denominada leucurolisina-b, obtida após cromatografia em coluna DEAE Sepharose FF, com o intuito de separar os peptídeos para detecção através da cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa. O cromatograma após digestão trípica evidencia no eixo x o tempo da cromatografia e no eixo y a intensidade da corrente de íons detectada, ou seja, a quantidade geral de íons que chegaram ao detector (Fig. 49). Para cada pico há a análise de íons (*full scan*) e cada íon identificado é fragmentado. Os fragmentos foram analisados pelo software MASCOT para o sequenciamento e comparação do espectro com peptídeos pertencentes a uma determinada proteína, depositados em banco de dados, com o mesmo tipo de clivagem usada experimentalmente, identificando dessa forma o peptídeo e determinando qual a proteína presente na amostra (Fig. 50 e 51).

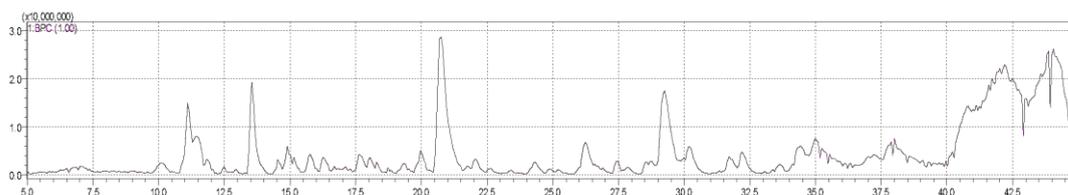


Figura 49. Perfil cromatográfico após digestão trípica da banda contendo a leucurolisina-b obtida após cromatografia em coluna DEAE Sepharose FF. O cromatograma após digestão trípica evidencia no eixo x o tempo da cromatografia e no eixo y a intensidade da corrente de íons detectada, ou seja, a quantidade geral de íons que chegaram ao detector.

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

Peptide View

MS/MS Fragmentation of **YSVGVM^QMDHSPINR**

Found in **VM3LB_BOTLC** in **SwissProt**, Zinc metalloproteinase leucurolysin-B (Fragment) OS=Bothrops leucurus OX=157295 PE=1 SV=1

Match to Query 112: 1589.773872 from(530.931900,3+) index(151)

Title: Sum of 1 scans in range 526 (rt=21.0117) to 526 (rt=21.0117) Mass range 0.0000 to 1950.0219

Data file metal01.mgf

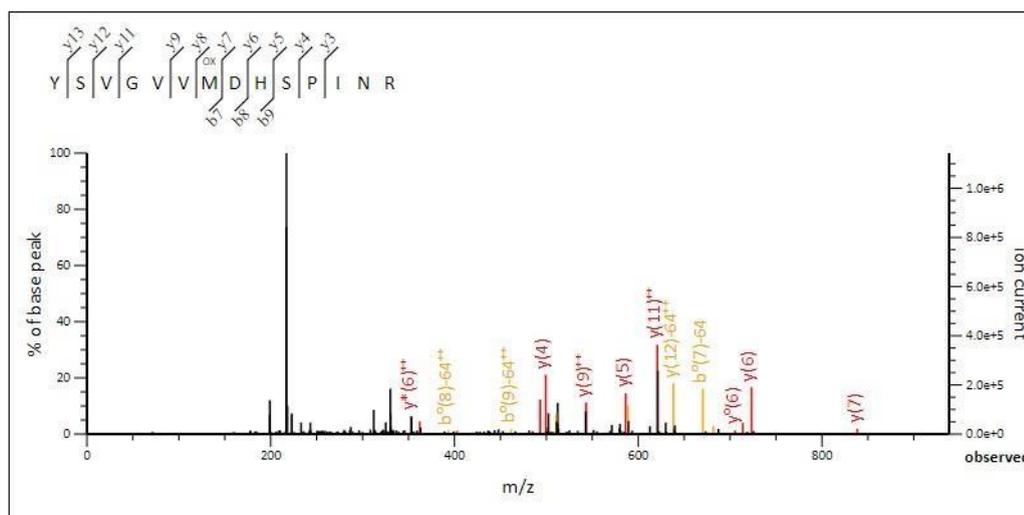


Figura 50. Identificação dos peptídeos através da comparação do espectro com peptídeos pertencentes à proteína leucurolysin-b através do software MASCOT.

MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results

Protein View: P86092|VM3LB_BOTLC

Zinc metalloproteinase leucurolysin-B (Fragment) OS=Bothrops leucurus PE=1 SV=1

Database: Squamata_Toxins
 Score: 37
 Monoisotopic mass (M_r): 38119
 Calculated pI: 5.44

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of P86092|VM3LB_BOTLC against nr.](#)

Search parameters

MS data file: metal01.mgf
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Fixed modifications: [Carbamidomethyl \(C\)](#)
 Variable modifications: [Oxidation \(M\)](#)

Protein sequence coverage: 4%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 DTVLLNRISH DNAQLLAIVF NENVIGKAYT GGMCDPRYSV GVMMDHSPIN
51 RLVADTMAHE MGHNLGIHHD TGSCSCGGHS CIMS RVISHQ PLQYFNSCSY
101 IEYWDFITKL NPQCILNEPL RTDIVSPFVC GNELLEMGEE CDCGSPRNCR
151 DLCCDAATCK LHSWVECESG ECCDQCRFIK AGNVCRPPRK ECDVAEACTG
201 QSAQCPTDDF KRNGQPCLNN YAYCYQGNCV IMYHOCYALF GSDATMAQDS
251 CFPQNKKGNE YFYCRLENGI NIPCAQEDVK CGRLFCHNMK YEQDCNYSDR
301 GMVDNGTKCA EGKVCNSNRQ AYQR
  
```

Unformatted sequence string: [324 residues](#) (for pasting into other applications).

Sort by residue number increasing mass decreasing mass
 Show matched peptides only predicted peptides also

Query	Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta M	Score	Expect	Rank	U	Peptide
112	38 - 51	530.9319	1589.7739	1588.7668	1.0071	0	37	0.032	1	R.YSVGVMDHSPINR.L + Oxidation (M)

Figura 51. Resultado obtido pelo MASCOT demonstrando em vermelho a localização dos aminoácidos presentes nos peptídeos identificados na proteína de interesse (leucurolisina-b).

As frações 3 e 4 obtidas por cromatografia por exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300 GL foram submetidas a sucessivas etapas cromatográficas evidenciando na última etapa cromatográfica em coluna C4 duas bandas purificadas mais relevantes (fração 4 e fração 5). A banda da fração 4 foi submetida à análise por espectrômetro de massa acoplado à cromatografia líquida, sendo possível evidenciar o perfil cromatográfico após digestão trípica abaixo (Fig. 52). Após análise pelo software MASCOT para o sequenciamento de peptídeos e comparação do espectro com peptídeos pertencentes a uma determinada proteína (Fig. 53) foi possível então identificar uma fosfolipase A₂ básica (Fig. 54).

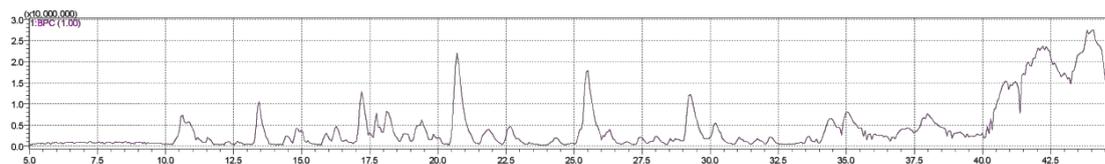


Figura 52. Perfil cromatográfico após digestão trípica da banda contendo a fosfolipase A₂ básica obtida após cromatografia em coluna C4. O cromatograma após digestão trípica evidencia no eixo x o tempo da cromatografia e no eixo y a intensidade da corrente de íons detectada, ou seja, a quantidade geral de íons que chegaram ao detector.

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

Peptide View

MS/MS Fragmentation of YMAYPDVLC

Found in PA2B2_BOTJR in SwissProt, Basic phospholipase A2 bothropstoxin-2 OS=Bothrops jararacussu OX=8726 PE=1 SV=1

Match to Query 268: 1274.515248 from(638.264900,2+) index(228)

Title: Sum of 2 scans in range 570 (rt=22.4683) to 578 (rt=22.7150) Mass range 0.0000 to 1950.0219

Data file PLA-f4.mgf

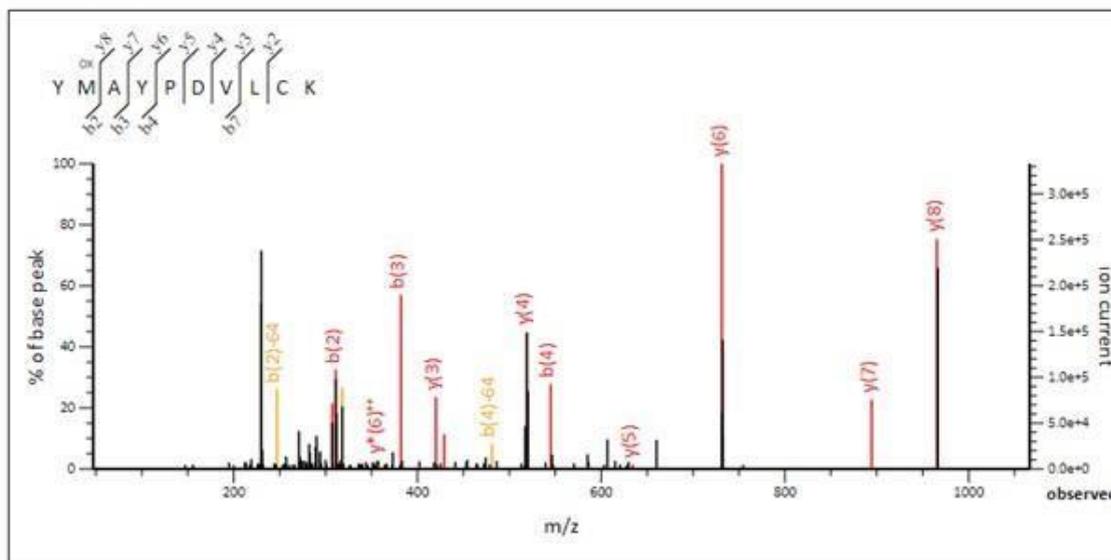


Figura 53. Identificação dos peptídeos através da comparação do espectro com peptídeos pertencentes à proteína fosfolipase A₂ básica através do software MASCOT.

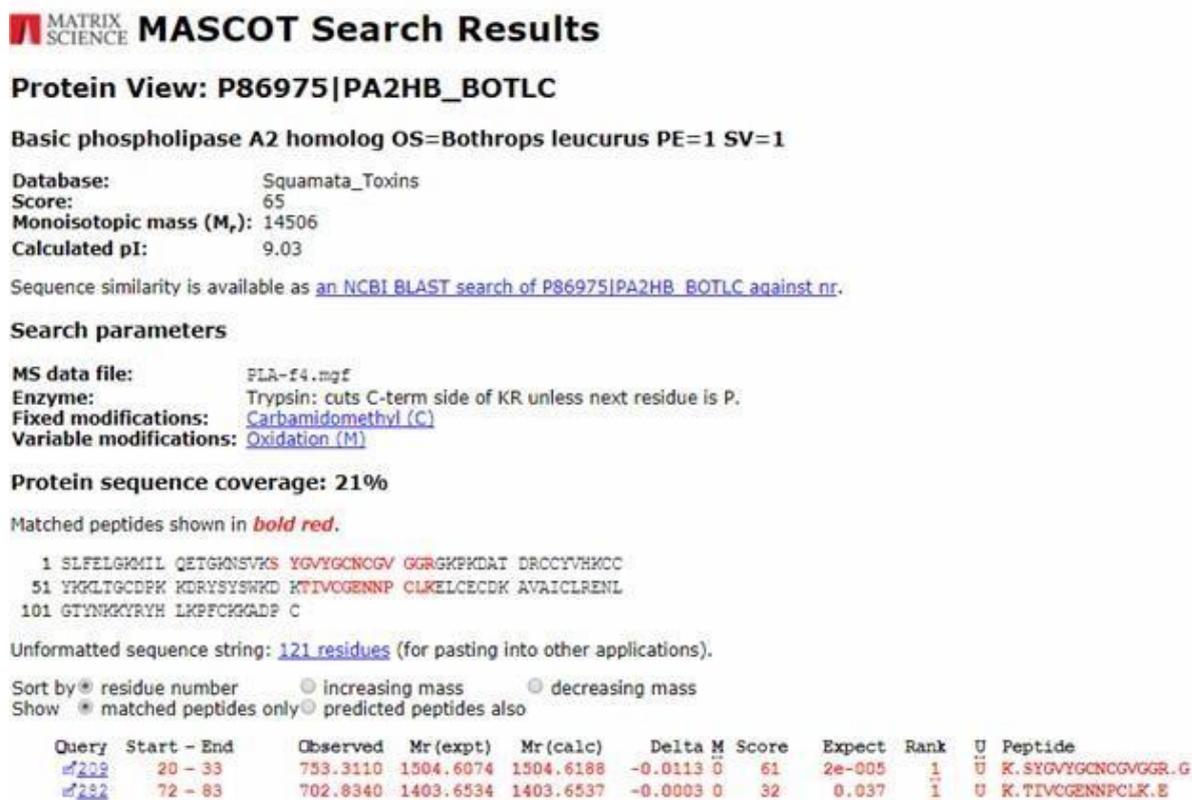


Figura 54. Resultado obtido pelo MASCOT demonstrando em vermelho a localização dos aminoácidos presentes nos peptídeos identificados na proteína de interesse (fosfolipase A₂ básica).

Após digestão trípica, a banda da fração 5 foi submetida à análise por espectrômetro de massa acoplado à cromatografia líquida, sendo possível evidenciar o perfil cromatográfico abaixo (Fig. 55). Após análise pelo software MASCOT para o sequenciamento de peptídeos e comparação do espectro com peptídeos pertencentes a uma determinada proteína (Fig. 56 e 57) foi possível então identificar a proteína leucurolisina-A (Fig. 58).

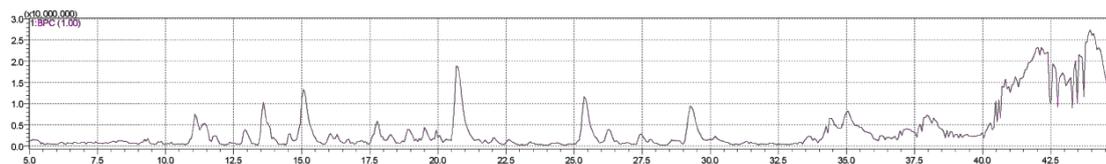


Figura 55. Perfil cromatográfico após digestão trípica da banda contendo a leucorolisina-A obtida após cromatografia em coluna C4. O cromatograma após digestão trípica evidencia no eixo x o tempo da cromatografia e no eixo y a intensidade da corrente de íons detectada, ou seja, a quantidade geral de íons que chegaram ao detector.

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

Peptide View

MS/MS Fragmentation of **KYNSNLNTIR**

Found in **VMILA_BOTLC** in **SwissProt**, Snake venom metalloproteinase leucorolisina-A OS=Bothrops leucurus OX=157295 PE=1 SV=2

Match to Query 232: 1222.619848 from(612.317200,2+) index(204)

Title: Sum of 2 scans in range 366 (rt=16.1500) to 386 (rt=16.7617) Mass range 0.0000 to 1950.0219

Data file PLA-f5.mgf

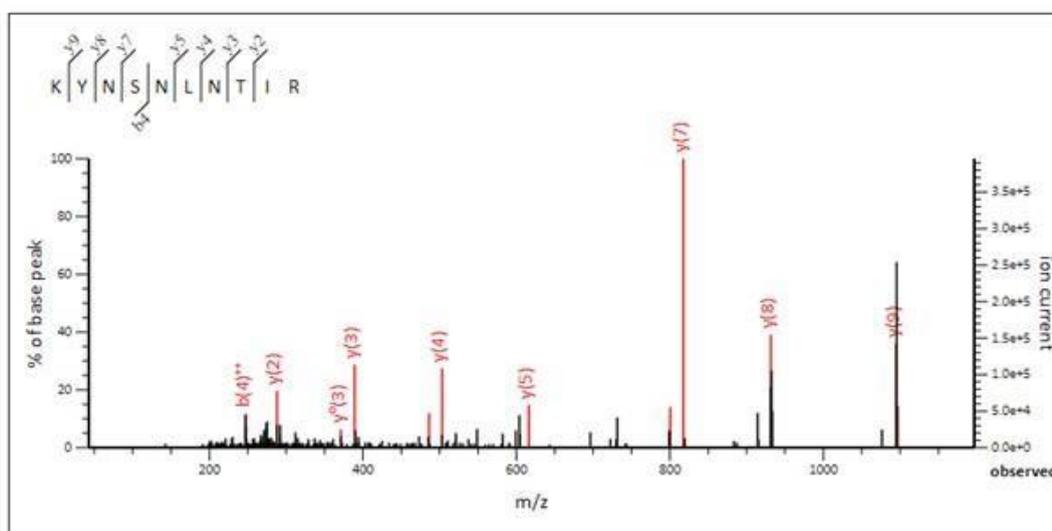


Figura 56. Identificação de um dos peptídeos através da comparação do espectro com peptídeos pertencentes à proteína leucorolisina-A através do software MASCOT.

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

Peptide View

MS/MS Fragmentation of **VAVTMAHELGHNLGMR**

Found in **VMILA_BOTLC** in **SwissProt**, Snake venom metalloproteinase leucurolysin-A OS=Bothrops leucurus OX=157295 PE=1 SV=2

Match to Query 130: 1734.856572 from(579.292800,3+) index(169)

Title: Sum of 2 scans in range 660 (rt=25.2033) to 668 (rt=25.4500) Mass range 0.0000 to 1950.0219

Data file PLA-f5.mgf

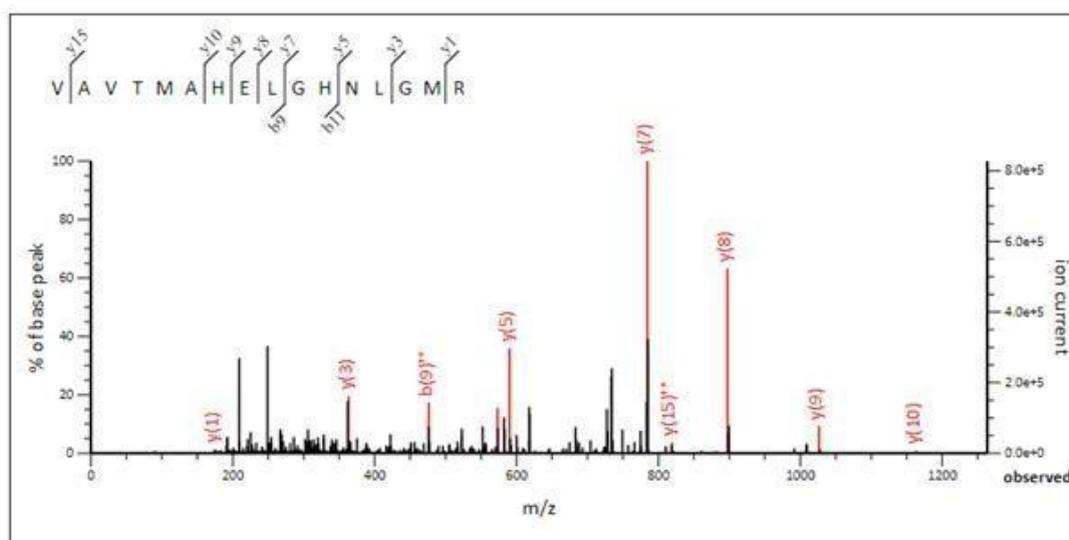


Figura 57. Identificação de um dos peptídeos através da comparação do espectro com peptídeos pertencentes à proteína leucurolisina-A através do software MASCOT.

MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results

Protein View: P84907|VM1LA_BOTLC

Snake venom metalloproteinase leucurolysin-A OS=Bothrops leucurus PE=1 SV=2

Database: Squamata_Toxins
 Score: 162
 Monoisotopic mass (M_r): 23346
 Calculated pI: 6.86

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of P84907|VM1LA_BOTLC against nr.](#)

Search parameters

MS data file: FLA-f5.mgf
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Fixed modifications: [Carbamidomethyl \(C\)](#)
 Variable modifications: [Oxidation \(M\)](#)

Protein sequence coverage: 12%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 QQFSPRYIEL VVVADHGMEK KYNSNLNTIR KVVHEMLNTV NGFFRSMDVD
51 ASLVNLEVWS KGDLIKVEKD SSKTLTSFGE WRERDLLPRI SHDHAQLLTV
101 IFLDEETIGI AYTAGWCDLS QSVAVVMDHS KGNLRVAVTM AHELGHNLGM
151 RHDGNQCHCN APSCIMADTL SKGLSFEFSD CSQNPVQTYL TKHNPQCILN
201 KP
  
```

Unformatted sequence string: [202 residues](#) (for pasting into other applications).

Sort by residue number increasing mass decreasing mass
 Show matched peptides only predicted peptides also

Query	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	M	Score	Expect	Rank	U	Peptide
222	21 - 30	612.3172	1222.6198	1221.6465	0.9733	1	49	0.026	1	U	K.KYNSNLNTIR.K
212	22 - 30	547.7617	1093.5088	1093.5516	-0.0427	0	47	0.043	1	U	K.YNSNLNTIR.K
132	136 - 151	579.2928	1734.8566	1734.8658	-0.0092	0	67	0.00089	1	U	R.VAVTMAHELGHNLGMR.H

Figura 58. Resultado obtido pelo MASCOT demonstrando em vermelho a localização dos aminoácidos presentes nos peptídeos identificados na proteína de interesse (leucurolisina-A).

4.4 LEUCUROLISINA-B

4.4.1 Ensaios de Citotoxicidade

O tratamento com a leucurolisina-b foi realizado utilizando concentrações crescentes da proteína (0,12 a 20 µg/mL), o experimento foi realizado em triplicata para todas as células, e apontou um valor de EC₅₀ de 1,44 µg/mL (mediana dos valores de todos os experimentos, n=3) com variação de 1,29 a 1,48 µg/mL para células C6. Os dados obtidos no experimento correspondendo ao valor mediano da EC₅₀ são mostrados na Fig. 59 e a equação da regressão não linear que melhor se ajustou aos pontos experimentais e que foi usada para calcular este valor é apresentada na equação (6).

$$(6) \quad V = \{104,11/[1+10^{(0,30+1,95x)}]\} - 1,61 \quad (R^2 = 0,98)$$

Em que V corresponde à viabilidade celular e x corresponde ao logaritmo da concentração.

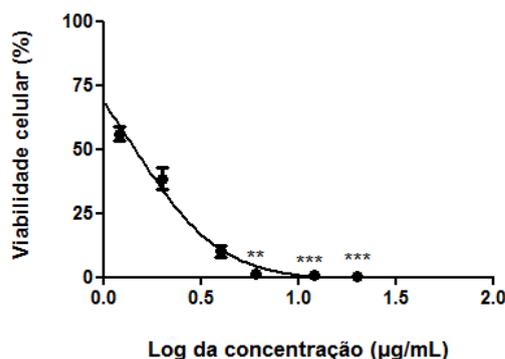


Figura 59. Citotoxicidade da leucurolisina-b para células C6 de glioma de rato. O experimento aqui representado corresponde ao valor da mediana da EC₅₀. A citotoxicidade é dependente de concentração da proteína, mensurada através de medida espectrofotométrica do formazan. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 2,04 com variação de 1,96 a 2,16). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 98,24% com variação de 95,68 a 101,40 (** p < 0,01; *** p < 0,001). Regressão não linear usada para calcular o valor da EC₅₀ (1,44 µg/mL).

Para células U251, o valor de EC₅₀ foi de 2,25 µg/mL (mediana dos valores de todos os experimentos, n=3) com variação de 2,07 a 2,49 µg/mL. Os dados obtidos no experimento correspondendo ao valor mediano da EC₅₀ são mostrados na Fig. 60 e a equação da regressão não linear que melhor se ajustou aos pontos experimentais e que foi usada para calcular a EC₅₀ é apresentada na equação (7). Foi evidenciada citotoxicidade dependente de concentração para linhagens de células tumorais, sem alteração, no entanto, da viabilidade celular dos astrócitos (Fig. 61).

$$(7) \quad V = \{99,61/[1+10^{(0,82+2,17x)}]\} - 3,06 \quad (R^2 = 0,98)$$

Em que V corresponde à viabilidade celular e x corresponde ao logaritmo da concentração.

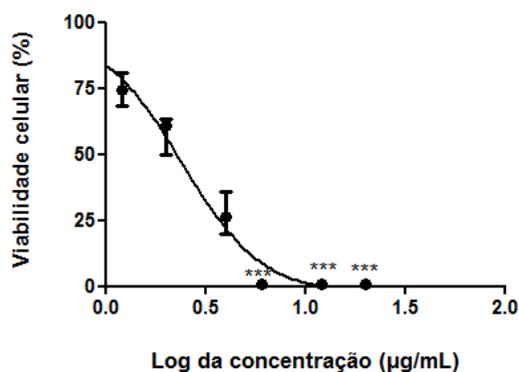


Figura 60. Citotoxicidade da leucurolisina-b para células U251 de glioblastoma humano. O experimento aqui representado corresponde ao valor da mediana da EC_{50} . A citotoxicidade é dependente de concentração da proteína, mensurada através de medida espectrofotométrica do formazan. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 1,56 com variação de 1,45 a 1,76). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 97,74% com variação de 87,13 a 100,60 (***) $p < 0,001$). Regressão não linear usada para calcular o valor da EC_{50} (2,25 µg/mL).

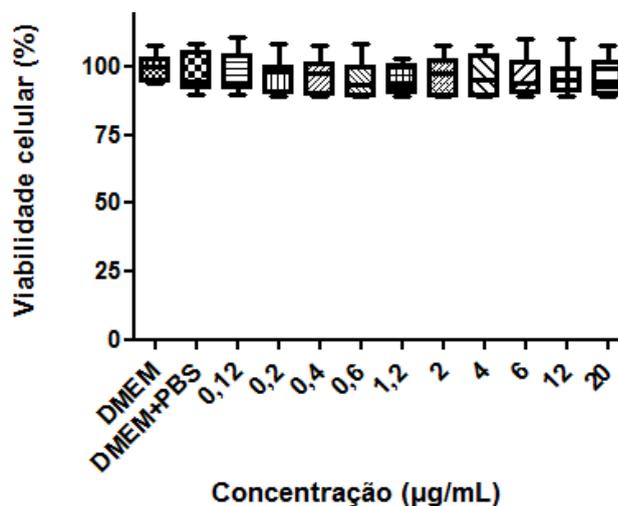


Figura 61. Viabilidade de astrócitos murinos após tratamento com a leucurolisina-b. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 1,09, com variação de: 1,02 a 1,17). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal- Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 94,65% com variação de 89,96 a 108,20, não houve diferença entre os grupos.

4.4.2 Avaliação da Morfologia Celular e Celularidade

A morfologia celular antes e após período de tratamento com a leucurolisina-b foi acompanhada com o auxílio de um microscópio de fase, sendo possível observar que o tratamento utilizando a concentração 0,6 µg/mL da proteína não diminuiu a celularidade para nenhum tipo celular (Fig. 62). A partir da concentração de 1,2 µg/mL há diminuição da celularidade apenas para células tumorais tratadas com a proteína, não afetando a celularidade dos astrócitos (Fig. 63). Após o tratamento com a concentração de 4 µg/mL da proteína observam-se apenas os *debris* celulares das células tumorais, sem evidência de diminuição da celularidade dos astrócitos (Fig. 64).

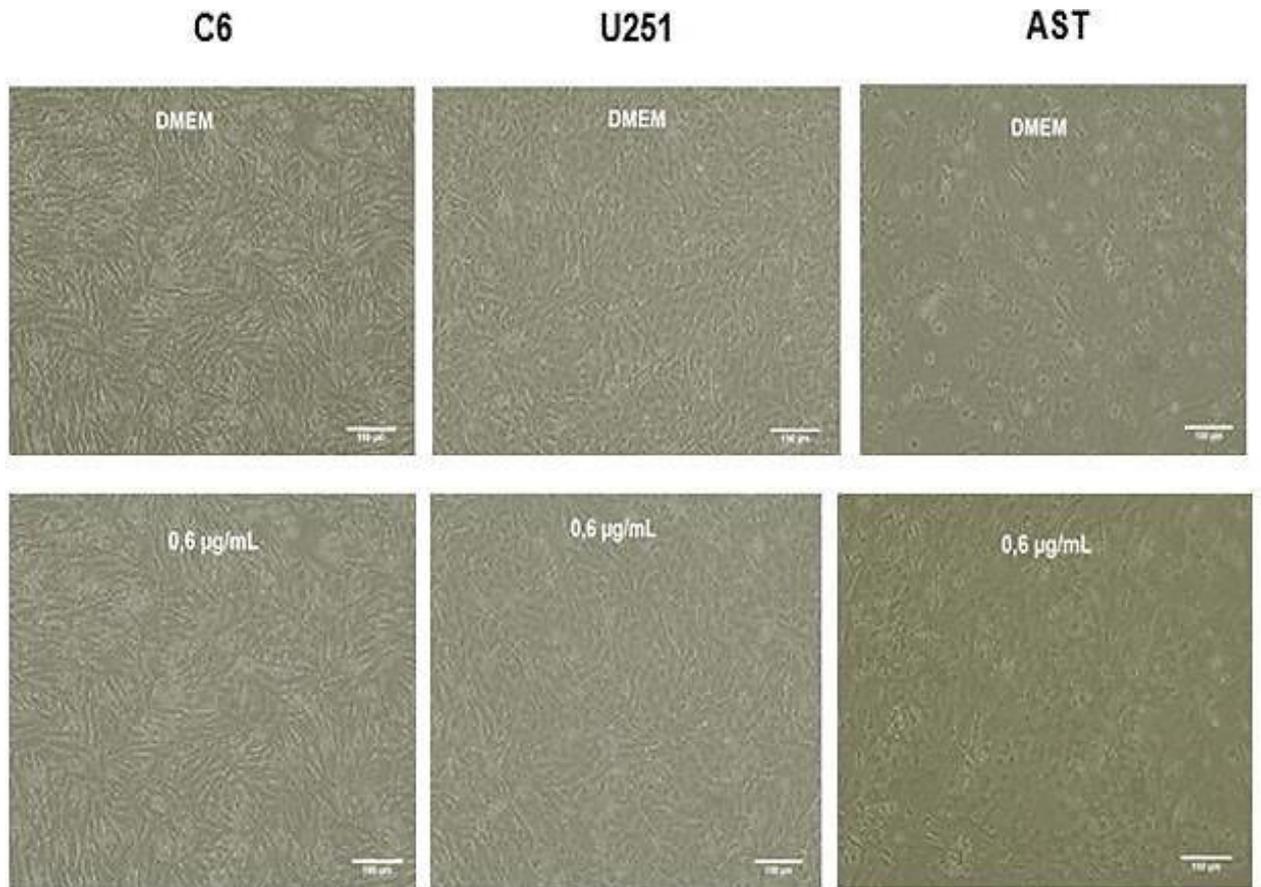


Figura 62. Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de células C6, U251 e astrócitos não tratados (DMEM) ou tratados com a concentração de 0,6 µg/mL da leucurolisina-b, após um período de 72 horas. É possível observar uma monocamada homogênea e confluenta de células após o tratamento com a concentração de 0,6 µg/mL nos tipos celulares utilizados no experimento, comparável com as células não tratadas (DMEM). Barra = 100 µm

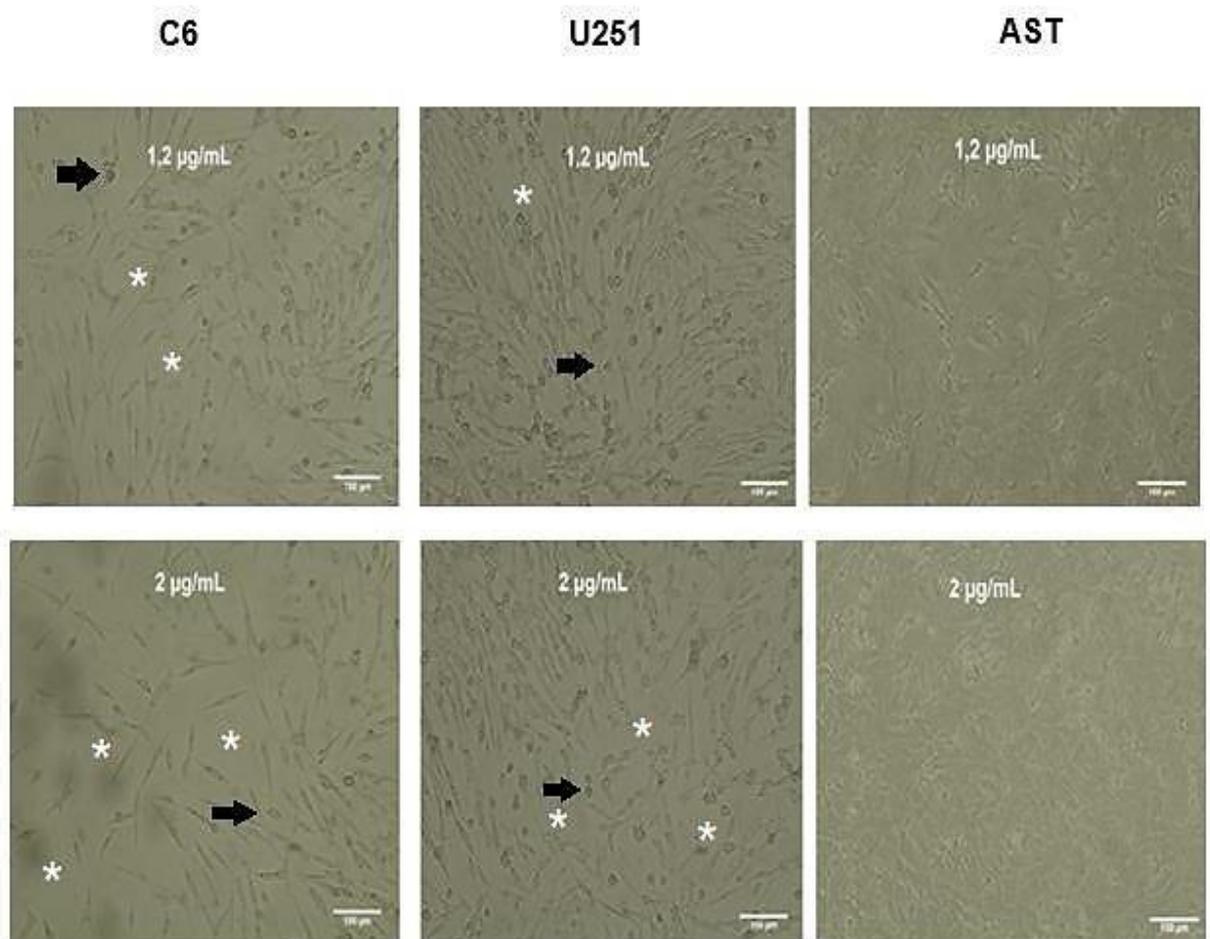


Figura 63. Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de células C6, U251 e astrócitos tratados com as concentrações de 1,2 e 2 µg/mL da leucorolisina-b, após um período de 72 horas. É possível observar que a partir da concentração de 1,2 µg/mL há uma diminuição da celularidade apenas para células C6 e U251, sendo proporcional ao aumento das concentrações, e mudança na morfologia celular de fusiformes para arredondadas. A celularidade e morfologia de células astrocitárias não foi afetada após tratamento com as concentrações supracitadas. Os asteriscos representam os espaços vazios e as setas pretas apontam células arredondadas. Barra = 100 µm

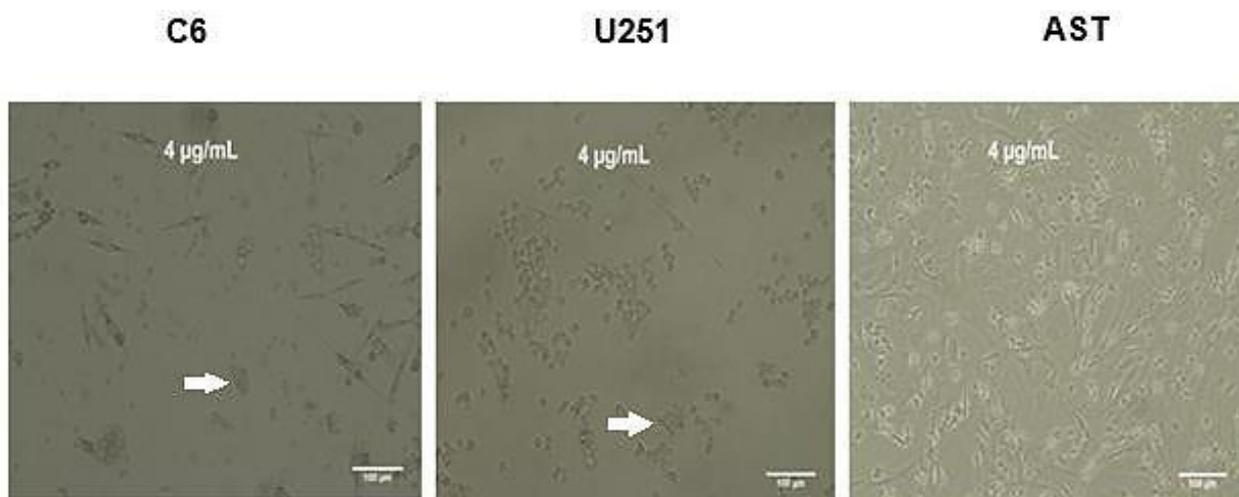


Figura 64. Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de células C6, U251 e astrócitos tratados com a concentração de 4 µg/mL da leucurolisina-b, após um período de 72 horas. É possível observar que após tratamento com esta concentração restam apenas *debris* celulares para células C6 e U251, apontados pelas setas brancas, entretanto, não há diminuição da celularidade de astrócitos tratados com a mesma concentração. Barra = 100 µm.

4.4.3 Identificação do Tipo de Morte Celular por Citometria de Fluxo

Após evidenciar a ação citotóxica relevante e dependente de concentração da leucurolisina-b nas linhagens tumorais, foi investigada o tipo de morte celular provocada pela mesma utilizando a concentração de 2 µg/mL, concentração próxima às obtidas através dos cálculos da EC_{50} para as linhagens tumorais. O teste utilizado nesta etapa do estudo foi o de dupla marcação com anexina V e iodeto de propídio e a quantificação por citometria de fluxo realizado em triplicata ($n=3$) e mostrou que a morte celular das linhagens tumorais ocorre principalmente por apoptose, embora um percentual de células morra também por necrose. A concentração utilizada não afeta os astrócitos, uma vez que a maioria permanece viável após tratamento (Fig. 65).

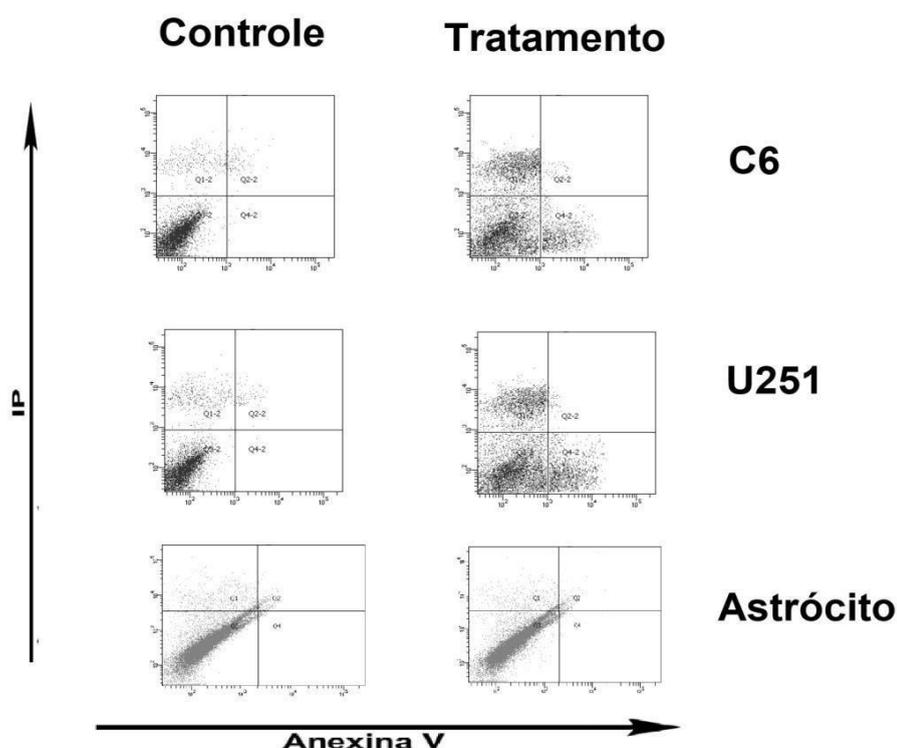


Figura 65. Avaliação do tipo de morte celular promovida pelo tratamento (72 horas) com a leucurolisina-b a 2 $\mu\text{g/mL}$ em comparação com o tratamento apenas com o veículo da droga (PBS). A morte da maioria das células tumorais ocorre por apoptose inicial (quadrante inferior direito), mas um percentual de células morreu por necrose (quadrante superior esquerdo). Os astrócitos mantiveram-se viáveis após o tratamento com a concentração utilizada (quadrante inferior esquerdo).

Tabela 3. Mediana dos percentuais e variações de células C6, U251 e astrócitos marcadas com anexina V e IP após 72 horas de tratamento com a leucurolisina-b a 2 $\mu\text{g/mL}$

	C6 (controle)	C6 (tratamento)	U251 (controle)	U251 (tratamento)	Astrócitos (controle)	Astrócitos (tratamento)
Viáveis	96,25 (95,10-97,10)	50,60 (49,30-58,20)	96,15 (95,50-97,00)	59,95 (57,30-61,20)	94,55 (93,80-96,20)	94,35 (93,00-95,50)
Apoptose inicial	0,05 (0,00-0,20)	30,40 (28,20-35,70)	0,05 (0,00-0,20)	25,70 (25,00-29,90)	0,95 (0,70-1,20)	0,95 (0,70-1,50)
Apoptose tardia	1,70 (1,10-2,00)	1,65 (0,90-1,90)	1,15 (0,70-1,70)	1,10 (0,60-1,90)	1,10 (0,90-2,10)	1,50 (0,60-2,30)
Necrose	2,10 (1,50-3,10)	16,45 (11,90-18,70)	2,75 (2,00-3,10)	12,85 (10,90-15,50)	2,95 (2,00-4,10)	3,05 (2,40-4,50)

4.5 FOSFOLIPASE A₂ BÁSICA

4.5.1 Ensaio de Citotoxicidade

O tratamento com a fosfolipase A₂ básica foi realizado utilizando concentrações crescentes da proteína (2 a 100 µg/mL), o experimento foi realizado em triplicata para todas as células, e apontou um valor de EC₅₀ de 30,00 µg/mL (mediana dos valores de todos os experimentos, n=3) com variação de 27,36 a 32,16 µg/mL para células C6. Os dados obtidos no experimento correspondendo ao valor mediano da EC₅₀ são mostrados na Fig. 66 e a equação da regressão não linear que melhor se ajustou aos pontos experimentais e que foi usada para calcular este valor é apresentada na equação (8). Para células U251, o valor de EC₅₀ foi de 39,81 µg/mL (mediana dos valores de todos os experimentos, n=3) com variação de 38,12 a 41,86 µg/mL. Os dados obtidos no experimento correspondendo ao valor mediano da EC₅₀ são mostrados na Fig. 67 e a equação da regressão não linear que melhor se ajustou aos pontos experimentais e que foi usada para calcular a EC₅₀ é apresentada na equação (9). Foi evidenciada citotoxicidade dependente de concentração para linhagens de células tumorais, sem alteração, no entanto, da viabilidade celular dos astrócitos (Fig. 68).

$$(8) \quad V = \{95,76/[1+10^{(3,20+1,86x)}]\} - 20,71 \quad (R^2 = 0,96)$$

Em que V corresponde à viabilidade celular e x corresponde ao logaritmo da concentração.

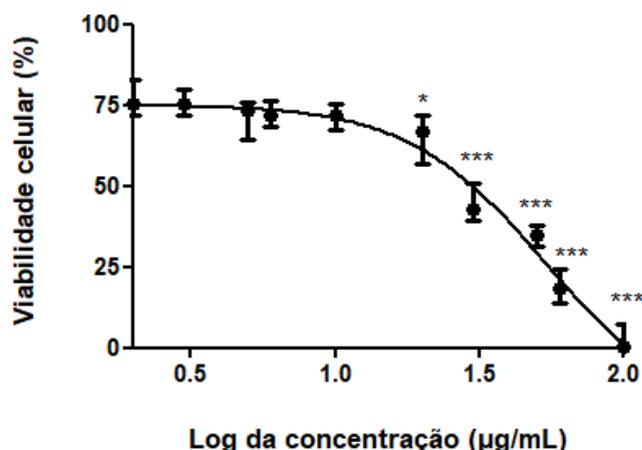


Figura 66. Citotoxicidade da fosfolipase A₂ básica para células C6 de glioma de rato. O experimento aqui representado corresponde ao valor da mediana da EC₅₀. A citotoxicidade é dependente de concentração do veneno total, mensurada através de medida espectrofotométrica do formazan. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 2,58 com variação entre 2,38 a 2,88). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 98,59% com variação de 90,63 a 113,40 (* p < 0,05, *** p < 0,001). Regressão não linear usada para calcular o valor da EC₅₀ (30,00 µg/mL).

$$(9) \quad V = \{150,43/[1+10^{(2,63+1,47x)}]\} - 48,73 \quad (R^2 = 0,94)$$

Em que V corresponde à viabilidade celular e x corresponde ao logaritmo da concentração.

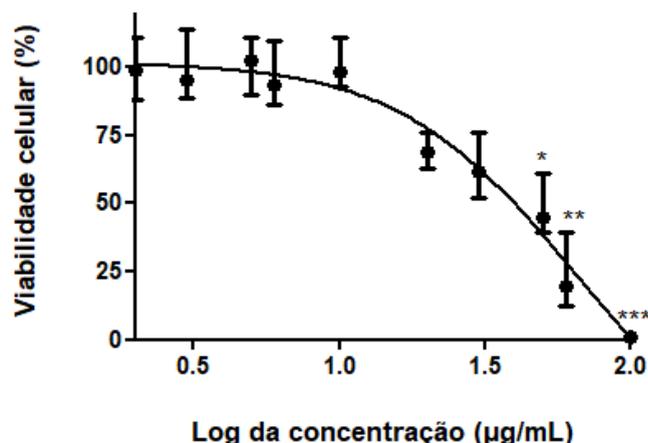


Figura 67. Citotoxicidade da fosfolipase A₂ básica para células U251 de glioblastoma humano. O experimento aqui representado corresponde ao valor da mediana da EC₅₀. A citotoxicidade é dependente de concentração do veneno total, mensurada através de medida espectrofotométrica do formazan. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 1,42 com variação entre 1,30 a 1,57). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 96,97% com variação de 88,68 a 110,80 (* p < 0,05, ** p < 0,01; *** p < 0,001). Regressão não linear usada para calcular o valor da EC₅₀ (39,81 µg/mL).

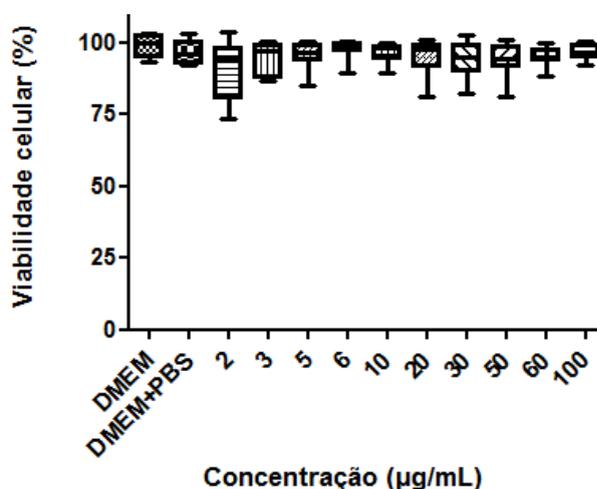


Figura 68. Viabilidade de astrócitos murinos após tratamento com a fosfolipase A_2 básica. Os dados estão expressos em percentual do controle geral que consiste de células apenas em DMEM (considerou-se como 100% a mediana das absorvâncias do grupo que foi de 0,98, com variação de: 0,91 a 1,01). Não houve diferença estatística entre o grupo controle geral e o controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS após comparação pelo teste de Mann-Whitney. O Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns foi utilizado para comparar os grupos tratados com o grupo controle experimental que consiste de células em DMEM com PBS cuja mediana foi de 96,04% com variação de 91,95 a 103,00, não houve diferença entre os grupos.

4.5.2 Avaliação da Morfologia Celular e Celularidade

A morfologia celular antes e após período de tratamento com a fosfolipase A_2 básica foi acompanhada com o auxílio de um microscópio de fase, sendo possível observar que o tratamento utilizando a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ da proteína não diminuiu a celularidade para nenhum tipo celular (Fig. 69). A partir da concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ há diminuição da celularidade apenas para células tumorais tratadas com a proteína, não afetando a celularidade dos astrócitos (Fig. 70). Após o tratamento com a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ da proteína observam-se apenas os *debris* celulares das células tumorais, sem evidência de diminuição da celularidade dos astrócitos (Fig. 71).

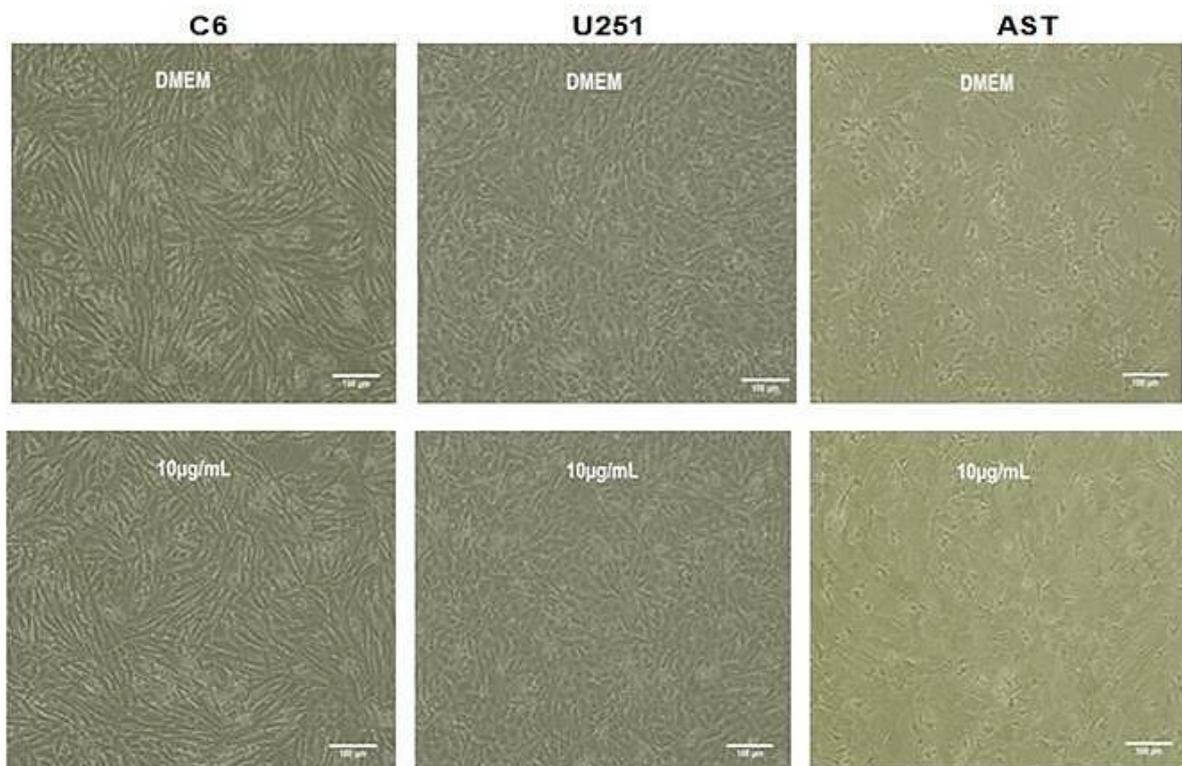


Figura 69. Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de células C6, U251 e astrócitos não tratados (DMEM) ou tratados com a concentração de 10 µg/mL da fosfolipase A₂ básica, após um período de 72 horas. É possível observar uma monocamada homogênea e confluenta de células após o tratamento com a concentração de 10 µg/mL nos tipos celulares utilizados no experimento, comparável com as células não tratadas (DMEM). Barra = 100 µm

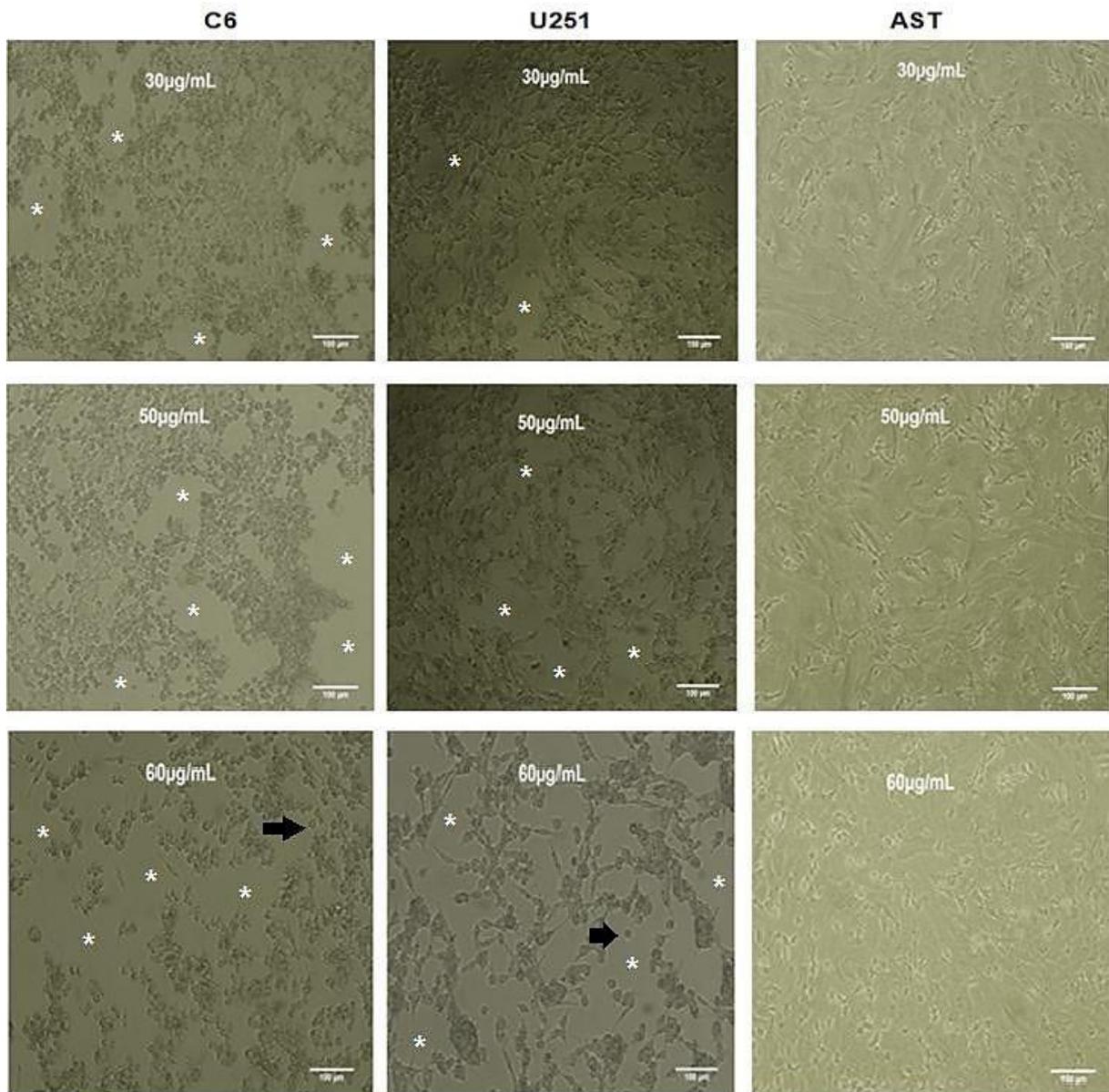


Figura 70. Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de células C6, U251 e astrócitos tratados com as concentrações de 30 a 60 $\mu\text{g/mL}$ da fosfolipase A_2 básica, após um período de 72 horas. É possível observar que a partir da concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ há uma diminuição da celularidade apenas para células C6 e U251, sendo proporcional ao aumento das concentrações, e mudança na morfologia celular de fusiformes para arredondadas. A celularidade e morfologia de células astrocíticas não foram afetadas após tratamento com as concentrações supracitadas. Os asteriscos representam os espaços vazios e as setas pretas apontam células arredondadas. Barra = 100 μm

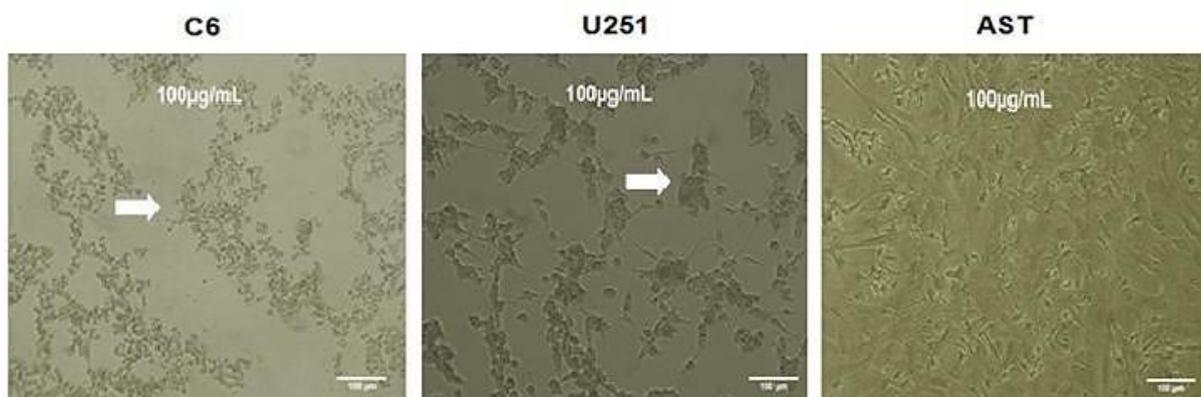


Figura 71. Avaliação através de microscopia de contraste de fase da morfologia de células C6, U251 e astrócitos tratados com a concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da fosfolipase A_2 básica, após um período de 72 horas. É possível observar que após tratamento com esta concentração restam apenas *debris* celulares para células C6 e U251, apontados pelas setas brancas, entretanto, não há diminuição da celularidade de astrócitos tratados com a mesma concentração. Barra = 100 μm .

4.5.3 Identificação do Tipo de Morte Celular por Citometria de Fluxo

Após evidenciar a ação citotóxica relevante e dependente de concentração da fosfolipase A_2 básica nas linhagens tumorais, foi investigada o tipo de morte celular provocada pela mesma utilizando a concentração de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, concentração próxima às obtidas através dos cálculos da EC_{50} para as linhagens tumorais. O teste utilizado nesta etapa do estudo foi o de dupla marcação com anexina V e iodeto de propídio e a quantificação por citometria de fluxo realizado em triplicata ($n=3$) e mostrou que morte celular das linhagens tumorais ocorre principalmente por necrose, mas um percentual de células morre por apoptose tardia. A concentração utilizada não afeta os astrócitos, uma vez que a maioria permanece viável após tratamento (Fig. 72).

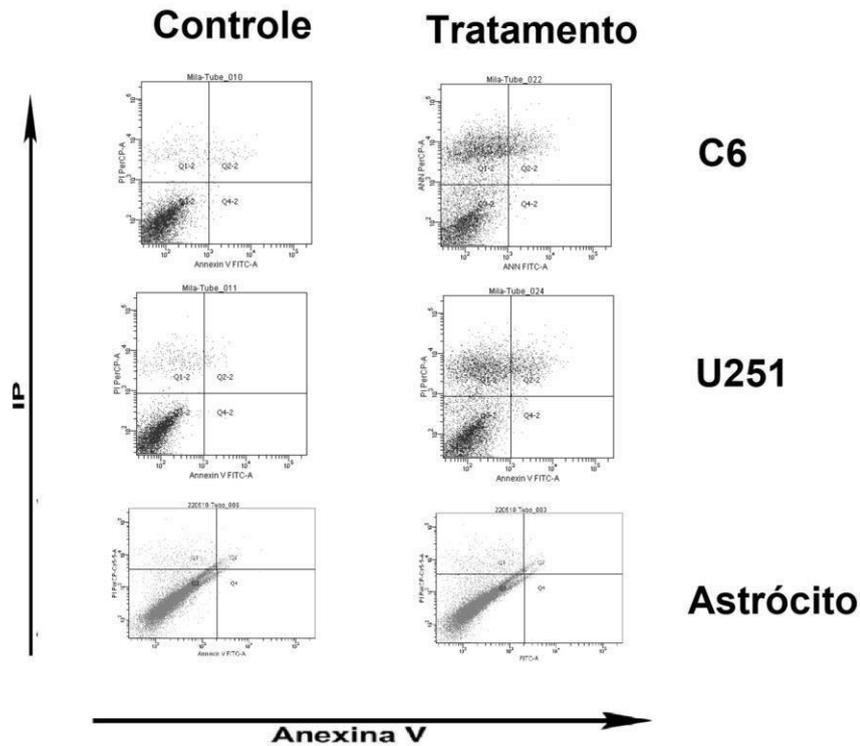


Figura 72. Avaliação do tipo de morte celular promovida pelo tratamento (72 horas) a proteína fosfolipase A₂ básica a 30 µg/mL em comparação com o tratamento apenas com o veículo da droga (PBS). A morte da maioria das células tumorais ocorre por necrose (quadrante superior esquerdo), mas um percentual de células morreu por apoptose tardia (quadrante superior direito). Os astrócitos mantiveram-se viáveis após o tratamento com a concentração utilizada (quadrante inferior esquerdo).

Tabela 4. Mediana dos percentuais e variações de células C6, U251 e astrócitos marcadas com anexina V e IP após 72 horas de tratamento com a fosfolipase A₂ básica a 30 µg/mL

	C6 (controle)	C6 (tratamento)	U251 (controle)	U251 (tratamento)	Astrócitos (controle)	Astrócitos (tratamento)
Viáveis	96,30 (94,90-97,30)	57,85 (55,00-60,50)	96,50 (95,30-97,20)	62,85 (60,00-65,40)	94,10 (92,50-95,80)	93,60 (91,00-94,70)
Apoptose inicial	0,10 (0,00-0,30)	0,55 (0,10-1,50)	0,10 (0,00-0,30)	0,55 (0,10-1,50)	0,95 (0,30-1,50)	1,75 (0,80-2,20)
Apoptose tardia	0,80 (0,40-1,20)	6,65 (3,90-13,10)	1,10 (0,20-1,50)	8,50 (4,00-12,70)	1,35 (0,80-2,20)	1,40 (1,20-1,90)
Necrose	2,65 (1,80-4,50)	33,20 (30,00-37,00)	2,50 (2,20-3,30)	29,20 (23,80-31,20)	3,25 (2,20-4,80)	3,95 (2,40-5,20)

5. DISCUSSÃO

O câncer é considerado um problema de saúde pública, de acordo com a organização mundial de saúde, especialmente para glioma, neoplasia para a qual ainda não existe tratamento eficaz. As toxinas do veneno de serpentes são bem conhecidas por seus profundos efeitos fisiológicos, mas também possuem um enorme potencial na concepção e desenvolvimento de novas drogas. Proteínas e peptídeos isolados, bem como o veneno total de diferentes espécies de serpentes já demonstraram um marcante efeito antitumoral, graças à habilidade de interagir seletivamente com receptores de membranas inibindo diferentes etapas relacionadas ao crescimento e progressão do tumor (CALDERON et al., 2014).

A pesquisa conduzida e explanada através deste manuscrito teve como ponto inicial a dosagem proteica do veneno total de *Bothrops leucurus* demonstrando que aproximadamente 84% do veneno (com variação de 78% a 86%) é constituído por proteínas, valor próximo ao encontrado por LIRA DA SILVA (2001) em seu trabalho, que foi de 89,9%, utilizando o mesmo método.

A citotoxicidade do veneno total foi avaliada para as linhagens tumorais C6 (glioma de rato) e U251 (glioblastoma humano) demonstrando atividade antitumoral relevante e dependente de concentração. As linhagens tumorais supracitadas são utilizadas há décadas como modelos experimentais para o desenvolvimento de pesquisas relacionadas às células da glia. São linhagens derivadas de astrócitos pouco diferenciados, apresentando morfologia predominantemente fusiforme e capacidade elevada para síntese de compostos intra e extracelulares, alguns destes fundamentais para a sua rápida proliferação. Ademais, possuem a particularidade de serem incapazes de entrar no estado G0 do ciclo celular (DIETRICH et al., 1982; GILDERSLEEVE et al., 1989).

Para avaliar a citotoxicidade em células normais do SNC foram utilizados astrócitos derivados de ratos neonatos como células controle. No Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular existem dois protocolos devidamente consolidados para isolamento astrocitário, o protocolo denominado 1 neste manuscrito, teve como base o método de Cookson e Pentreath (1994) adaptado pela equipe, com troca de

meio e retirada mecânica da microglia de 48 em 48 horas. O protocolo alcunhado 2 neste manuscrito, por sua vez, permitia um contato maior com a microglia, já que após lançamento da cultura primária só há retirada da microglia após sete dias através de agitação por 3 horas utilizando uma câmara incubadora com agitação orbital (Shaker), sem troca de meio durante o período supracitado. Os testes de citotoxicidade com os astrócitos derivados dos diferentes protocolos para isolamento foram conduzidos empregando os mesmos parâmetros utilizados no tratamento das células da linhagem tumoral C6. Os astrócitos derivados do isolamento pelo protocolo 2 exibiram uma maior resistência ao veneno em comparação aos astrócitos do protocolo 1.

Sabe-se que no SNC, as duas populações celulares que são capazes de reagir a injúrias causadas aos neurônios, seja alterando suas morfologias seja modificando os padrões de expressão de fatores neurotróficos e/ou neurotóxicos, ou ainda, a associação desses dois fenômenos, são os astrócitos e a microglia (STREIT et al., 1999). Já é conhecido que os astrócitos influenciam algumas atividades da microglia e vice-versa, principalmente no que se refere à produção de substâncias, como citocinas, por exemplo. Assim como os astrócitos, as células microgliais assumem várias aparências morfológicas que podem ser correlacionadas a estágios funcionais distintos. Tais alterações morfológicas e/ou funcionais destas células caracterizam sua reatividade, num fenômeno conhecido como microgliose. Estas células podem facilitar a sobrevivência dos neurônios, pela secreção de substâncias neurotróficas e ativação dos astrócitos (GIULIAN et al., 1994). Sendo células imunoefetoras do SNC, a microglia e os astrócitos podem se tornar altamente reativos frente a situações de injúria. Logo, é possível inferir que o contato prolongado com a microglia juntamente com a espoliação de nutrientes proporcionada pela falta de uma troca de meio periódica sofrida pelos astrócitos isolados pelo protocolo 2, favoreceu a resistência dos mesmos frente a modulação utilizando o veneno total, em comparação aos astrócitos obtidos através do protocolo 1. Cabe ressaltar que a observação através de microscopia de contraste de fase também evidenciou uma quantidade superior de astrócitos retraídos e exibindo prolongamentos isolados através do protocolo 2, característica relacionada com ativação astrocitária *in vitro*.

Fisiologicamente *in vivo* as células tumorais também podem entrar em contato com a microglia, culminando com que a última reaja ativamente ao tumor, apesar de não estar bem determinada se essa resposta representa uma defesa ativa ao câncer ou mecanismo de apoio ao mesmo (WEI, GABRUSIEWICZ, HEIMBERGER, 2013). Uma vez que as células tumorais deste experimento não foram co-cultivadas com células da microglia e a partir dos resultados com os astrócitos nos quais é possível deduzir uma interferência relevante da microglia frente à modulação com o veneno, o protocolo 1 foi o método escolhido para obtenção de astrócitos para os ensaios de citotoxicidade posteriores.

A comparação dos valores de EC_{50} após tratamento com o veneno total em células C6 e astrócitos demonstrou uma maior susceptibilidade das células tumorais ao tratamento, resultado corroborado através da observação celular por microscopia de contraste de fase. A partir da concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ é possível observar a diminuição da densidade celular e a mudança morfológica das células da linhagem C6, que de fusiforme passam a ter uma morfologia arredondada, enquanto que para os astrócitos submetidos a mesma concentração ainda é possível observar uma monocamada celular homogênea e confluenta de células poligonais planas e achatadas, havendo diminuição da celularidade a partir da concentração de 6 $\mu\text{g/mL}$ do veneno.

O veneno total foi posteriormente testado na linhagem de células de glioblastoma humano (U251), demonstrando ação antitumoral dependente de concentração, resultado corroborado através da observação celular por microscopia de contraste de fase. É possível observar uma diminuição da celularidade a partir da concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$, com mudança de morfologia celular para arredondadas. A comparação dos valores da EC_{50} das diferentes células utilizadas demonstrou que as células tumorais são mais sensíveis ao tratamento com o veneno total do que os astrócitos e que células da linhagem C6 são mais susceptíveis ao veneno em comparação com a linhagem de glioblastoma humano. Entretanto, já existem resultados na bibliografia que demonstram que linhagens de tumores de rato são de fato mais sensíveis a drogas que linhagens de tumores humanos (WOLFF et al., 1999). O tipo de morte foi avaliado, demonstrando que na concentração utilizada de 3 $\mu\text{g/mL}$ as células tumorais morrem por necrose e corroborou com os achados

prévios demonstrando que de fato as células tumorais são mais susceptíveis ao tratamento com o veneno que células normais do SNC, que permaneceram viáveis após modulação com a concentração utilizada. Os resultados entraram em consonância com a bibliografia disponível, que demonstram uma maior toxicidade de venenos totais para células neoplásicas em relação a células normais (BRAGANÇA et al., 1967; LIPPS et al, 1999). Esta habilidade dos venenos de serpentes agirem em células tumorais é conhecida há muito tempo e é associada com sua elevada especificidade e afinidade por células e tecidos. CHIAM-MATYAS e OVADIA, em 1987, demonstraram propriedades citotóxicas de diversos venenos totais de serpentes da família *Viperidae* com efeitos líticos em células tumorais de melanoma maligno. DA SILVA e colaboradores (2002) demonstraram efeito antitumoral em células de tumor ascítico de Ehrlich utilizando o veneno total de *Bothrops jararaca* associado com a supressão de citocinas como IL-6, TNF- α e IL-10. Não havia, entretanto, trabalhos que explanassem o potencial antitumoral do veneno total de *Bothrops leucurus*, especialmente para gliomas. A partir dos resultados obtidos com o veneno total, a pesquisa teve como objetivo avaliar a presença de proteínas e peptídeos que exibissem ação antitumoral seletiva.

As propriedades fisiológicas das toxinas de veneno estão intrinsecamente relacionadas com a captura de presas, por isso as diferenças nas presas fazem com que diferentes venenos sejam selecionados por pressões evolutivas. A evolução molecular e a diversificação dessas toxinas é um processo particularmente rápido e dinâmico para o qual os mecanismos subjacentes ainda estão sendo desvendados. Algumas enzimas presentes em venenos de serpentes não conservam sua atividade ancestral, perdendo sua atividade enzimática devido a mutações em sua sequência de aminoácidos. As proteínas e peptídeos desenvolvem novas funções por acumulação de mudanças na cadeia de aminoácidos. As mutações além de contribuírem para as toxinas adquirirem novas funções, também são responsáveis por modificá-las de forma que estas proteínas tornam-se mais seletivas a alvos mais específicos (JENNER, UNDHEINM, 2017).

O veneno foi fracionado através da cromatografia por exclusão molecular e as frações foram avaliadas quanto ao teor protéico. As frações foram então submetidas ao processo de eletroforese em gel de poliacrilamida, evidenciando que

ainda não haviam proteínas puras, sendo necessárias novas etapas cromatográficas. A citotoxicidade das frações foi testada para células de glioma de rato e astrócitos, sendo evidenciada uma citotoxicidade dependente de concentração para a linhagem tumoral, sem, no entanto, afetar os astrócitos, após o tratamento com as frações 1 e 4. Estas frações foram submetidas a sucessivas etapas cromatográficas com o intuito de purificar as proteínas presentes.

Uma protease já havia sido evidenciada por zimografia na fração 1 proveniente da cromatografia por exclusão molecular do veneno total, com massa molecular compreendida entre 45 kDa e 66,2 kDa. Através da técnica imunoenzimática de *Western Blotting* foi evidenciada a presença de uma metaloprotease P-III de aproximadamente 55 kDa em condições redutoras, característica que sugeriu através da pesquisa em manuscritos previamente publicados que a proteína presente nessa fração tratava-se da leucurolisina-b. A proteína da fração 1 foi então purificada através de três etapas cromatográficas e sua identificação foi confirmada por espectrometria de massa como sendo de fato a metaloprotease hemorrágica da classe P-III denominada leucurolisina-b. A leucurolisina-b foi purificada previamente por Sanchez e colaboradores (2007) e uma caracterização parcial da sua função e estrutura foi elucidada, demonstrando uma metaloprotease P-III hemorrágica (~55 kDa), dependente de zinco, apresentando uma estrutura de múltiplos domínios, incluindo um domínio metaloproteinase, uma desintegrina-*like* (sequência ECD em vez da sequência típica RGD) e um domínio C-terminal rico em cisteína. Esta proteína, após tratamento com EDTA, perde sua atividade enzimática. Os resultados também mostraram que essa proteína exibe intensa atividade proteolítica em diversas moléculas da matriz extracelular, o que pode estar intrinsecamente relacionado com sua ação hemorrágica.

Os ensaios de redução de MTT utilizando a leucurolisina-b deixaram claro que a proteína apresenta um efeito citotóxico que exibiu seletividade para as células tumorais usadas no modelo, e dentre estas, para a de origem humana. O tipo de morte foi investigado, e percebeu-se que a leucurolisina-b pode induzir apoptose, característica apontada pela literatura corrente como indicativa de potencial antitumoral (CALL et al., 2008). Gabriel e colaboradores (2012) testaram a leucurolisina-b em três linhagens celulares de glioblastoma (RT2, T98 e U87), uma

linhagem celular de carcinoma ascítico de Erlich, uma linhagem celular de melanoma e uma linhagem celular de carcinoma mamário. As células tratadas com leucurolisina-b demonstraram condensação da cromatina, fragmentação do DNA, ruptura da membrana plasmática e formação de corpos apoptóticos, demonstrando que possivelmente a toxina provoca um mecanismo apoptótico celular e possui um elevado poder citotóxico nas células testadas, com valores de EC_{50} em um alcance micromolar (0,2-0,6 μ M). O estudo realizado e explanado neste manuscrito corroborou com os dados apresentados pelo artigo previamente citado, confirmando que de fato a leucurolisina-b possui um efeito citotóxico relevante para linhagens de glioma e a morte celular é ocasionada principalmente por apoptose. Ademais, este estudo demonstrou que a proteína possui citotoxicidade para linhagens celulares não testadas no trabalho supracitado, o que demonstra seu efeito citotóxico para uma ampla gama de linhagens celulares tumorais, característica imprescindível para um fármaco eficaz. O estudo aqui explanado também possui um dado fundamental: a citotoxicidade seletiva da leucurolisina-b, que não foi capaz de afetar a viabilidade dos astrócitos, algo que não havia sido demonstrado em nenhuma publicação anterior.

O mecanismo de ação desta citotoxicidade seletiva foi investigado, mas a revisão bibliográfica aponta que provavelmente a leucurolisina-b interage com integrinas da membrana celular de tumores (GABRIEL et al., 2012). A expressão de integrinas pode variar consideravelmente entre tecido normal e tumores (MACEDO; FOX; CASTRO, 2015). As integrinas raramente sofrem mutação nos tumores. Elas não atuam como oncogenes, mas podem cooperar com os mesmos para favorecerem a tumorigênese, seja por expressão particular e / ou localização em células tumorais em comparação com células normais, por modificações pós-traducionais ou via reciclagem de integrinas. Por exemplo, existe um aumento na expressão das integrinas $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 6$ e $\alpha v\beta 3$ em tipos diferentes de tumor, entre eles o glioblastoma. As integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$, em especial, são alvos terapêuticos atrativos em glioblastoma, uma vez que não são expressas em células normais cerebrais (MALRIC et al., 2017). Muitas metaloproteases provenientes de venenos de serpentes demonstraram potencial antitumoral relevante (WAN et al., 2006), bem como domínios desintegrinas de metaloproteases testadas em células de glioma *in vivo* e *in vitro* com boa resposta antitumoral e tolerância pelos animais, além do

prolongamento da sobrevivência dos mesmos (PYRKO et al., 2005). As metaloproteases, embora estruturalmente diferentes, requerem sequências de reconhecimento aproximadamente semelhantes para se ligarem às integrinas. Essas proteínas possuem em comum um resíduo de ácido aspártico ou de ácido glutâmico exposto, geralmente, em dobras estendidas e flexíveis. Das sequências de aminoácidos que contêm ácido aspártico capazes de se ligarem às integrinas, a mais frequente e mais estudada delas é a sequência *arginina – glicina – ácido aspártico* (*Arg-Gly-Asp* ou *RGD*) também conhecida como — *sítio universal de reconhecimento celular* (HAUBNER, FINSINGER & KESSLER, 1997; XIONG et al, 2002). Entretanto, outras sequências também podem ser reconhecidas pelas integrinas, tais como ECD. O domínio desintegrina-*like* (ECD), presente na leuc-b, consegue se ligar a integrinas da superfície celular e inibir sua aderência aos seus ligantes naturais (GABRIEL et al., 2010). Os receptores de integrina participam de várias funções relacionadas ao metabolismo celular, incluindo prevenir um processo de morte por apoptose desencadeado por uma desadesão das células à matriz extracelular. Dito isto, antagonistas de integrina podem desencadear uma via de sinalização por apoptose (BONFOCO et al., 2000), investigada através deste experimento. É possível que os demais domínios presentes na proteína interajam com as células tumorais através de outros receptores de membrana ocasionando a morte por necrose observada, suposição que deverá ser elucidada em pesquisas futuras.

GABRIEL (2010) utilizou a leucurolisina-b como protótipo de radiofármaco antitumoral administrada via endovenosa em animais com tumor de Ehrlich com o intuito de averiguar a biodistribuição e interação com tumores *in vivo* e demonstrou que existe uma baixa captação da molécula pelo cérebro o que indica que a proteína dificilmente atravessa a barreira hemato-encefálica, dificultando sua utilização para o tratamento sistêmico de tumores cerebrais. Entretanto, a utilização de nanovetores como lipossomas para o encapsulamento da proteína pode surgir como uma alternativa para driblar efetivamente este problema. Estas moléculas têm características lipofílicas que lhes permitem atravessar a barreira hemato-encefálica, com a vantagem de reduzir os efeitos tóxicos da molécula encapsulada (FREITA; FREZARD, 1997).

A fração 4, por sua vez, também demonstrou atividade anticancerígena seletiva, apesar de não ser tão potente quanto a demonstrada pela fração 1. A identificação da proteína foi realizada por análise através da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas LC-MS/MS e utilizando dois softwares especializados (MASCOT e PEAKS) frente a um banco de dados que combina sequências de proteínas publicamente disponíveis, com o banco de dados público derivado do *animal toxin annotation program* (<http://www.uniprot.org/program/toxins>). A proteína presente na fração 4 foi identificada como uma fosfolipase A_2 básica isolada através de sucessivas etapas cromatográficas, evidenciando uma proteína com massa molecular entre 14 kDa e 22 kDa por eletroforese em gel de poliacrilamida. A identificação através de espectrometria de massas demonstrou se tratar de uma fosfolipase previamente purificada e parcialmente caracterizada por HIGUCHI e colaboradores (2007).

As fosfolipases A_2 desempenham um importante papel em diversos eventos biológicos como sinalização e crescimento celular, geração de mediadores lipídicos pró-inflamatórios como prostaglandina e leucotrienos (RODRIGUES et al, 2009). Existem trabalhos demonstrando a ação citotóxica de diversas PLA_2 provenientes de venenos ofídicos em diferentes linhagens celulares tumorais (CHWETZOFF et al, 1989; NEWMAN et al., 1993; RUDD et al, 1994; KHUNSAP et al, 2011), incluindo PLA_2 provenientes de peçonhas do gênero *Bothrops* (ROBERTO et al, 2004). Apesar de já existirem PLA_2 ácidas e básicas isoladas e caracterizadas do veneno de *B. leucurus* (NUNES et al, 2011; MARANGONI et al, 2013; HIGUCHI et al, 2006), não há publicações evidenciando sua ação citotóxica para células tumorais de gliomas.

A citotoxicidade da fosfolipase A_2 foi evidenciada em ambas as linhagens celulares tumorais e foi dependente de concentração, sem, no entanto, afetar a viabilidade dos astrócitos, com morte ocasionada por necrose, entretanto uma parte das células morre por apoptose tardia. O mecanismo de ação da citotoxicidade desta proteína em linhagens tumorais não foi elucidado neste manuscrito.

Os estudos extensivos sobre o papel das PLA_2 provenientes de venenos de serpentes na morte celular postularam que através de concentrações elevadas da toxina, as células morrem por necrose (inchaço de célula e organela, depleção de adenosina trifosfato, aumento de permeabilidade da membrana plasmática,

libertação de macromoléculas e inflamação); a toxina em concentrações inferiores provoca apoptose (processo dependente de adenosina trifosfato, caracterizada por encolhimento celular, condensação de cromatina, formação de *blebbing* de membrana de plasma e ativação de caspase); e em concentrações ainda mais baixas, as células proliferam (sintetizam mediadores inflamatórios) (DOUMANOV et al., 2014).

A atividade enzimática da PLA₂ na membrana fosfolipídica resulta em efeitos no interior das células tal como dano da membrana, perturbação de proteína ligada à membrana e perturbações funcionais da cascata celular (CHAIKUL et al., 2016). Entretanto, a substituição de aminoácidos nessa proteína através do processo denominado “evolução acelerada” pode alterar a especificidade de alvos para diversos tecidos ou células, o que resulta em efeitos farmacológicos distintos (KINI; CHAN, 1999). De fato, trabalhos demonstram que as PLA₂ podem interagir com outras proteínas alvo localizadas em bicamadas fosfolipídicas como um mecanismo alternativo de toxicidade que não envolve a hidrólise de fosfolípidos. Assim, a toxicidade não catalítica induzida por algumas PLA₂ de veneno de serpente pode ser regulada por regiões moleculares distintas (GASANOV; DAGDA;RAEL, 2014).

Doumanov e colaboradores (2014) investigaram a toxicidade da PLA₂ isolada do veneno da serpente *Vipera ammodytes meridionalis* em quatro tipos celulares causando diferentes tipos de resposta dependente da concentração da proteína, especificidade de fosfolípido, composição da membrana celular, organização e propriedades inerentes ao tipo celular.

As PLA₂ de venenos de serpentes também podem interagir com integrinas da membrana de células tumorais. A fosfolipase MVL-PLA₂ proveniente do veneno da serpente *Macrovipera lebetina* transmediterrânea apresenta ação inibitória em algumas linhagens de células tumorais com perda de adesão celular em concentrações acima de 2 µM, tendo sido demonstrado que este efeito antitumoral foi mediado por α5β1 e algumas outras integrinas que possuem a subunidade αv (BAZAA et al., 2010).

Estes fenômenos têm intrigado toxineiros por décadas uma vez que parece não haver correlação entre a estrutura e função ou função enzimática com a

ação farmacológica exibida por PLA₂ de venenos de serpentes (GASANOV; DAGDA; RAEL, 2014).

É possível que apesar da ação antitumoral específica exibida pelas proteínas supracitadas ser um dado promissor e digno de mais estudos, a seletividade apresentada pela barreira hemato-encefálica (BHE), essencial para proteger o cérebro de toxinas sistêmicas e manter o nível necessário de nutrientes e íons para a função neuronal (ALMUTAIRI et al., 2016), se apresente como um entrave para investimentos futuros. Entretanto, além do encapsulamento em nanoveículos lipossomais citados anteriormente, existe a possibilidade da administração da droga por injeção direta na região tumoral, mecanismo realizado por PYRKO e colaboradores (2005) com a desintegrina denominada contortostatina. Apesar de pouco utilizada clinicamente por conta da natureza invasiva da administração e da necessidade do conhecimento da localização exata do tumor, é uma via relevante na qual será possível determinar alterações no perfil de distribuição e captação dos fármacos, bem como avaliar a possibilidade da fabricação de fármacos para aplicação tópica, que possam agir mais intensamente e localmente (LAMMERS, et al, 2006). Estas alternativas surgem com o intuito de complementar os achados neste manuscrito e demonstrar perspectivas para experimentos futuros.

6. CONCLUSOES

Sumariamente, da coleção de dados apresentada, as principais conclusões a que se pode chegar são de que:

- O veneno total exibe um efeito citotóxico mais relevante para as células tumorais utilizadas neste experimento (C6 e U251), induzindo alterações morfológicas e diminuição da densidade celular dependente da concentração e apresentando morte por necrose;
- A proteína purificada denominada leucurolisina-b possui atividade antitumoral induzindo principalmente apoptose em baixas concentrações, mostrando ainda ação seletiva para células de glioma quando comparada com astrócitos normais, dado não apresentado por estudos previamente divulgados;
- A fosfolipase A₂ básica purificada também exibiu atividade antitumoral seletiva para células de glioma, entretanto a morte das células tumorais ocorreu por necrose, embora parte das células morram por apoptose tardia. Não existem manuscritos avaliando a citotoxicidade dessa toxina para gliomas.

Por fim, não cabe subestimar o potencial que os resultados explanados possuem de promover um avanço real no tratamento de uma doença com histórico de falhas terapêuticas. Existe uma perspectiva de aprofundamento dos testes com as proteínas purificadas a fim de que se chegue ao melhor protótipo para possível melhoramento químico e elucidação do mecanismo de ação para início de testes em modelos *in vivo*. Caso os mesmos confirmem a marcante atividade antitumoral aqui proposta, justificarão ensaios clínicos controlados na tentativa de desenvolver um novo produto biotecnológico de grande impacto tanto para os pacientes quanto para a ciência brasileira.

REFERÊNCIAS

- ALMUTAIRI, M. M. *et al.* Factors controlling permeability of the blood-brain barrier. ***Cellular and Molecular Life Sciences***, v. 73, n. 1, p. 57-77, 2016.
- BAZAA, A. *et al.* MVL-PLA2, a phospholipase A2 from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits tumor cells adhesion and migration. ***Matrix Biology***, v. 28, n. 4, p. 188-193, 2009.
- BARNETT, G. C.; WEST, C. M.; DUNNING, A. M. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. ***Nature Reviews Cancer***, v. 9, n. 2, p. 134-142, 2009.
- BENDA, P. *et al.* Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. ***Science***, v. 161, n. 3839, p.370–371. 1968.
- BEIER, D. *et al.* Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. ***Cancer Research***, v. 68, n. 14, p. 5706-5715, 2008.
- BONFOCO, E. *et al.* β 1 integrin antagonism on adherent, differentiated human neuroblastoma cells triggers an apoptotic signaling pathway. ***Neuroscience***, v. 101, n. 4, p. 1145-1152, 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Analytical Biochemistry***, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAGANÇA, B. M.; PATEL, N. T.; BRADINATH, P. G. Isolation and properties of a cobra venom factor selectively cytotoxic to Yoshida sarcoma cells. ***Biochimica et Biophysica Acta***, v.136, n.3, p. 508–520, 1967.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6ª ed. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2ª ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.
- CALDERON, L. A. *et al.* Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. ***BioMed Research International***, v. 2014, p. 1-19, 2014.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. ***Revista da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência***, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.
- CALL, J. A.; ECKHARDT, S. G.; CAMIDGE, D. R. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. ***Lancet Oncology***, v. 9, n.10, p. 1002-1011, 2008.
- CALVETE, J. J. The continuing saga of snake venom disintegrins. ***Toxicon***, v. 62, p. 40–49, 2013.

- CALVETE, J. J. *et al.* Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, v. 583, n. 11, p. 1736–1743, 2009.
- CARVALHO, D. D. *et al.* Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1471-1476, 2001.
- CHAIM-MATYAS, A.; OVADIA, M. Cytotoxic activity of various snake venom on melanoma B16F10 and chondrosarcoma, **Life Sciences**, v.40, n.16, p.1601-1607, 1987.
- CHESLER, D. A.; BERGER, M. S.; QUINONES-HINOJOSA, A. The potential origin of glioblastoma initiating cells. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p. 190 – 205, 2013.
- CHAIKAKUL, J. *et al.* Effects of Animal Venoms and Toxins on Hallmarks of Cancer. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 11, p. 1571-1578, 2016.
- CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991.
- CHWETZOFF, S. *et al.* A. Nigexine, a phospholipase A2 from cobra venom with cytotoxic properties not related to esterase activity. Purification, amino acid sequence, and biological properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 22, p. 13289–13297, 1989.
- COOKSON, M. R.; PENTREATH, V. W. Alterations in the glial fibrillary acidic protein content of primary astrocyte cultures for evaluation of glial cell toxicity. **Toxicology In Vitro**, v. 8, n. 3, p. 351-359, 1994.
- CUNHA, E. M.; MARTINS, O. A. Principais compostos químicos presentes nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – Uma revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v. 2, n. .2, p. 21-26, 2012.
- CUSHMAN, D. W., ONDETTI, M. A., History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension**, v. 17, n. 4, p. 589-592, 1991.
- DA SILVA, R., J. *et al.* Cytokine profile of Ehrlich ascites tumor treated with *Bothrops jararaca* venom. **Mediators of Inflammation**, v. 11, n. 4, p. 197–201, 2002.
- DESJARDINS, P.; HANSEN, J. B.; ALLEN, M. Microvolume protein concentration determination using the NanoDrop 2000c spectrophotometer. **Journal of Visualized Experiments**. v. 33, p. 1610, 2009.
- DENNIS, E. A. Diversity of Group Types, Regulation, and Function of Phospholipase A₂. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 18, p. 13057-13060, 1994.
- DIETRICH, C. P. *et al.* Turnover, change of composition with rate of cell growth and effect of phenylxyloside on synthesis and structure of cell surface sulfated glycosaminoglycans of normal and transformed cell. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 717, n. 3, p. 387–397, 1982.

- DOETSCH, F. The glial identity of neural stem cells. **Nature Neuroscience**, v. 6, n. 11, p. 1127-1134, 2003.
- DOUMANOV, J. *et al.* Interactions of pharmacologically active snake venom sPLA2 with different cell lines **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 28, n. 5, p. 918-922, 2014.
- DU, X.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659–665, 2002.
- EL-BACHÁ, R. S. *et al.* Glucuronidation of apomorphine. **Life Sciences**, v. 67, n.14, p. 1735-1745, 2000.
- ESCOUBAS, P. Mass spectrometry in toxinology: a 21st-century technology for the study of biopolymers from venoms. **Toxicon**, v. 47, n. 6, p. 609-13, 2006.
- FERNANDEZ, J. H.; NESHICH, G.; CAMARGO, A.C. Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. **Genetics and Molecular Research**, v.3, n.4, p. 554-563, 2004.
- FREITAS, T., FREZARD, F. Encapsulation of native crotoxin in liposomes: a safe approach for production of antivenom and vaccination against *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, 35, pp. 91-100, 1997.
- FU, J. *et al.* Glioblastoma stem cells resistant to temozolomide-induced autophagy. **Chinese Medical Journal**, v. 122, n. 11, p. 1255-1259, 2009.
- GABRIEL, L. M. *et al.* Tumor cytotoxicity of leucurolysin-B, a P-III snake venom metalloproteinase from *Bothrops leucurus*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 18, n. 1, p. 24–33, 2012.
- GASANOV, S., E.; DAGDA, R., K.; RAEL, E., D. Snake venom cytotoxins, phospholipase A2s, and Zn²⁺- dependent metalloproteinases: mechanisms of action and pharmacological relevance. **Journal of Clinical Toxicology**, v. 4, n. 1, 2014.
- GILDERSLEEVE, D. L. *et al.* Synthesis of a high specific activity I-labeled analog of PK 11195, potential agent for SPECT imaging of the peripheral benzodiazepine binding site. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 16, n. 4, p. 423-429, 1989.
- GIULIAN, D., LI, J.; LEARA, B.; KEENEN, C. Phagocytic microglia release cytokines and cytotoxins that regulate the survival of astrocytes and neurons in culture. **Neurochemistry International**, v.25, n.3, p. 227-233, 1994.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 1 – 29, 2011.
- HAUBNER, R., FINSINGER, D. KESSLER, H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha\beta 3$ integrin for a new cancer therapy. **Angewandte Chemie e Angewandte Chemie International**, v. 36, p. 1374-1389, 1997.

HIGUCHI, D. A. *et al.* Leucurogin, a new recombinant disintegrin cloned from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) with potent activity upon platelet aggregation and tumor growth. **Toxicon**, v. 58, n. 1, p. 123–129, 2011.

HUSE, J. T; HOLLAND, E. C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. **Nature Reviews Cancer**, v. 10. p. 319–331, 2010.

INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp/>. Acesso em: 21 de junho de 2018.

JAIN, D.; KUMAR, S. Snake venom: a potent anticancer agent. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 10, p. 4855-4860, 2012.

KANG, T. S. *et al.* Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**, v. 278, n. 23, p. 4544–4576, 2011.

KAUP, B. *et al.* Time-dependent inhibition of glioblastoma cell proliferation by dexamethasone. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 51, n. 2, p. 105–110, 2001.

KHUNSAP, S. *et al.* Purification of a phospholipase A(2) from *Daboia russelii siamensis* venom with anticancer effects. **Journal of Venom Research**, v. 2, p. 42-51, 2011.

KIM, E. H. *et al.* Roscovitine sensitizes glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by downregulation of survivin and XIAP. **Oncogene**, v. 23, n. 2, p. 446–456, 2004.

KINI, R. M.; CHAN, Y. M. Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A2 enzymes. **Journal of Molecular Evolution**, v.48, n. 2, p. 125-132, 1999.

KLEIHUES, P.; CAVENEE, W. Pathology and genetics of tumors of the nervous system. Lyon: IARC Press, 2000.

JENNER, R.; UNDHEIM, E. The Secrets of Nature's Deadliest Weapon. Ed. Paperback. 208 p., 2017.

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

LAI, D.; VISSER-GRIEVE, S.; YANG, X. Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response. **Bioscience Reports**, v. 32, p. 361-374, 2012.

LAMMERS, T. *et al.* Effect of intratumoral injection on the Biodistribution and the therapeutic potential of HPMA copolymer-Based drug delivery systems. **Neoplasia**, 8, pp. 788-795, 2006.

LEE, M. L. *et al.* King Cobra (*Ophiophagus hannah*) Venom L-Amino Acid Oxidase Induces Apoptosis in PC-3 Cells and Suppresses PC-3 Solid Tumor Growth in a Tumor Xenograft Mouse Model. **International Journal of Medical Sciences**, v. 11, n.6, p. 593-601, 2014.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências**. Ed. Atheneu. São Paulo. p. 89-94, 2005.

LIPPS, B. V. Novel snake venom proteins cytolytic to cancer cells *in vitro* and *in vivo* systems ***Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases***, v. 5, n. 2, p. 173–183, 1999.

LIRA DA SILVA, R. M. . **Estudo farmacológico do veneno de *Bothrops leucurus* (serpentes; viperidae)**. 182f. il. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

LOUIS, D. N. *et al.* The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. ***Acta Neuropathologica***, v. 114, p. 97– 109, 2007.

LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. ***Journal of biological chemistry***, v.193, p. 265-275, 1951.

LU, C.; SHERVINGTON, A. Chemoresistance in gliomas. ***Molecular and Cellular Biochemistry***, v. 312, p. 71 – 80, 2008.

MACEDO, J. K. A. **Análise da peçonha de *Bothropoides marmoratus*, com ênfase na caracterização de proteínas com atividade antimicrobiana e/ou antitumoral**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas, Fundação Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

MACEDO, J. K. A.; FOX, J. W.; CASTRO, M. S. Disintegrins from snake venoms and their applications in cancer research and therapy. ***Current Protein and Peptide Science***, v. 16, p. 532-548, 2015.

MAHER, E. A. *et al.* Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. ***Genes & Development***, v. 15, p. 1311-1333, 2001.

MALRIC, L. *et al.* A. Interest of integrins targeting in glioblastoma according to tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: an update. ***Oncotarget***, v. 8, n. 49, p. 86947-86968, 2017.

MANGINI, J., LI, N., BHAWAN, J., Immunohistochemical markers of melanocytic lesions: a review of their diagnostic usefulness. ***American Journal Dermatopathology***, v.24, p. 270-281, 2002.

MARUMOTO, T.; SAYA, H. Molecular Biology of Glioma. ***Advances in Experimental Medicine and Biology***, v. 746, p. 2–11, 2012.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C. *et al.* (Orgs.) **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.

MORJEN, M. *et al.* Matrix PIVL, a new serine protease inhibitor from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, impairs motility of human glioblastoma cells. ***Biology***, v. 32, n. 1, p. 52–62, 2013.

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

MOURA-DA-SILVA, A. M. *et al.* Processing of pro-tumor necrosis factor- alpha by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **European Journal of Immunology**. v. 26, n. 9, p. 2000-2005, 1996.

NATSUME, A. *et al.* IFN-beta down-regulates the expression of DNA repair gene MGMT and sensitizes resistant glioma cells to temozolomide. **Cancer Research**, v. 65, n. 17, p. 7573–7579, 2005.

NAUMANN, G. B. *et al.* Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, n. 7, p. 683–694, 2011.

NIYAZI, M. *et al.* Therapeutic options for recurrent malignant glioma. **Radiotherapy and Oncology**, v. 98, p. 1-14, 2011.

NUNES, E. S. *et al.* Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**, v. 59, n. 7-8, p. 667-671, 2012.

PAINE, M. J. *et al.* Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. **Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 32, p. 22869- 22876, 1992.

PANFOLI, I. *et al.* Inhibition of hemorrhagic snake venom components: old and new approaches. **Toxins**, v. 2, p. 417-427, 2010.

PEREIRA-BITTENCOURT, M. *et al.* The effect of a lectin from the venom of the snake, *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation. **Anticancer Research**, v. 19, n. 5B, p. 4023–4025, 1999.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

PUNG, Y. F. *et al.* Ohanin, a novel protein from king cobra venom, induces hypolocomotion and hyperalgesia in mice. **Journal of Biological Chemistry**. v.280, p.13137–13147, 2005.

PYRKO, P. *et al.* The role of contortrostatin, a snake venom disintegrin, in the inhibition of tumor progression and prolongation of survival in a rodent glioma model. **Journal of Neurosurgery**, v. 103, p. 526–537, 2005.

RIBEIRO, L. A; JORGE, M. T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 475-480, 1997.

RIBEIRO-SILVA, A.; ZUCOLOTO, S. O papel do vírus Epstein-Barr na tumorigênese humana. **Medicina**, v. 36, p. 16–23, 2003.

RIVOIRE, W. A. *et al.* Bases biomoleculares da oncogênese cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, p. 179 – 184, 2001.

ROBERTO, P. G. *et al.* Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* venom. **Protein Journal**, v. 23, n. 4, p. 273–285, 2004.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. Fundamentos de Robbins patologia estrutural e funcional. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

SANCHEZ, E. F. *et al.* Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 468, n.2, p.193-204, 2007.

SANTOS, B. L. **Avaliação do potencial antitumoral de flavonóides polihidroxilados sobre células de glioblastoma humano**. 145f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

SANTOS, M. M. V. *et al.* Antitumoural effect of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 102, n. 6, p. 533–542, 2008.

SARRAY, S. *et al.* Lebectin, a novel C-type lectin from *Macrovipera lebetina* venom, inhibits integrin-mediated adhesion, migration and invasion of human tumour cells. **Laboratory Investigation**, v. 84, n. 5, p. 573–581, 2004.

SCHWARTZBAUM, J. A. *et al.* Epidemiology and molecular pathology of glioma. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 2, p. 1 – 10, 2006.

SILVA, A. R. *et al.* The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures. **Cell Biology and Toxicology**, v.24, p. 75-86, 2008.

SOUSA, J. R. *et al.* Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. **Toxicon**, v. 39, n. 6, p. 787- 792, 2001.

SPANOA, D. *et al.* Molecular networks that regulate cancer metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, p. 234 – 249, 2012.

STREIT, W. J.; WALTER, S. A.; PENNELL, N. A. Reactive microgliosis. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 6, p. 563-581, 1999.

STUPP, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 10, p. 987–96, 2005.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, n. 1, p. 164-176, 2012.

TAN, N. H.; FUNG, S. Y. Snake venom L-amino acid oxidases. In: MACKESSY, S. P. **Venom and toxins of reptiles**. Boca Raton, CRC press, 2009.

TORRE, L. A. *et al.* A. Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 2, p. 87- 108, 2015.

TRAN, B.; ROSENTHAL, M. A. Review survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 17, p. 417– 421, 2010.

TRIKHA, M.; DECLERCK, Y. A.; MARKLAND, F. S. Contortrostatin, a snake venom disintegrin, inhibits $\beta 1$ integrin- mediated human metastatic melanoma cell adhesion and blocks experimental metastasis. **Cancer Research**, v. 54, n. 18, p. 4993– 4998, 1994.

VAN MEIR, E. G. *et al.* Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. **CA Cancer J Clin**, v. 60, n. 3, p. 166–193, 2010.

VERHEIJ, H. M. *et al.* Correlation of Enzymatic Activity and Anticoagulant Properties of Phospholipase A2. **European Journal Biochemistry**, v. 112, p. 25-32, 1980.

WAN, S. G.; LEE, J., Y.; ZHANG, Y. A snake venom metalloproteinase that inhibited cell proliferation and induced morphological changes of ECV304 cells. **Toxicon**, v. 47, n. 4, p. 480-489, 2006.

WEI, J.; GABRUSIEWICZ, K.; HEIMBERGER, A. The controversial role of microglia in malignant gliomas. **Clinical and Developmental Immunology**, 2013.

WILLIS, R. A. The spread of tumors in the human body. London, Butterworth & Co, 1952.

WOLFF, J. E. *et al.* Chemosensitivity of glioma cells in vitro: a meta analysis. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 125, p. 481-486, 1999.

XIONG, J. T. *et al.* Cristal structure of the exatracelular segment of integrin $\alpha 5\beta 3$ in complex with an Arg-Gly- Asp ligant. **Science**, 296, pp. 1151-155, 2002.

ZHANG, L.; WU, W. T. Isolation and characterization of ACTX-6: a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon acutus* snake venom. **Natural Product Research**, v. 22, n. 6, p. 554–563, 2008.

ANEXO A – Certificado da CEUA



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa de protocolo número **068/2014**, intitulado **“Avaliação do potencial antitumoral e mecanismo de ação de componentes isolados do veneno de *Bothrops leucurus* em linhagem celulares de gliomas”**, sob a responsabilidade do Professor Doutor Ramon dos Santos El-Bachá, lotada no setor de Biofunção do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), está de acordo com as exigências legais atuais para experimentação animal e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) em **12 de setembro de 2014**.

Salvador, 12 de setembro de 2014.

Profª Dra. Tania Tavares Rodriguez

Coordenadora da CEUA-ICS

Profa. Tânia Tavares Rodrigues
Coordenadora da CEUA-ICS
Instituto de Ciências da Saúde - UFBA

CEUA-ICS

Av. Reitor Miguel Calmon S/N . Instituto de Ciências da Saúde . Vale da Canela CEP 40110-100 – Salvador – Bahia – Brasil .

Telefone: 55-(71) 3283-8958 ou (71) 3245-0917 . E-mail: ceuaiscs@ufba.br.

Telefone: (71) 3283-8958