

**Universidade do Vale do Paraíba**  
**Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

**“A Ação do Veneno da *Crotalus durissus terrificus* em Cultura de  
Células Neoplásicas”**

**MARTA FALCÃO NOVAES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

São José dos Campos, SP

2004

**Universidade do Vale do Paraíba**  
**Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

**“A Ação do Veneno da *Crotalus durissus terrificus* em Cultura de Células  
Neoplásicas”**

**Marta Falcão Novaes**

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, como complementação dos créditos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares.

Co-orientador: Prof. Dr. José Carlos Cogo.

São José dos Campos, SP

2004

N816a

Novaes, Marta Falcão

A Ação do Veneno da *Crotalus durissus terrificus* em Cultura de Células Neoplásicas / Marta Falcão Novaes. São José dos Campos: UniVap, 2004.

83 p.: il.; 31cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2004.

1. Venenos de cobra 2. Células neoplásicas cultivadas 3. Microscopia de fluorescência <sup>2</sup>. Soares, Cristina Pacheco, Orient. <sup>22</sup>. Cogo, José Carlos, Co-Orient. <sup>222</sup>. Título

CDU: 616-001.49

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica.

Aluna:

-----  
Marta Falcão Novaes

Data: 02 de Setembro de 2004

**“A Ação do Veneno da *Crotalus durissus terrificus* em Cultura de  
Células Neoplásicas”**

**Marta Falcão Novaes**

**Banca Examinadora:**

**Prof. Dr. Newton Soares da Silva** (UNIVAP)\_\_\_\_\_

**Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares** (UNIVAP)\_\_\_\_\_

**Prof. Dr. André Luís Paschoal** (USP)\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UNIVAP

São José dos Campos, 02 de Setembro de 2004

## Resumo

A citotoxicidade do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*) sobre células neoplásicas foi estudada através de várias técnicas, com o objetivo de avaliar os efeitos deste veneno, tanto o total quanto às frações, sobre o metabolismo celular. Em nossos estudos avaliamos a ação do veneno total da *Cdt* jovem e frações do veneno da *Cdt* adulta sobre cultura de células neoplásicas Hep-2 (carcinoma epidermóide da laringe) após tratamento com concentrações e tempos variados. Medidas por espectrofotometria em 570 nm e por microscopia de fluorescência possibilitaram a aquisição de informações sobre a organização e a dinâmica das estruturas celulares, e também a avaliação sobre a síntese de ATP para verificar a ação do veneno sobre as mitocôndrias, interrompendo desta forma o ciclo celular. Nossos resultados permitem verificar que a cultura celular Hep-2 incubada com concentrações de 0.5, 1 e 5  $\mu$ g/mL do veneno apresentaram um comprometimento da atividade celular, sendo observados danos no núcleo e apoptose pontual.

**Palavras-chave:** *Crotalus durissus terrificus*, Hep-2, Câncer, Cultura celular, MTT, Microscopia de Fluorescência, Luciferin-Luciferase.

## Abstract

The cytotoxicity of the serpent poison *Crotalus durissus terrificus* on the neoplastic cells was studied through several techniques, with the objective of evaluating the effects of this poison, both total and in fractions, on the cellular metabolism. In our studies we evaluated the action of the total poison of young *Cdt* and fractions of the poison of adult *Cdt* on culture of neoplastic cells Hep-2 (larynx epidermoidis carcinoma) after treatment with variations in the concentration and time. Measures using 570nm spectrophotometry and fluorescence microscopy, made possible the information acquisition on the organization and the dynamics of the cellular structures, and, also, the evaluation of ATP synthesis to verify the action of the poison on the mitochondria, interrupting in this way the cellular cycle. Our results allow us to verify that the Hep-2 cellular culture, incubated with concentrations of 0.5, 1 and 5  $\mu$ g/mL of the poison presented the cellular activity compromising, where damages has been observed in the nucleus and punctual apoptosis.

**Keywords:** *Crotalus durissus terrificus*, Hep-2, Cancer, Cellular Culture, MTT, Fluorescence Microscopy, Luciferin-Luciferase.

## ***MÉTODOS***

## ***RESULTADOS***

***DISCUSSÃO***

***CONCLUSÃO***

***ESTUDOS FUTUROS***

## *INTRODUÇÃO*

***REVISÃO DA LITERATURA***

## ***OBJETIVOS***

***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

***MATERIAIS***

## Sumário

1.Introdução.....	01
2. Revisão da Literatura.....	04
2.1. Crotalus – Distribuição.....	04
2.2. Veneno.....	05
2.3. Bioquímica do veneno.....	06
2.4. Citotoxicidade.....	09
2.4.1. MTT.....	10
2.4.2. Ciclo Celular.....	11
2.4.3. Núcleo.....	12
2.4.4. Morte Celular.....	12
2.4.4.1 Necrose.....	13
2.4.4.2 Apoptose.....	14
2.5 Câncer.....	23
3. Objetivos.....	27
4. Materiais.....	28
4.1.Linhagem Celular.....	28
4.2. Meio de Cultura.....	28
4.3. Soro Fetal Bovino.....	28
4.4. Crescimento e Manutenção de Culturas Celulares.....	29
4.5. Veneno.....	29
4.6. Tampão Fosfato 0,2 M.....	29
4.7. Tampão Fosfato Salina (PBS) pH 7,0.....	29
4.8. Tampão PHEM pH 6,8.....	29
4.9. Tripsina pH 7,2.....	30
4.10 MTT.....	30
4.11 DAPI.....	30
4.12 Luciferin – Luciferase.....	30

5. Métodos.....	31
5.1. Fracionamento do veneno da <i>Cdt</i> .....	31
5.2. Teste do MTT (viabilidade Celular).....	31
5.3. Microscopia de Fluorescência.....	33
5.3.1. Detecção do Veneno no interior da Célula.....	33
5.3.2. Marcação para o núcleo – DAPI.....	34
5.3.3. Teste Luciferin - Luciferase (ATP).....	35
5.4. Análise Estatística.....	36
6.Resultados.....	37
6.1. Veneno Total <i>Cdt</i> jovem.....	37
6.2. Frações do Veneno da serpente <i>Cdt</i> .....	39
6.3. Fluorescência.....	45
7. Discussão.....	62
8.Conclusão.....	69
9. Estudos Futuros.....	70
Referência Bibliográfica.....	72
Glossário.....	81
Anexo.....	82

## Lista de Figuras

Figura 1 - <i>Crotalus durissus terrificus</i> .....	03
Figura 2 - Apoptose via mitocondrial.....	18
Figura 3 - Apoptose via receptores de superfície.....	20
Figura 4 - Diferenças entre necrose e apoptose.....	22
Figura 5 - Viabilidade celular frente ao veneno da serpente <i>Cdt</i> jovem nos tempos 1, 4, 8 e 24 horas.....	38
Figura 6 - Viabilidade celular frente ao veneno da serpente <i>Cdt</i> jovem nos tempos 24, 48 e 72 horas.....	39
Figura 7- Viabilidade Celular frente ao veneno da <i>Cdt</i> jovem comparando com as frações do veneno da serpente <i>Cdt</i> adulta nos tempos de 1, 4, 8 e 24 horas.....	40
Figura 8 - Viabilidade Celular frente a fração 1 do veneno da <i>Cdt</i> (0.5, 1 e 5 $\mu$ g/mL) em 24 e 48 horas.....	41
Figura 9 - Viabilidade Celular frente a fração 2 do veneno da <i>Cdt</i> (0.5, 1 e 5 $\mu$ g/mL) em 24 e 48 horas.....	41
Figura 10 - Viabilidade Celular frente a fração 3 do veneno da <i>Cdt</i> (0.5, 1 e 5 $\mu$ g/mL) em 24 e 48 horas.....	42
Figura 11 - Viabilidade Celular frente a fração 4 do veneno da <i>Cdt</i> (0.5, 1 e 5 $\mu$ g/mL) em 24 e 48 horas.....	42
Figura 12- Viabilidade Celular frente a fração 5 do veneno da <i>Cdt</i> (0.5, 1 e 5 $\mu$ g/mL) em 24 e 48 horas.....	43
Figura 13- Viabilidade Celular frente a fração 6 do veneno da <i>Cdt</i> (0.5, 1 e 5 $\mu$ g/mL) em 24 e 48 horas.....	43
Figura 14- Viabilidade Celular frente a fração 7 do veneno da <i>Cdt</i> (0.5, 1 e 5 $\mu$ g/mL) em 24 e 48 horas.....	44
Figura 15 - Grupo de células controle.....	46

Figura 16 - Células Hep-2 tratadas com o veneno da <i>Cdt</i> jovem (0.5 ì g/mL) por 15 minutos.....	46
Figura 17 - Células Hep-2 tratadas com o veneno da <i>Cdt</i> jovem (0.5 ì g/mL) por 30 minutos.....	47
Figura 18 - Células Hep-2 tratadas com o veneno da <i>Cdt</i> jovem (0.5 ì g/mL) por 1 hora.....	47
Figura 19 - Células Hep-2 tratadas com o veneno da <i>Cdt</i> jovem (0.5 ì g/mL) por 1 ½ hora.....	48
Figura 20 - Células Hep-2 tratadas com o veneno da <i>Cdt</i> jovem (0.5 ì g/mL) por 2 horas.....	48
Figura 21 - Grupo controle marcada com DAPI.....	50
Figura 22 - Grupo controle (72 horas) marcada com DAPI.....	50
Figura 23 - Células Hep-2 tratadas com o veneno da <i>Cdt</i> jovem (0.5 ì g/mL) por 24 horas e marcadas com DAPI.....	51
Figura 24 - Células Hep-2 tratadas com o veneno da <i>Cdt</i> jovem (0.5 ì g/mL) por 48 horas e marcadas com DAPI.....	53
Figura 25 - Células Hep-2 tratadas com o veneno da <i>Cdt</i> jovem (0.5 ì g/mL) por 48 horas e marcadas com DAPI.....	53
figura 26 - Células Hep-2 tratadas com o veneno da <i>Cdt</i> jovem (1 ì g/mL) por 48 horas e marcadas com DAPI.....	54
Figura 27 - Células Hep-2 tratadas com o veneno da <i>Cdt</i> jovem (0.5 ì g/mL) por 72 horas e marcadas com DAPI.....	54
Figura 28 - Células Hep-2 tratadas com o veneno da <i>Cdt</i> jovem (1 ì g/mL) por 72 horas e marcadas com DAPI.....	55
Figura 29 - Células Hep-2 tratadas com o veneno da <i>Cdt</i> jovem (5 ì g/mL) por 72 horas e marcadas com DAPI.....	55
Figura 30 - Grupo controle por 24 horas e marcadas com Luciferin-Luciferase.....	57
Figura 31 - Grupo controle por 48 horas e marcadas com Luciferin-Luciferase.....	57
Figura 32 - Células Hep-2 tratadas com o veneno da <i>Cdt</i> jovem (5 ì g/mL) por 24 horas e marcadas com Luciferin-Luciferase.....	58

Figura 33 - Células Hep-2 tratadas com o veneno da <i>Cdt</i> jovem (0.5 µg/mL) por 48 horas e marcadas com Luciferin-Luciferase.....	58
Figura 34 - Células Hep-2 tratadas com o veneno da <i>Cdt</i> jovem (5 µg/mL) por 48 horas e marcadas com Luciferin-Luciferase.....	59
Figura 35 - Célula gigante neoplásica Hep-2 tratada com o veneno da <i>Cdt</i> jovem (0.5 µg/mL) por 2 horas.....	61
Figura 36 - Célula gigante neoplásica Hep-2 controle e marcada com DAPI.....	61

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1 - Características entre apoptose e necrose.....	21
--	----

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

ALPcS<sub>4</sub>: Cloro Alumínio Fitalocianina Tetrasulfonada  
Apaf-1: Proteína citosólica  
Bax: Proteína citosólica  
Bcl-2: Proteína citosólica (antiapoptótica)  
BCRJ: Banco de células do Rio de Janeiro  
Bid: Proteína citosólica  
*Cdc*: *Crotalus durissus cascavella*  
CDK: Ciclinas dependentes de quinases  
*Cdt*: *Crotalus durissus terrificus*  
CEN: Centro de Estudos da Natureza  
C-erb-2: Receptor para o fator de crescimento  
C-fos: Proto-oncogene (produção autócrina de fatores de crescimento)  
CHO-KI: Células de ovário de hamster chinês  
C-myc: Proto-oncogene  
CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono  
C-sys: Proto-oncogene (produção autócrina de fatores de crescimento)  
CTL: Linfócito T Citotóxico  
DAPI: 4', 6-diamidino-2fenilindol  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
DNA: Ácido desoxiribonucleico  
EDTA: Ácido etilenodiaminotetraacético  
EGFr: Receptor do fator de crescimento epidérmico  
EGTA: Ácido Bis (2-aminoetil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetraacético  
FADD: Proteína citosólica  
FAS: Receptor de membrana ou domínio de morte  
HeLa: Linhagem celular de um carcinoma humano  
HEP-2: Carcinoma Epidermóide da Laringe

JNK: Quinase

MCP: Morte Celular programada

MEM: Meio Mínimo Essencial (*Minimum essential medium*)

ML: Mililitro

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (*Mitochondrial Tracher Test*)

NK: Células assassinas

OD: Densidade ótica

p53: Gene responsável pela integridade do genoma ou gene indutor de apoptose (anti-oncogene)

PBS: Solução salina tamponada (*Phosphate Buffered Saline*)

PCNA: Antígeno de proliferação celular

PDT: Terapia fotodinâmica

PHEM: Solução Tampão (*Pipes-Hepes-EGTA-MgCl<sub>2</sub>*)

PLA<sub>2</sub>: Enzima fosfolipase A<sub>2</sub>

Ras: Proto-oncogene

Rb: Retinoblastoma

RNA: Ácido ribonucléico

RNAr: Ácido ribonucléico ribossômico

SFB: Soro Fetal Bovino

TNF: Fator de necrose tumoral (Receptor de membrana plasmática)

TRADD: Proteína citosólica

UNIVAP: Universidade do Vale do Paraíba

UV: Ultravioleta

ã: Raio gama

ìg: Micrograma

## **AGRADECIMENTOS**

A Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares pela orientação, confiança, paciência, amizade e principalmente pela preciosa oportunidade de desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Newton Soares da Silva pela valiosa participação, contribuição e sugestão desde o desenvolvimento inicial deste trabalho até o presente momento.

Ao Prof. Dr. José Carlos Cogo pela oportunidade de realização deste trabalho e o apoio ao desenvolvimento da pesquisa e pela leitura crítica deste.

A Profa. Dr. André Luís Paschoal pela composição da banca de qualificação e contribuição na "inflamada" revisão deste trabalho.

Ao Nilson, meu marido, por ter estado sempre ao meu lado, por ser um exemplo de persistência e paciência, e por ter me compreendido e apoiado em todos os sentidos, desde o início deste trabalho até o presente momento.

Aos meus filhos, Layse e Luís Fernando, bens mais preciosos, pelo orgulho, carinho, alegria em todos os momentos.

Aos meus pais, pelo amor e exemplo de dignidade que eles sempre me passaram e por terem me dado a oportunidade de perseguir meus sonhos e seguir o meu caminho.

Aos meus irmãos por completarem (tão bem) a minha família.

A amiga e "vizinha de bancada" Zélia, pela transparência, sinceridade e amizade, onde sempre existiu o respeito e a confiança mútua e também e também por ter estado presente nos momentos mais críticos e mais felizes destes últimos anos.

Aos amigos Aline, Ana Maria, Ana Paula, Bianca, Graziela, Gustavo, Karina, Maíra, Marcelo, Nilce, Richelli, Roberta, Sidney, Silvanira, Tatiana, Valéria, Wallace pelas agradáveis e importantes experiências compartilhadas no convívio de laboratório e também pelo apoio experimental.

A bibliotecária Rosângela, pela revisão das referências bibliográficas.

As secretárias Cláudia, Ivone e Rebeca, por terem me auxiliado sempre que precisei.

Em especial amiga Mara, por todo o carinho.

Ao meu amigo Pietro, pelo auxílio e valiosos ensinamentos na área de informática.

Enfim a todos que de uma forma ou de outra, colaboraram na realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

Aos meus filhos, pelo carinho, alegria em todos os momentos;

Ao meu marido, pelo apoio, cumplicidade, amizade e, com certeza o maior incentivador do meu trabalho;

Aos meus pais, pelo exemplo de perseverança e retidão, que me apontaram o caminho para a realização pessoal.

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

(Albert Einstein)

## 1. INTRODUÇÃO

*Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*) é responsável por cerca de 10% dos acidentes por serpentes peçonhentas no Brasil. Segundo dados do Ministério da Saúde, ocorre entre 19000 a 22000 acidentes ofídicos por ano, com letalidade ao redor de 0,45 %. Dentre os acidentes por animais peçonhentos, o araneísmo é o tipo mais frequente, seguido pelo ofidismo e escorpionismo. A maioria dos acidentes ofídicos deve-se a serpentes do gênero *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, urutu e outros) e *Crotalus* (cascavel) sendo raros os produzidos por *Lachesis* (surucucu, surucutinga) e *Micrurus* (coral) O veneno da *Cdt* possui principalmente três atividades com importância clínica conhecida: neurotóxica, miotóxica e coagulante (JORGE ; RIBEIRO, 1992 ; PINHO; PEREIRA, 2001; PINHO ; OLIVEIRA ; FALEIROS, 2004).

A picada por serpente *Crotalidae* é séria e quase sempre fatal na ausência do tratamento adequado e específico, se tornando importante à compreensão da fisiopatologia desse veneno (BARRAVIERA *et al*, 1989).

Veneno de serpente é uma mistura de muitas substâncias, como toxina, enzimas e peptídios e é nesse coquetel de moléculas dos mais variados tipos e formas, que tornam as glândulas de serpentes uma verdadeira "farmácia viva", onde estas possuem substâncias farmacológica e bioquimicamente ativas e é nessas moléculas que os pesquisadores tentam encontrar novas drogas terapêuticas como por exemplo: drogas que dissolvam coágulos, e outras que ajudem na coagulação, assim como drogas analgésicas e contra o câncer.

O veneno da serpente *Cdt* contém um complexo enzimático com atividade fosfolipásica (PLA<sub>2</sub>), o qual tem sido mostrado por inibir o crescimento celular tumoral *in vitro* e *in vivo*. O alvo da toxina na membrana celular sugere um possível envolvimento de mudanças na integridade da membrana e/ou na composição do processo de sinalização antiproliferativo (DONATO *et al*, 1996).

Várias são as aplicações médicas de veneno de serpentes, desde o controle da pressão arterial até o tratamento de câncer. Nos anos 60, uma molécula do veneno de jararaca foi isolada e utilizada como medicação contra a hipertensão, e do veneno da cascavel formularam uma cola de pele, devido à presença de uma enzima tipo trombina, que é capaz de soldar os tecidos biológicos (PRADO, 1997).

Testes *in vitro* têm um grande campo na quimioterapia do câncer, além de vantagens econômicas consideráveis. Moléculas que participam no programa apoptótico podem servir como alvo de novas drogas com diversas aplicações, incluindo a modulação das doenças neurodegenerativas, doenças no sistema imune e câncer.

Usar o sistema de teste *in vitro* para exibir o agente anticâncer já tem sido uma prática comum desde o começo da quimioterapia de câncer clínico em 1946 (WILSON, 1994). Entretanto alguns pontos necessitam maiores estudos para a melhor compreensão da ação do veneno no metabolismo celular e as organelas afetadas por este tipo de terapia, bem como um melhor conhecimento e aprimoramento de drogas cada vez mais específicas para células tumorais, sem comprometimento das células normais (MADY, 2002).



**FIGURA 1.** *Crotalus durissus terrificus* (DE BEM NETO, 2001).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CROTALUS - DISTRIBUIÇÃO

Existem quase dois mil tipos de serpentes no mundo, aproximadamente 300 são conhecidas como venenosas e classificadas de acordo com suas características morfológicas, compreendendo cinco famílias: *Viperidae* (víbora, víbora de chifre), *Elaphidae* (corais verdadeiras, najas), *Hidrophidae* (serpente amarelo inchada do mar, colubrina de laticauda), *Colubridae* (Falsa coral, cobra-cipó, muçurana) e *Crotalidae* (cascavel). As serpentes das famílias *Viperidae* e *Crotalidae* têm similaridades taxônomicas, sendo que em algumas classificações estão incluídas na mesma família. As propriedades farmacológicas de seus venenos têm alguma similaridade e relaciona-se aos venenos da *Elaphidae*.

Os gêneros: *Bothrops* (jararaca), *Crotalus* (cascavel), *Lachesis* (surucucu) da família *Crotalidae* e *Micrurus* (coral verdadeira) da família *Elaphidae*, são espécies peçonhentas encontradas no Brasil. O veneno da *Cdt* no Brasil tem sido um dos mais estudados desde 1938 (VARANDA; GIANNINI, 1994; PINHO; PEREIRA, 2001).

As serpentes do gênero *Crotalus* encontram-se distribuídas no Brasil em cinco subespécies: *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus ruruima*, *Crotalus durissus marajoensis*, *Crotalus durissus terrificus* (BARRAVIERA, 1990 ; BARRAVIERA, 1993 ; JORGE ; RIBEIRO, 1992 ; PINHO; PEREIRA, 2001).

## 2.2 VENENO

Veneno é uma substância capaz de fazer mal a um ser, independente da via de ação ingerido, injetado, ou inoculada podendo levar à morte. Em muitos casos é por via oral, sendo estas substâncias absorvidas pelo sistema digestivo.

Peçonha é o veneno que sofre especialização nas glândulas salivares das serpentes, onde adquirem atividades enzimáticas, podendo destruir as proteínas e desencadear diversas reações nos seres vivos. Funcionando para a serpente, como um suco digestivo para o seu sustento. E para a presa, a peçonha pode ser distinguida pela suas propriedades: proteolítica, coagulante, neurotóxica e hemolítica.

Assim para obter o seu alimento a serpente recorre ao veneno que pode apresentar ações específicas sobre a presa. De acordo com esta ação podemos distinguir as seguintes propriedades da peçonha: proteolítica, coagulante, neurotóxica e hemolítica. (DE BEM NETO, 2001).

Quanto ao envenenamento, o veneno crotálico quase não produz lesão local, possuindo principalmente três atividades com importância clínica conhecida. Atividade neurotóxica, com ação periférica, causando paralisia flácida da musculatura esquelética, principalmente ocular, facial e às vezes, da respiração, com conseqüente insuficiência respiratória; atividade coagulante, provocando a ocorrência de sangramento e distúrbios da coagulação por consumo de fibrinogênio; e atividade miotóxica sistêmica, causando rabdomiólise generalizada, podendo evoluir para insuficiência renal aguda (PINHO; PEREIRA,2001).

Os venenos das serpentes, especialmente da família *Crotalidae* contêm um grande número de proteínas farmacológica e bioquimicamente ativas. Cerca de 90 % a 95 % do peso seco do veneno consiste de proteínas e algumas das frações protéicas são biologicamente mais importantes do que as não protéicas. A toxicidade do veneno deve-

se a presença de enzimas e proteínas, e sua ação letal é atribuída principalmente às neurotoxinas.

### 2.3 BIOQUÍMICA DO VENENO

O veneno da *Crotalus* consiste de quatro proteínas de relevante importância, crotoxina, crotamina, convulxina e giroxina. A crotoxina e crotamina, são neurologicamente ativas. Enquanto que a convulxina e giroxina não têm sido mostrado ter propriedades neurológicas ainda. A convulxina produz convulsões, perturbações circulatórias e respiratórias em animais experimentais (BARRAVIERA, 1990). A giroxina não é letal e sua ação lembra lesão labirintítica quando injetados em animais experimentais, onde o animal gira em torno de si por 15'. A crotoxina consiste de duas subunidades polipeptídicas, uma fosfolipase A2 básica, tóxica, e a subunidade ácida denominada crotapotina não tóxica, destituída da atividade enzimática. Sendo uma toxina e, também um fluido digestivo, o veneno da *Crotalus* é definitivamente mortal, ocorrendo falha renal aguda, pode causar convulsões, desordens na coagulação sanguínea, mionecrose, falha na respiração celular, bloqueio neuromuscular causando a morte. E ainda com possível dano no fígado e coração. (BARRAVIERA, 1990 ; CAMILLO *et al*, 2001 ; MARTINS *et al*, 2002 ; MONTEIRO, *et al*, 2001).

Serpentes da família *Crotalidae* possuem uma forte atividade proteolítica. (VARANDA; GIANNINI, 1994).

O veneno das serpentes tanto do gênero *Bothrops* quanto do *Crotalus* consome o fibrinogênio sanguíneo, tornando o sangue incoagulável (BARRAVIERA, 1994).

Serpentes venenosas são resistentes a seu próprio veneno, Faure *et al* (2000) identificaram um inibidor da crotoxina no soro da *Cdt* e sugeriram que este poderá ser usado no antiveneno da *Crotalus* e também nos envenenados pelas serpentes *Viperidae*,

tendo visto que essa proteína inibidora da crotoxina não tem efeito nas fosfolipase A<sub>2</sub> dos mamíferos, não interferindo com a função biológica nessas enzimas humanas.

Crotoxina tem duas subunidades, uma ácida e a outra básica. A básica possui propriedade enzimática como uma fosfolipase A<sub>2</sub>, enquanto a subunidade ácida não possui propriedade enzimática. Mas a subunidade básica por si só, tem efeito neurotóxico e a subunidade ácida não tem esse efeito. Quando as duas são combinadas, a neurotoxicidade é muito grande, levando a potencialização dos efeitos miotóxicos (CHISARI *et al*, 1998). De acordo com Barraviera (1990) o sítio primário da ação da crotoxina no músculo é a membrana plasmática, com conseqüente hidrólise de fosfolípidos.

Existem diferentes enzimas fosfolipásicas, formando um super grupo (PLA<sub>2</sub>) e membros desse grupo tem o papel na regulação da inflamação, função imune, e contração no músculo liso pela geração de ácido araquidônico e seu metabolismo aos eicosanóides, sendo estas importantes moléculas sinalizadoras. A primeira atividade fosfolipásica (PLA<sub>2</sub>) foi descrita 100 anos atrás do veneno da naja (*Naja naja atra*), e sabemos hoje que enzimas fosfolipásicas são componentes comuns em muitos venenos animais.. Essa enzima foi reconhecida posteriormente, como uma enzima digestiva secretada pelas células pancreáticas em bovinos. PLA<sub>2</sub> é resistente ao calor e ao ácido e, sobrevive em muitos ambientes biológicos diferentes, permanecendo ativos.

Diferentes formas das subunidades básica e ácida têm sido encontradas, mas todas essas diferentes formas são encontradas em uma mesma serpente. Isto mostra que a serpente faz mais de uma variante desse veneno, e também que uma dose poderá ter muitos efeitos diferentes (FAURE ; BON, 1987 ; FAURE *et al*, 1994).

Crotamina é uma proteína básica não enzimática e tem um terço do tamanho da crotoxina. Ela é uma pequena miotoxina que induz mionecrose do tecido muscular, induzindo a despolarização do potencial de membrana das células musculares (AIRD, 2002 ; SALVINI *et al*, 2001). É possível que esta miotoxina atue nos canais de sódio da membrana plasmática das células musculares, induzindo um influxo deste cátion sendo

que a despolarização da membrana plasmática é provavelmente o indicador precoce no dano celular causado (AIRD, 2002 ; FLETCHER *et al*, 1996 ; MELO *et al*, 2004).

Hampe e Belló (1997) em seus estudos demonstraram que a crotamina é responsável pela paralisia espástica em sua pesquisa *in vivo* com camundongos injetados com crotamina purificada.

A principal fração neurotóxica do veneno da *Cdt* e da *C. d. cascavella* é a crotoxina, que causa paralisia em todas as espécies de animais estudadas, atuando no bloqueio na transmissão neuromuscular, precisamente atua na pré-sinapse inibindo a liberação de acetilcolina (BARRAVIERA, 1990 ; BEGHINI *et al*, 2004 ; TZENG *et al*, 1995).

Rádis-Baptista *et al* (2003) demonstraram em seus estudos que há diferenças no gene crotamina nos dois homólogos dos cromossomos e que isto possa refletir uma diferença no número de cópias dos genes entre os cromossomos, uma possível explicação para a quantidade variável de crotamina encontradas nos venenos.

Variações na composição do veneno e em suas atividades têm sido mostrados na literatura, e segundo Furtado , Santos e Kamiguti (2003) existem diferenças distintas dependendo da idade da cobra. Diferenças no conteúdo de elementos inorgânicos, foram encontrados em *C. d. cascavella*, alto conteúdo de Br, Cl e  $Mg^{2+}$ , e um menor nível de Zn. No que diz respeito à porcentagem de proteínas em cada fração em diferentes amostras de veneno foi demonstrado por Magro *et al*, (2001) que ocorre uma grande variabilidade e também variação no número de frações em diferentes venenos sugerindo que isto possa ser devido a fatores genéticos ou ainda estar associado com a estação do ano, origem geográfica, sexo, idade e alimentação da cobra.

Mancin *et al* (1998) em testes com a crotamina observaram um efeito analgésico muito maior que a morfina. Embora muitas pessoas morram por ano, decorrente de mordidas de serpentes, as proteínas ali presentes podem ajudar muitas pessoas. A crotamina por exemplo, poderia ser usado para substituir morfina.

Pesquisa *in vivo* na redução tumoral com o veneno da *Cdt* tem obtido sucesso, apresentando um menor número de células tumorais e, segundo Silva, Fecchio e Barraviera *et al* (1997) os macrófagos são as principais células envolvidas na rejeição tumoral e de acordo com Fecchio (1989) macrófagos isolados de animais com tumor são capazes de lisar células tumorais tanto *in vivo* como *in vitro*.

## 2.4 CITOTOXICIDADE

Citotoxicidade é a ação de um determinado componente (tais como alimento, cosméticos, ou fármacos) ou de célula mediadora (célula T citotóxica) capaz de causar morte celular. Em contraste a necrose e apoptose, o termo citotóxico não indica um mecanismo de morte celular específica.

Por exemplo, citotoxicidade mediada por célula, ou seja, morte mediada por linfócito T citotóxico (CTL) ou células naturais assassinas (NK) podem combinar alguns aspectos de ambos necrose e apoptose (APOPTOSIS, 2002).

O mecanismo pelo qual as células T citotóxica matam seu alvo não é conhecido ao certo. Elas parecem empregar pelo menos duas estratégias, ambas parecem operar por indução da célula-alvo à morte celular programada. A ligação estratégica a uma célula-alvo estimula as células T citotóxica a liberarem uma proteína formadora de poro chamada perforina, que é homóloga ao componente C9 do complemento e polimeriza-se na membrana plasmática da célula-alvo para formar canais transmembrana. A perforina é armazenada em vesículas secretoras e é liberada por exocitose, no ponto de contato com a célula-alvo. As vesículas secretoras também contêm serinoproteases e outras proteínas que também parecem tomar parte na destruição da célula-alvo, talvez entrando na célula-alvo através dos canais de perforina e induzindo morte celular programada. A segunda estratégia, ao contrário, envolve células T citotóxica ativando um receptor na

superfície da célula-alvo, desta forma sinalizando a célula-alvo a caminhar para a morte celular programada (ALBERTS *et al*, 1997).

O uso de testes *in vitro* envolve uma avaliação segura dos componentes utilizados e oferece vantagens econômicas consideráveis sobre testes *in vivo*. Considerando ainda, que existe uma pressão moral para reduzir experimentos em animais.

Citotoxicidade *in vitro* nos permite:

- identificar os componentes ativos;
- identificar o mecanismo pelo qual o componente exerce seu efeito tóxico;
- identificar a droga citotóxica;
- descrever e identificar a taxa de atividades de um componente;
- identificar o alvo potencial na população celular;
- identificar a taxa de concentração tóxica;
- relacionar a concentração do agente tóxico com o tempo de exposição

(WILSON, 1994).

#### 2.4.1 MTT

MTT Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazólio- (Sigma). É um teste colorimétrico, onde o componente amarelo do MTT é reduzido pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial, para o componente formazana azul, dependendo da viabilidade das células. Em células ativamente se proliferando, um aumento na conversão de MTT é quantificado espectrofotometricamente. A comparação desse valor a um controle não tratado fornece um aumento relativo na atividade proliferativa celular. Inversamente, nas células que sofrem a apoptose, a redução de MTT diminui, refletindo a perda da viabilidade (DOYLE; GRIFFITHS, 1998; LOO; RILLEMA, 1998; WILSON, 1994).

## 2.4.2 CICLO CELULAR

O ciclo celular em um organismo e a taxa de divisão celular é um processo regulado que está associado com crescimento, diferenciação e renovação tecidual. Geralmente, células não populacionais sofrem divisão, a menos que elas recebam sinais que as induzam a entrar e ativar segmentos no ciclo celular. Células em repouso são ditas quiescente (fase G0) do ciclo celular. Os sinais que induzem a célula a se dividir são diversos e ativam um grande número de sinais transducionais da cascata.

Geralmente, sinais diretos para entrar no ciclo celular são chamados de fatores de crescimento, citocinas ou mitogênico. Sinais da via transducional são ativados nas células em respostas a fatores de crescimento ou estimulação mitogênico. As respostas para estas várias estimulações no tipo celular e na via transducional continuam a crescer mais. Esses tipos de vias continuam sendo foco de muita pesquisa e considerados na biologia como um fato importante na regulação do ciclo celular (APOPTOSIS, 2002).

Durante G1 (G=Gap), ocorre à preparação celular para síntese de DNA. Nas fases posteriores a G1, a célula passa por um ponto de restrição e então completa o ciclo. Durante a fase S da célula, ocorre síntese de DNA duplicando seu genoma. Durante G2 a célula se prepara para sofrer divisão e conferir sua replicação usando uma enzima reparadora do DNA. Durante a fase M, a célula sofre divisão por mitose ou meiose e retornam a fase G1 ou G0.

A decisão para a célula sofrer divisão é regulada pela passagem da célula de G1 para fase S. Progressão do ciclo celular é controlada por um grupo de quinases chamadas ciclinas dependente de quinases (CDKs); CDKs são portanto, substratos para fosforilação celular, tais como os genes para retinoblastoma, que são responsáveis pela progressão em cada uma das fases do ciclo celular. CDKs são ativadas por associação com proteínas onde níveis de expressão mudam durante diferentes fases no ciclo celular (ALBERTS et al, 1997; LEWIN, 2001).

### **2.4.3 NÚCLEO**

O núcleo apresenta-se de forma bem individualizada e separada do restante da célula. O envoltório nuclear (carioteca) é composto por duas membranas concêntricas ligadas ao nível dos poros. A membrana externa continua com a membrana do Retículo endoplasmático e é comum que apareça associada a ribossomos. A membrana nuclear interna é sustentada pela lâmina nuclear. Geralmente íons e as moléculas pequenas são transferidos de modo passivo, sem gasto de energia pelo complexo do poro e as macromoléculas (proteínas) devem promover uma dilatação. A proteína destinada ao núcleo produzida no citosol, contém um peptídeo sinal, que é reconhecido por uma proteína. As proteínas que deixam o núcleo também dependem de sinais específicos para cruzar os poros e voltar ao citosol.

O núcleo quando observado na intérfase da divisão celular apresenta, o envoltório nuclear, o qual abriga a cromatina (cromossomos num estado relativamente desespiralizado) e o nucléolo. A cromatina, que abriga o material genético (DNA), apresenta duas regiões, que podem ser caracterizadas pelo grau de compactação: a heterocromatina (cromatina mais compactada), e a denominação de eucromatina (cromatina menos compactada). O nucléolo de forma esférica, onde se localizam os genes dos RNA e os RNAr recentemente sintetizados (DE ROBERTIS; HIB, 2001).

### **2.4.4 MORTE CELULAR**

Um indivíduo se desenvolve a partir de uma célula, a célula ovo, que por sua vez sofre divisões mitóticas, até o indivíduo adulto, não alterando a informação genética; portanto todas as células de um indivíduo têm o mesmo número de cromossomos e o mesmo conjunto de genes da célula ovo inicial, podendo ocorrer mutações no caminho (FARAH, 1997).

A morte das células é um fenômeno comum durante o desenvolvimento embrionário, necessário para eliminar tecidos provisórios, remover células supérfluas, gerar ductos e orifícios orgânicos.

A morte celular também ocorre em grande escala no organismo adulto, quando este necessita remodelar tecidos ou remover células desnecessárias, danificadas, envelhecidas, redundantes ou potencialmente perigosas como as células tumorais, as infectadas ou as células autorreativas (por exemplo, o linfócito aberrante que atacam o próprio organismo).

Uma vez que as células do organismo destinadas à morte perecem para que as restantes sobrevivam, pode-se dizer que estas protagonizam uma espécie de sacrifício ou suicídio biológico com fins altruístas.

A morte celular pode ocorrer por dois mecanismos distintos: a apoptose e a necrose, sendo que a necrose, pode também ser chamada de morte celular patológica.

Estas mortes celulares fisiológicas, que na verdade são mortes programadas, recebem o nome de apoptose (do grego apo, separado de, e, ptosis, queda), terminação usada para diferenciá-la das mortes celulares acidentais (por traumatismo, substâncias tóxicas, afecções vasculares, etc.), conhecidas como necrose (DE ROBERTIS; HIB, 2001).

#### **2.4.4.1 NECROSE**

Ao longo de todos estes anos, o fenômeno de morte celular tem sido muito estudado, atraindo a atenção de inúmeros pesquisadores em diversos campos do conhecimento (SILVA, 2002).

As células que morrem acidentalmente, como resultado de injúria aguda, geralmente incham e explodem, comprometendo a habilidade das células para manter homeostasia, acarretando um influxo de água e íon extracelulares, levando a turgidez da célula inteira e ruptura da mesma (lise celular). Devido a um comprometimento da membrana plasmática, o conteúdo citoplasmático, incluindo enzimas lisossomais, são liberadas no fluido extracelular. Entretanto, *in vivo*, morte celular necrótica está freqüentemente associada com extensivo dano no tecido resultando em uma extensa resposta inflamatória (ALBERTS *et al*, 1997; APOPTOSIS, 2002).

#### 2.4.4.2. APOPTOSE

Apoptose no grego clássico significa “decaimento”, como o “decaimento” das pétalas de uma rosa ou das folhas de uma árvore. O patologista australiano John F.R. Kerr e seus colegas escoceses Andrew H. Wylie e Alastair R. Currie, publicaram um artigo em 1972 e sugeriram que a célula é uma vítima passiva, sem perder a integridade da membrana, onde a célula tem um papel ativo, com um gasto de energia para levar a sua própria morte. Eles propuseram que a iniciação ou a inibição inadequadas do suicídio celular, pode contribuir para muitas doenças, incluindo o câncer. Foram esses autores que adotaram a palavra grega, apoptose para distinguir este tipo de morte celular da necrose (necrosar). Os cientistas que já observaram as células sofrerem apoptose, constataram alterações muito importantes. Durante esse processo não ocorre um aumento de tamanho ou inchaço das células, como na necrose. Em vez disso, constatou-se que as células moribundas, primeiro encolhem e se destacam das células vizinhas. Logo em seguida ocorre a agregação da cromatina, condensação citoplasmática e nuclear, partição da membrana em corpos apoptóticos, o qual contém ribossomos, mitocôndrias e material nuclear morfológicamente intacta. *In vivo*, esses corpos apoptóticos são rapidamente reconhecidos e fagocitados por macrófagos ou células vizinhas. Uma vez dentro do macrófago, a célula apoptótica é rapidamente desmontada, e seus blocos de constituintes químicos, reusados sem nenhuma resposta inflamatória (DUKE; OJCIUS; DING-e YOUNG, 1996).

Pesquisadores que estudaram o desenvolvimento embrionário, no início do século XX, foram os primeiros a compreender que a morte das células, não é, como se pensava, prejudicial ao organismo; mas, de fato, necessária. Desde os anos de 1950 eles mostraram que o ser multicelular obtinha a sua forma final pela eliminação seletiva de células, como por exemplo, a eliminação da cauda durante a metamorfose de girino em sapo; os mamíferos eliminam incontáveis neurônios enquanto seu sistema nervoso se desenvolve, onde sofrem apoptose. As células da pele começam a sua vida nas camadas mais profundas e então migram para a superfície, onde sofrem apoptose. As células mortas formam a camada protetora chamada queratina. No timo, os linfócitos T, componentes críticos do sistema imune, tornam-se maduros no Timo; aqueles que perdem a sua função ou que poderão eventualmente atacar os tecidos do próprio organismo, cometem suicídio antes que tenham a chance de cair na corrente sanguínea. No útero, quando as células da parede uterina morrem e descamam durante a menstruação, elas o fazem por apoptose, e em outros tecidos, quando as células se tornam infectadas por um vírus ou sofrem mutações genéticas irreparáveis, freqüentemente cometem suicídio. O malogro de uma célula alterada geneticamente em cometer suicídio, pode contribuir para o desenvolvimento do câncer. Certas células que sofrem morte programada não são englobadas prontamente; hoje sabemos que elas persistem por um longo tempo ou mesmo indefinidamente. O cristalino do olho, por exemplo, é constituído por carcaças de células, que tiveram o seu conteúdo citoplasmático substituído pela proteína cristalina, durante o processo de morte programada (apoptose). Na pele, o queratinócito é gerado pelos seus precursores numa camada profunda deste tecido: tais precursores migram então para a superfície, formando camadas de células mortas. Diferente do cristalino, eles substituem seus conteúdos por queratina e adquirem impermeabilidade à água. Tais células mortas formam a camada protetora da pele e freqüentemente sofrem descamação, sendo substituídas por outras. A porcentagem de erro na regulação do apoptose será igual a zero, para que a célula não siga o caminho indesejado (DUKE; OJCIUS; DING-e YOUNG, 1996 ; LEWIN, 2001).

Embora pareça contraditório, é importante encarar a morte celular programada como um mecanismo de sobrevivência ao invés de destruição, já que ela está

intimamente envolvida em todo o processo de desenvolvimento embrionário, e na fase adulta de um organismo (DUKE; OJCIUS; DING-e YOUNG, 1996 ; SILVA, 2002).

A apoptose pode começar pela ação de vários gatilhos, inclusive, pela remoção dos sinais químicos das células (conhecidos como fatores de crescimento ou de sobrevivência) pelos quais elas se reconhecem. A morte celular pode também ser desencadeada por receptores de mensagens, internos e externos, que começam a ignorar certas mensagens químicas; ou pelos receptores celulares para sinais conflitantes como aqueles que dizem se ela deve ou não sofrer divisão celular (APOPTOSIS, 2002).

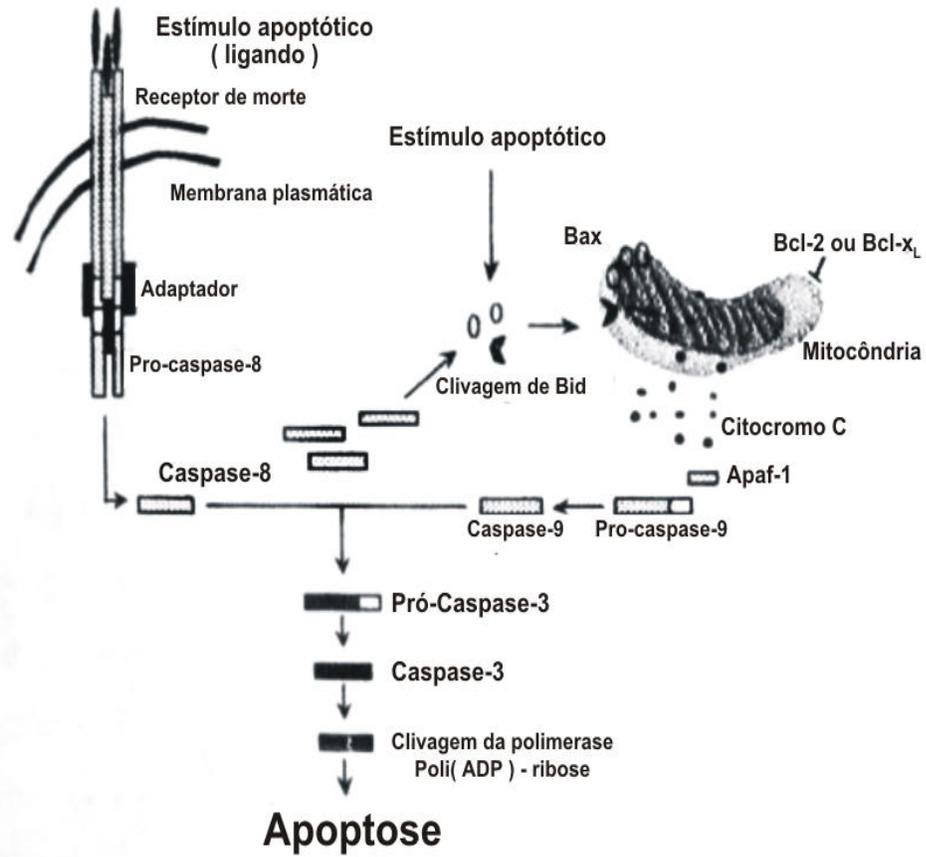
Com o advento da biologia molecular, o estudo da morte celular programada atingiu o campo da genética molecular. A expressão de vários genes tem sido associada à indução de morte celular em uma grande variedade de vertebrados e invertebrados.

Tanto o controle de proliferação celular, quanto o controle de sobrevivência celular, dependem de sinais específicos, possibilitando que a célula se divida somente quando mais células são solicitadas e que uma célula sobreviva somente e onde é necessária (ALBERTS *et al*, 1997).

Mecanismos de morte celular por apoptose podem ser mediados pela via mitocondrial, pela via dos receptores de morte ou pela convergência das duas vias.

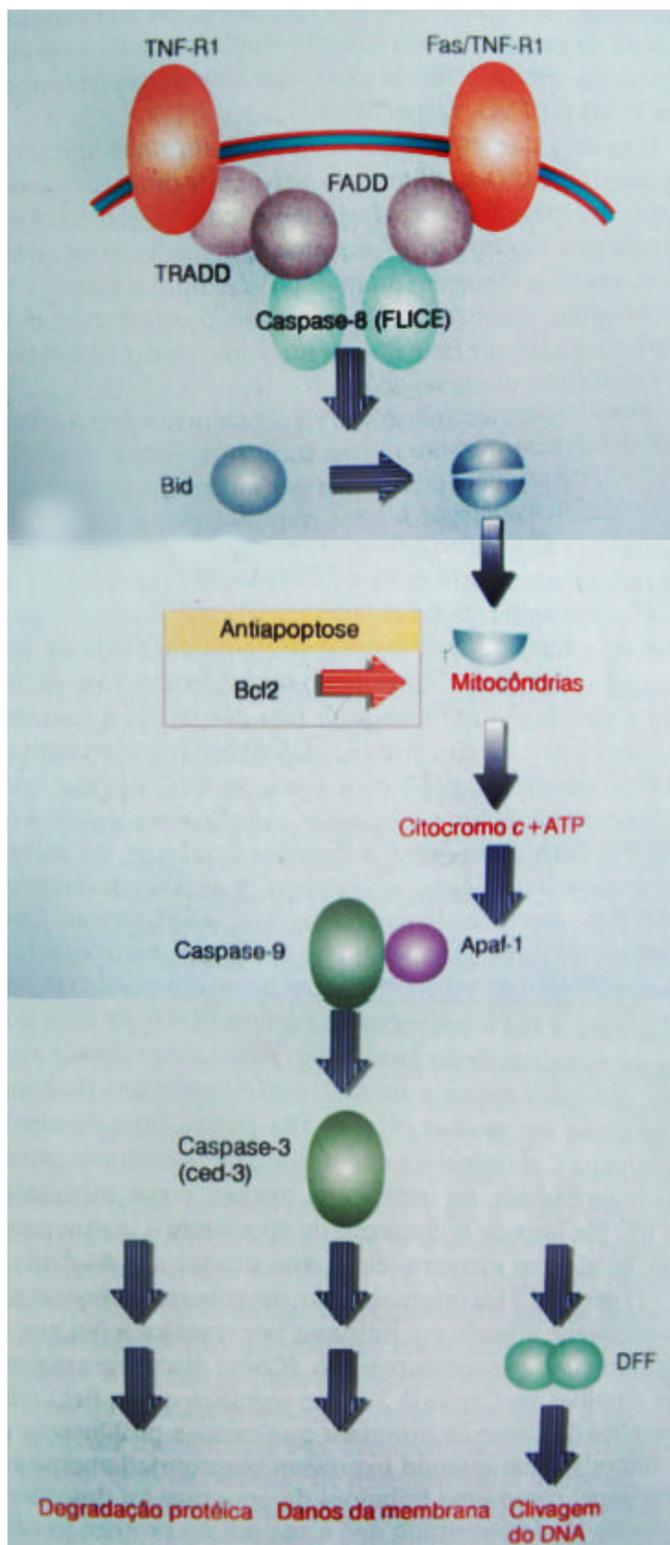
A mitocôndria é um ponto crucial no controle da indução de apoptose, segundo Mendes e Green (1999), a mitocôndria funciona como um sensor de *stress*, e como uma variável que determina se a célula vive ou morre. O evento de morte celular gerado em nível mitocondrial, é a liberação do citocromo c do espaço intermembranoso mitocondrial para o citosol. Isto provoca pelo menos 3 caminhos danosos principais para a célula. Primeiro, o citocromo c associado com Apaf-1 inicia a ativação da caspase efetora conduzindo a apoptose. Segundo, o citocromo c liberado da mitocôndria quebra a cadeia de transporte de elétron, com prejuízo na produção de energia. Se a célula não é capaz de compensar tais distúrbios, ela morrerá, pois não haverá energia suficiente para sustentar a reação metabólica básica que mantém a célula viva. Terceiro,

este mesmo evento pode gerar espécies de oxigênio reativas, que são potentes agente citotóxico. Certas drogas citotóxicas, UV, radiação  $\gamma$  ou glicocorticóides, conduzem a liberação do citocromo c e em seguida morte celular.



**FIGURA 2.** Apoptose mediado pela via mitocondrial, pela via dos receptores de morte ou, ainda, pela convergência de ambas (SOLÁ *et al.*, 2001).

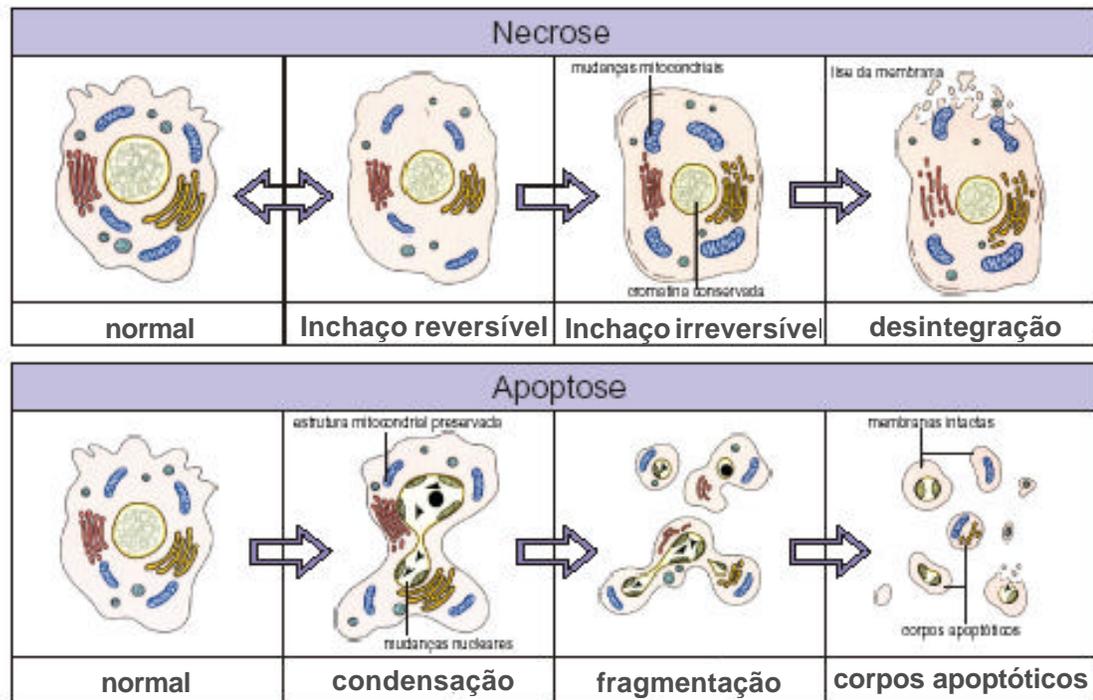
Um complexo contendo vários componentes é formado no receptor. O receptor TNF (fator de necrose tumoral) liga-se a uma proteína chamada de TRADD, a qual, por sua vez, liga-se a uma proteína chamada de FADD. O receptor Fas também se liga a FADD. Em qualquer dos casos, a FADD liga-se à proteína caspase-8 (cisteína-aspartato-protease), que cliva a Bid, a qual possibilita a liberação do citocromo c das mitocôndrias. O citocromo c determina a oligomerização da Apaf-1 com a caspase-9. A caspase-9 quando ativada cliva a pró caspase-3 da qual duas subunidades formam, então, a protease ativa. Esta protease cliva vários alvos que levam a morte celular. A rota é inibida pela Bcl-2 no estágio de liberação do citocromo c (ALBERTS *et al*, 1997; DUKE; OJCIUS; DING-e YOUNG, 1996 ; LEWIN, 2001 ; SILVA, 2002).



**FIGURA 3.** Via apoptótica desencadeada pela ativação de receptores de superfície. As proteases caspases são ativadas nesta rota. A apoptose pode ser bloqueada por bcl-2 (LEWIN, 2001).

<i>Características</i>	<i>Necrose</i>	<i>Apoptose</i>
<i>Morfológicas</i>	<p>Perda da integridade da membrana</p> <p>Floculação da cromatina</p> <p>Lise total da célula</p> <p>Não há formação de vesícula</p> <p>Desintegração das organelas</p>	<p>Não há perda da integridade da membrana</p> <p>Agregação da cromatina à membrana celular</p> <p>Condensação celular (encolhimento)</p> <p>Formação de vesículas com membrana (corpos apoptóticos)</p> <p>Sem desintegração das organelas</p>
<i>Bioquímicas</i>	<p>Perda da regulação iônica homeostática</p> <p>Processo passivo (sem necessidade de energia)</p> <p>Digestão randômica de DNA</p> <p>Pós-fragmentação de DNA</p>	<p>Processo envolvendo ativações e passos enzimáticos</p> <p>Dependente de energia (ATP)</p> <p>Fragmentação de DNA definida (não randômica)</p> <p>Pré-fragmentação de DNA</p>
<i>Fisiológicas</i>	<p>Morte de grupos celulares evocados por distúrbios não fisiológicos</p> <p>Fagocitose por macrófagos</p> <p>Resposta inflamatória significativa</p>	<p>Morte de células individuais induzidas por estímulos fisiológicos</p> <p>Fagocitose por células adjacentes ou macrófagos</p> <p>Resposta não inflamatória</p>

**TABELA 1.** Características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas que distinguem necrose e apoptose (SOLÁ *et al.*, 2001).



**FIGURA 4.** Diferenças entre Necrose e Apoptose (BIOAGENCY, 2003).

## 2.5 CÂNCER

O câncer é uma doença que envolve tanto a proliferação excessiva de células como a sua renúncia à morte programada. Ele se desenvolve depois que uma célula acumula mutações em diversos genes que controlam o crescimento e a sobrevivência. Quando uma mutação parece irreparável, a célula afetada suicida-se; do contrário ela poderá viver o bastante para acumular mutações, o que a torna capaz de se dividir descontroladamente e levar a metástase, ou seja, quando o tumor se espalha para outros locais ou tecidos. Em muitos tumores, uma falha genética causa um dano para induzir a apoptose, porque os constituintes celulares desativam o gene que codifica a proteína p53. Esta proteína, como veremos, pode levar a ativação da maquinaria apoptótica da célula, quando o DNA é danificado.

Os proto-oncogenes são genes relacionados com o crescimento, diferenciação e proliferação celular normais. Codificam fatores de crescimento, receptores de membrana e proteínas de ligação do DNA. Os oncogenes são proto-oncogenes ativados. Sua ativação é desencadeada através de alterações genéticas:

- **Translocações e inversões** - permitem que um proto-oncogene seja inserido próximo ou fusionado a um gene freqüentemente transcrito, levando a sua expressão aumentada e/ou produção de proteínas aberrantes.
- **Deleções** – Têm importância oncogênica quando envolvem genes supressores do crescimento celular.
- **Amplificações** – Levam à expressão exacerbada de proteínas estruturalmente preservadas.
- **Mutações puntiformes** – causam produção de proteínas estruturais e funcionalmente aberrantes.

- **Inserção de DNA viral** – inserem oncogenes virais no genoma humano. O produto de tais oncogenes pode estimular ou inibir proto-oncogenes e anti-oncogenes.

Alguns oncogenes produzem oncoproteínas, como a Bcl-2, que se ligam fortemente e inibem as proteínas codificadas por genes supressores do crescimento celular ou indutores da apoptose, como o p53 e o Rb. Com isso, levam à ausência ou inibição da morte celular por apoptose, logo, a imortalidade celular. Outros oncogenes agem levando à produção excessiva de receptores de membrana para fatores de crescimento, como o c-erb-B-2 (para um homólogo do fator de crescimento epidérmico). Uma terceira via é a produção autócrina de fatores de crescimento, que é observada, por exemplo, na multiplicação e ativação dos proto-oncogenes c-fos e c-sys pelo produto do oncogene viral tax (HTLV-1). Outras formas de promoção do crescimento neoplásico são a ativação de proto-oncogenes que estimulam a entrada da célula em mitose (ex. c-myc) e a produção de proteínas que simulam a ação dos transdutores de sinal dos receptores de membrana para fatores de crescimento (ex. c-ras e c-abl).

Os anti-oncogenes são genes inibidores da proliferação celular normal, logo, também do crescimento tumoral. Eles agem de diversas formas:

- **Interação com a matriz extracelular** – O anti-oncogene DCC produz uma proteína transmembrana que interage com componentes da matriz extracelular, sendo responsável pela sinalização da inibição do crescimento por contato entre as células, perdidas nas neoplasias.
- **Regulação da transdução** – O anti-oncogene NF-1 age inativando a proteína do proto-oncogene ras. Esta proteína é um transdutor, que tem como função levar ao núcleo a informação de que a célula está sendo estimulada por fatores de crescimento ligado aos receptores de membrana. Em casos de inativação do NF-1 por mutação ou deleção, o sinal transdutor não será inibido, gerando estímulo contínuo para a célula entrar em mitose.

- **Regulação da transcrição do DNA** – Os anti-oncogenes Rb e p53 são o protótipo deste grupo. O gene Rb foi o primeiro anti-oncogene a ser descoberto, durante estudos do retinoblastoma, neoplasia maligna da retina. A proteína codificada pelo gene Rb ou gene Rb atua impedindo a célula de sair dos estágios G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> e entrar na fase S do ciclo celular. Quando a célula sofre estímulos mitogênicos, a proteína codificada pelo gene Rb é inativado, permitindo a progressão do ciclo proliferativo, porém antes da formação das células-filhas, esta volta a sua forma ativa, impedindo que o ciclo continue indefinidamente. Quando este gene é inativado (por ex. pelo vírus HPV e SV40) não há esse bloqueio e a célula atinge a sua “i mortalização”.

**O p53** - é um dos genes responsáveis pela integridade do genoma. É ativado pelo surgimento de DNA alterado, através de mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. Sua ativação produz uma proteína que estimula a síntese de outras proteínas, que vão atuar inibindo a replicação celular através da ligação com o antígeno de proliferação nuclear (PCNA) e estimulando as enzimas de reparo do DNA. Caso o reparo do DNA seja completo, o p53 é inativado e a célula retorna ao estado normal. Caso não haja reparo satisfatório, a célula permanece impedida de replicar e é induzida a apoptose.

Cientistas sabem agora que as células geralmente morrem por apoptose, frequentemente pela ativação da p53. Células em que faltam a p53 ou que produzem altos níveis da proteína inibidora Bcl-2, podem, assim, tomarem-se imunes aos efeitos dos tratamentos contra câncer e prosperar em metástase.

A apoptose é obtida por meio de uma rota ativa que executa um programa de morte celular, e os componentes da rota podem estar presentes em muitas ou em todas as células eucarióticas (BUDILON, 1995 ; LEWIN, 2001).

Segundo Godar (apud MARTINES, 2003), ocorrem três termos referentes a apoptose: imediata, intermediária e tardia. Apoptose imediata é provocada em menos de meia hora e é um mecanismo pré -MCP (morte celular programada), isto é , não requer síntese de proteínas. Apoptose intermediário ocorre dentro de quatro horas, mas requer mais que meia hora para iniciar; de acordo com Wang apud Martines (2003) é um

mecanismo pré - MCP. Apoptose tardia ocorre após 4 horas (podendo levar dias) sendo um mecanismo MCP, dependendo de síntese de proteínas.

### 3. OBJETIVOS

- Comparar a ação do veneno total e frações da *Cdt* sobre a proliferação celular.
- Avaliar a ação do veneno total em diferentes concentrações na atividade mitocondrial das células Hep-2.
- Avaliar o tipo de morte celular ocasionada por diferentes concentrações do veneno total.
- Analisar as frações do veneno de *Cdt* que são citotóxicas para as células Hep-2.

## **4. MATERIAIS**

### **4.1 Linhagem Celular**

A linhagem utilizada foi Hep-2 (carcinoma epidermóide da laringe, de um homem de 56 anos) (câncer Res. 15: 598, 1955) adquirida do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em garrafas plásticas *Nunc* 25 cm<sup>2</sup>, utilizando o Meio Mínimo Essencial (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1 % de antibiótico *Antibiotic Antimycotic* (Gibco), mantidas em incubadora (*Forma Scientific*), com controle automático de temperatura (37°C), a uma atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>. No procedimento padrão das sub culturas, foi utilizado a técnica de tripsinização.

### **4.2 Meio de Cultura (Gibco BRL)**

MEM – Meio Mínimo Essencial, na composição deste meio de cultura são encontrados todos os aminoácidos fundamentais, D-glicose, indicador vermelho de fenol, vitaminas e sais inorgânicos. Conservado em câmara fria de 2 a 8°C.

### **4.3 Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco BRL)**

Utilizado na suplementação de meios de cultura. Em sua composição básica encontra-se insulina, hormônios e fatores de crescimento. A solução estoque foi conservada em freezer a -20°C.

#### **4.4 Crescimento e Manutenção de Culturas Celulares**

As células estocadas em nitrogênio líquido foram preparadas em uma garrafa de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (*Nunc*); contendo 1 mL de cultura de células ( $\sim 10^6$  células/mL) e adicionadas a 2 mL de meio de cultura, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL). A mistura foi então incubada a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Foram monitorizadas no microscópio óptico, livres de contaminação e a cada dois dias foi trocado o meio. Estas células foram subcultivadas através de tripsinização, quando a densidade de célula formava uma monocamada confluenta.

#### **4.5 Veneno**

O veneno total e as frações do mesmo foram gentilmente cedidos pelo Serpentário do Centro de Estudos da Natureza (CEN) da UNIVAP.

Nos experimentos foi utilizados o veneno total das serpentes jovens (1 mês) *Crotalus durissus terrificus* e as frações do veneno das serpentes adultas da *Crotalus durissus terrificus*.

#### **4.6 Tampão Fosfato 0,2 M (Anexo 01)**

#### **4.7 Tampão Fosfato Salina (PBS) pH 7,0 (Anexo 01)**

#### **4.8 Tampão Phem – Solução estoque pH 6,8 (Anexo 01)**

**4.9 Tripsina – Solução estoque pH 7,2** (Anexo 01). A tripsina é uma protease que digere as proteínas, desdobrando-as em polipeptídeos de peso variável, destruindo a trama protéica que liga as células umas às outras. A este processo denomina-se tripsinização (CARVALHO, 1996).

**4.10 MTT - (Sigma)** Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol - 2 -il)- 2,5 - difenil tetrazólio - Solução estoque: 5 mg / mL.

**4.11 DAPI - (Molecular Probes Inc. USA.)** - 4', 6 - Diamidino - 2 - fenilindol. Concentração de 300 nM.

**4.12 Luciferin - Luciferase -(ATP-Sigma).** Solução estoque : 10 mg / mL.

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Fracionamento do veneno da *Cdt*

O veneno da *Cdt* (75mg) foi dissolvido em tampão 50 mM Tris-HCL, pH 7,5 e centrifugado (13.000xg, 3 min). O sobrenadante foi aplicado a uma coluna (1.6 cm x 70 cm) de superdex 75 equilibrada com o mesmo tampão. O veneno foi eluído com tampão Tris (30mL/h, 2mL/fração) e o perfil de eluição foi monitorado a 280 nm. Foram obtidas sete frações (F1,F2, F3, F4, F5, F6, F7), os quais foram testados para atividade fosfolipásica (Beghini *et al.*, 2000) e citotoxicidade. A concentração protéica das frações foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951), usando-se a albumina bovina como padrão. O procedimento foi realizado no laboratório do Dr. Stephen Hyslop no Departamento de Farmacologia da Unicamp - Campinas - SP.

### 5.2 TESTE DO MTT (Viabilidade Celular)

Este teste consiste na avaliação na atividade mitocondrial de células viáveis a partir da presença da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. A presença dessa enzima ocasiona uma reação com o MTT, formando cristais de formazana, que após a dissolução desses cristais, com o solvente orgânico (DMSO), foi realizada uma leitura espectrofotométrica. A densidade óptica obtida é diretamente proporcional ao número de células vivas.

As células Hep-2 foram plaqueadas ( $5 \times 10^4$  células / poço) em placa *Nunc* de 96 poços e mantida por 24 horas em meio MEM com 10% SFB e 1 % de antibiótico em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> para sua adesão. As células foram separadas em dois grupos: **controle** e **tratadas**. As células tratadas foram incubadas com o veneno total

de serpentes jovens, nas seguintes concentrações: 1, 5, 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$  por um período de 1, 4, 8 e 24 horas. Em um outro experimento, seguindo o mesmo protocolo acima, só que com concentrações de 0.5, 1 e 5  $\mu\text{g/mL}$  em 24, 48 e 72 horas.

Com as frações: F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 do veneno da *Cdt* (Fracionamento citado acima), as células foram incubadas com a concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  pelo período de 1, 4, 8 e 24 horas e concentrações de 0.5, 1 e 5  $\mu\text{g/mL}$  por um período de 24 e 48 horas.

Após o período de incubação devida com o veneno, o meio foi removido cuidadosamente e o MTT foi adicionado em 10  $\mu\text{L}$  / poço de MTT + 90  $\mu\text{L}$  / poço do meio (concentração final do MTT de 0.5  $\text{mg/mL/poço}$ ), e as placas incubadas mais uma vez por 3 horas em 37°C com 5% de  $\text{CO}_2$ . Durante esse período o MTT foi convertido a um sal formazana, insolúvel em água, pela atividade metabólica das células viáveis. Sobre os precipitados de formazana adicionou-se o solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO - 200  $\mu\text{L}$  / poço) e a placa foi mantida sob agitação para a solubilização dos cristais de formazana por 15 minutos. Após todos os cristais serem dissolvidos a densidade ótica (OD) foi medida em um espectrofotômetro, *Spectra Count<sup>™</sup> Packard*, usando comprimento de onda de absorbância de 570 nm. Após este tratamento os resultados foram plotados no programa *GraphPad Prism* com média e desvio padrão de 2 experimentos com amostras em triplicata.

## 5.3 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Análises feitas ao microscópio de fluorescência revelaram que moléculas fluorescentes absorvem luz em um determinado comprimento de onda emitindo um comprimento de onda mais longo (ALBERTS *et al*, 1997 ; REICHMAN, 2000).

Os indicadores de fluorescência, os fluóforos, utilizados para produzir fluorescência nas células (ou no material em estudo), ajudam a visualizar com maior nitidez estruturas e processos celulares em uma área específica da amostra a ser observada ou para responder a um estímulo específico (WHEATLY ; WANG, 1998).

O microscópio de fluorescência é semelhante ao microscópio óptico comum, exceto que a luz utilizada, passa por dois conjuntos de filtros, um para filtrar a luz antes dela atingir a amostra e o outro para filtrar a luz obtida da amostra. O primeiro filtro é selecionado de forma a permitir apenas a passagem de comprimento de onda que excitem o corante fluorescente, enquanto o segundo filtro bloqueia a passagem desta luz, permitindo somente a passagem daqueles comprimentos de onda emitidos pelo corante (ALBERTS *et al*, 1997).

### 5.3.1 Detecção do veneno no interior da célula

Para identificar o veneno dentro da célula, foi feito um teste, onde as células Hep-2 plaqueadas  $1 \times 10^4$ , em uma placa de 24 poços, controle e células tratadas cultivadas em lamínulas sofreram a incubação com o veneno total da *Cdt* jovem na concentração de 0.5 µg/mL, e completado para 200 µL do meio por um período de 2 horas com os seguintes intervalos: 15', 30', 1h, 1 ½h e 2 horas, em estufa a 37°C e em uma atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com tampão , para a remoção de todo o meio e fixadas com paraformaldeído a 4% por 15 minutos, a montagem das lamínulas foi feita em lâminas com N-propil galato e vedadas com

esmalte incolor e a análise foi realizada em microscópio de epifluorescência, modelo *Leica DMLB* com sistema fotográfico *Leica MPS-30*. Foram feitas fotomicrografias do material.

Em alguns poços, as células continuaram incubadas com o veneno por um período de 72 horas. Após este período o meio com o veneno foi removido e meio novo foi acrescentado nessas células. Análise foi feita pelo microscópio óptico.

### 5.3.2 Marcação para o Núcleo - DAPI

O DAPI é marcador fluorescente específico para ácido nucléico, associado com o complexo da Adenina - Timina. A ligação DAPI e DNA aumentam sua fluorescência em aproximadamente 20 vezes, devido ao deslocamento de moléculas de água do DAPI (DAPI, 2002).

As células Hep-2 submetidas ao tratamento com 0.5 , 1 e 5  $\mu$ g/mL do veneno total da serpente *Cdt* jovem, foram plaqueadas ( $1 \times 10^4$ ) em uma placa *Nunc* de 24 poços por um período de 24, 48 e 72 horas. Foram fixadas com paraformaldeído a 4 % em 0,1 M de tampão fosfato (pH7,2) por 10 minutos e foram lavadas com PBS. Adicionou-se 50  $\mu$ L de DAPI em uma concentração final de 300 nM, incubou-se por 10 minutos e lavou-se com PBS. A seguir as lamínulas foram montadas sobre lâminas contendo N-propil galato, vedadas com esmalte na periferia da lamínula. Realizou-se toda manipulação do material ao abrigo de luz. As lâminas foram analisadas em Microscópio de Fluorescência *Leica DMLB* utilizando o filtro de excitação em aproximadamente de 358 nm e emissão de 461 nm.

### 5.3.3 Teste Luciferin – Luciferase (ATP)

A bioluminescência é o resultado de uma reação química que envolve diversos componentes: luciferina, luciferase, ATP e oxigênio. Estes se combinam para formar um produto excitado, capaz de emitir luz.

Uma molécula de luciferina é oxidada por oxigênio, em presença de ATP (trifosfato de adenosina), ocorrendo assim à formação de uma molécula de oxiluciferina, que é uma molécula energizada. Esse processo só ocorre na presença da luciferase, que é a enzima responsável pelo processo de oxidação.

Para cada molécula de ATP consumida durante a reação, um fóton de luz é emitido. Portanto, a quantidade de luz emitida indica os números de moléculas de ATP intracelular (LUCIFERIN, 2001).

Foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  células/mL em placas *Nunc* de 24 poços contendo lamínulas, as quais foram cultivadas em meio MEM suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico, incubadas "overnight" a 37°C em atmosfera 5% de CO<sub>2</sub>.

As células foram incubadas com o veneno total da *Cdt* jovem nas concentrações de: 0,5, 1 e 5 µg / mL por 24 e 48 horas e o controle celular mais o meio, a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para que pudesse ocorrer o metabolismo celular. Este teste tem sido usado para a detecção de ATP.

Passado o tempo as lamínulas foram lavadas com tampão PHEM e foi acrescentado nas lamínulas 20 µL de luciferin -luciferase (concentração final 10 mg/mL) por 20 minutos no escuro, em seguida lavado novamente com tampão e fixado por 5 minutos com paraformaldeído a 4%, lavado com tampão para a completa remoção do fixador e em seguida as lâminas foram montadas utilizando-se n-propil-galato e vedadas com esmalte incolor. Foram feitas fotomicrografias do material em microscópio de epifluorescência modelo *Leica DMLB* com sistema fotográfico *Leica MPS-30*.

## 5.4 Análise Estatística

Após a verificação de cada experimento, procedeu-se a comparação das médias das amostras tratadas com um controle não tratado por análise de variância. Quando esta estatística resultou significativa ( $P < 0,05$ ) foram efetuadas comparações entre as médias seguindo o método t de *Student* (Zar, 1984). O limite máximo de significância considerado foi sempre de 5%. Foi considerado estatisticamente significativo quando  $P < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

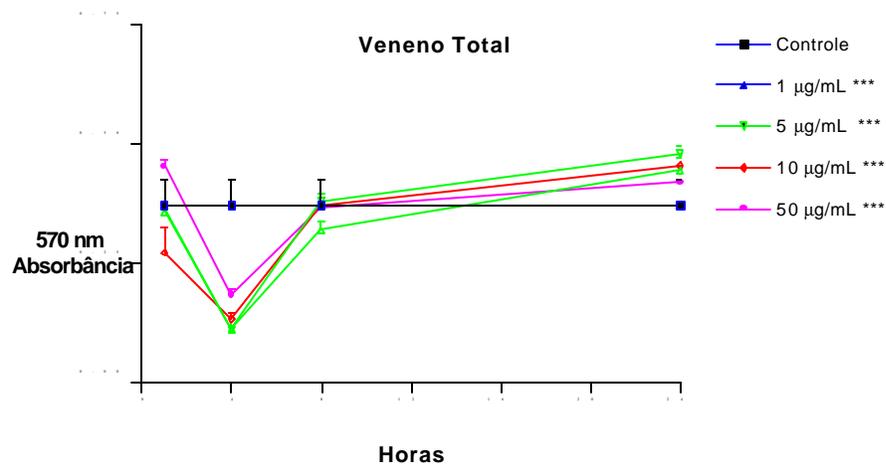
A vantagem da cultura celular, é que o resultado pode ser obtido com poucas células, e o veneno total da serpente *Cdt* jovem e as frações do veneno da serpente *Cdt* adulta puderam ser aplicados numa concentração determinada por período de tempo conhecido.

Neste estudo foi importante examinar a atividade do veneno total, antes de investigar cada componente purificado em células Hep-2.

O teste MTT foi aplicado para analisar a citotoxicidade do veneno total da serpente *Cdt* jovem e as frações da serpente *Cdt*, frente à linhagem celular Hep-2 nas diferentes concentrações e em diferentes tempos.

### 6.1 VENENO TOTAL DA *Cdt* JOVEM

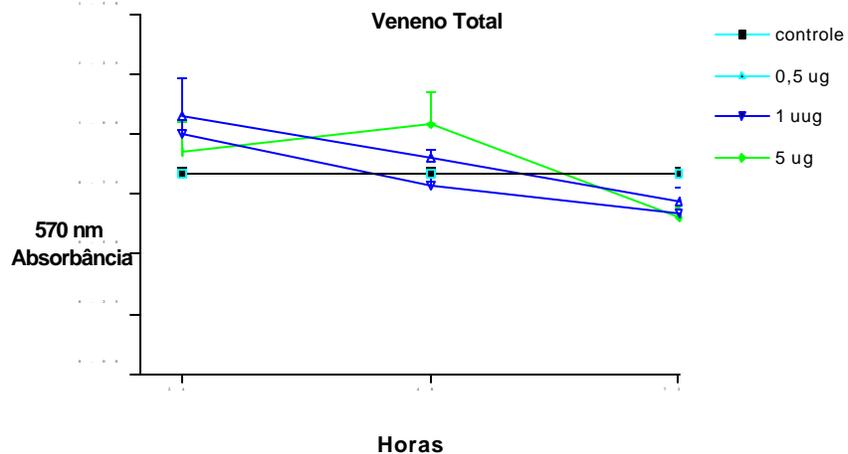
O teste MTT foi aplicado primeiramente para analisar a citotoxicidade do veneno total da *Cdt* jovem nas diferentes concentrações (1; 5; 10 e 50  $\mu$ g/mL) frente à linhagem Hep-2, por um período de 1, 4, 8 e 24 horas.



**Figura 5.** Avaliação da atividade celular após a incubação do veneno total da serpente *Cdt* jovem em função das concentrações crescentes de 1, 5, 10 e 50 µg/mL em linhagem celular Hep-2 por 1, 4, 8 e 24 horas. Média e desvio padrão foram obtidos de 2 experimentos em triplicata. O teste *t student* foi realizado para verificar a significância das amostras. A análise foi feita pela metodologia do MTT. Onde \*\*\*  $P < 0,001$ .

O veneno total da *Cdt* jovem frente à linha celular Hep-2, mostrou que a atividade celular diminuiu na 4ª hora e já na 8ª hora volta ao normal e em 24 horas a viabilidade celular foi maior que o controle (células não tratadas).

O teste seguinte foi aplicado com o veneno total da *Cdt* jovem nas concentrações (0,5, 1 e 5 µg/mL) frente à linhagem Hep-2, por um período de 24, 48 e 72 horas.



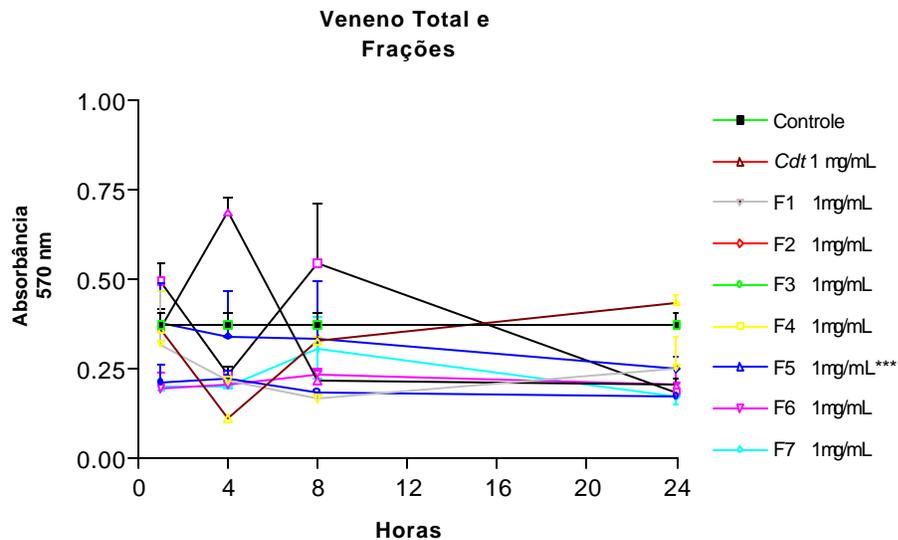
**Figura 6.** Avaliação da atividade celular após a incubação do veneno total da serpente *Cdt* jovem em função das concentrações crescentes de 0,5, 1 e 5  $\mu$ g/mL em linhagem celular Hep-2 por 24, 48 e 72 horas. Média e desvio padrão foram obtidos de 2 experimentos em triplicata. O teste *t student* foi realizado para verificar a significância das amostras. A análise foi feita pela metodologia do MTT.

Houve um declínio na viabilidade celular em um período de 72 horas, mas este declínio não foi significativo ( $P > 0,05$ ).

## 6.2 FRAÇÕES DO VENENO DA SERPENTE *Cdt*

Além do veneno, foi também avaliada a atividade citotóxica das sete frações obtidas na coluna filtração, sendo que destas a fração 5 (F5), a principal e que corresponde a crotoxina, continha atividade fosfolipásica  $A_2$ .

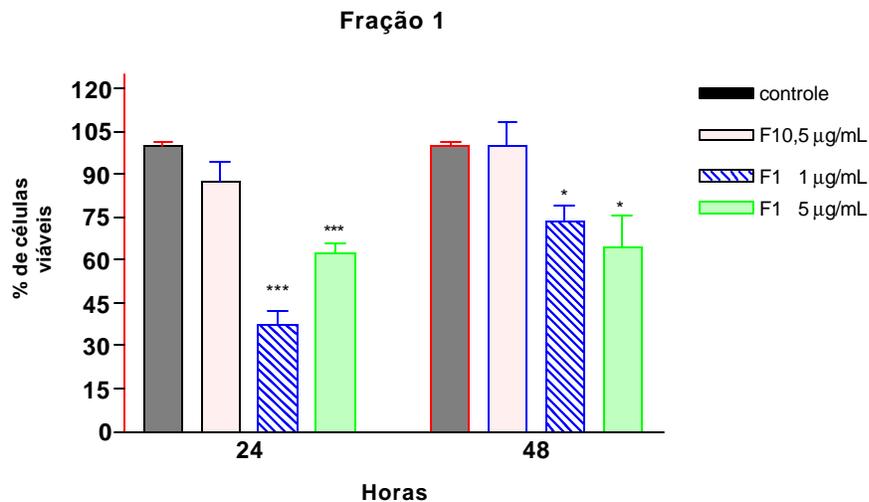
Para comparar a ação do veneno total e frações da *Cdt* sobre a proliferação celular no tempo de 1, 4, 8 e 24 horas na concentração de 1  $\mu$ g/mL, foi possível observar que as frações purificadas conferem uma citotoxicidade na linha celular Hep-2.



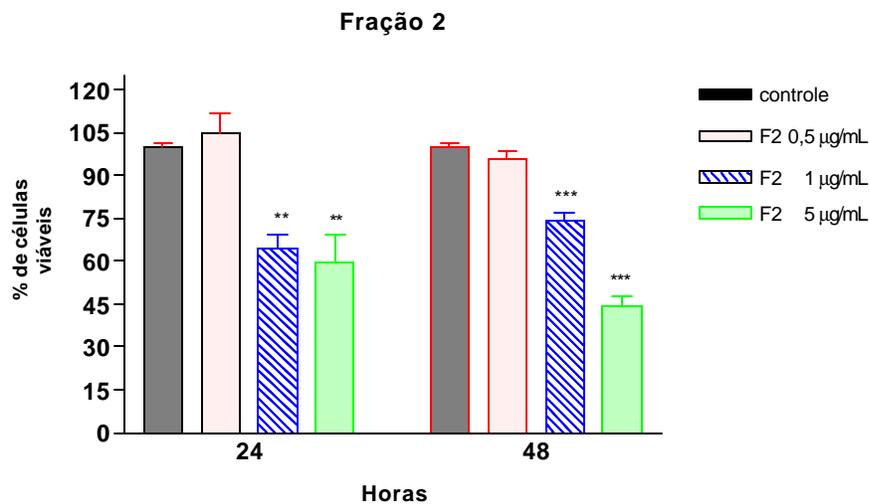
**Figura 7.** Avaliação da atividade celular após a incubação do veneno total da serpente *Cdt* jovem comparando com as sete frações da serpente *Cdt* adulta na concentração de 1  $\mu$ g/mL em linhagem celular Hep-2 por 1, 4, 8 e 24 horas. Média e desvio padrão foram obtidos de 2 experimentos em triplicata. O teste t *student* foi realizado para verificar a significância das amostras. A análise foi feita pela metodologia do MTT. Onde \*\*\*  $P < 0,001$ .

Na 1ª hora a F3, F6 e F7 apresentaram ~50 % de células mortas. Na 4ª hora a F1, F3, F4, F6 e F7 apresentaram ~ 45% das células mortas. Na 8ª hora a F1, F3, F5 e F6 apresentaram entre 45 % a 60 % de células mortas e já em 24 horas as frações: F3, F4, F5, F6 e F7 apresentaram entre 45 % a 55 % de células mortas. As Frações F3 e F6 apresentaram em torno de 50% de células mortas em todos os tempos avaliados. Em 24 horas, as células incubadas com as frações do veneno da *Cdt*, somente a F1 e F2 demonstram estar viáveis acima de 70 % e as restantes das frações estavam mortas em torno de ~50% ( $P < 0,05$ ). O teste t *student* considerou também significativo ( $P < 0,0001$ ) a F5 na 4ª hora onde houve uma proliferação celular (97 % na 1ª hora a 183 % na 4ª hora), e nas outras horas ocorreu um declínio na viabilidade dessas células, tornando-se mortas em torno de 50%.

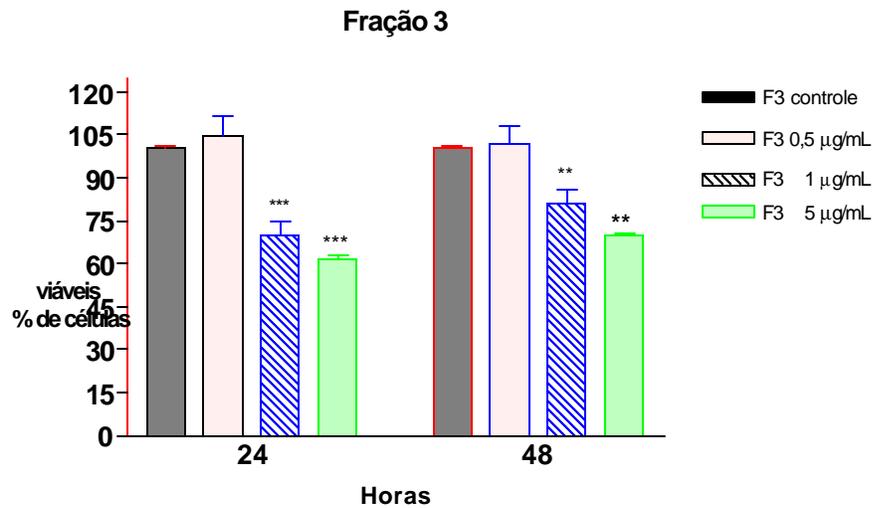
Com as mesmas frações do veneno da serpente *Cdt*, foi aplicado o teste com o mesmo objetivo de analisar a citotoxicidade frente à linhagem Hep-2, nas diferentes concentrações (0.5, 1 e 5  $\mu$ g/mL), por um período de 24 e 48 horas.



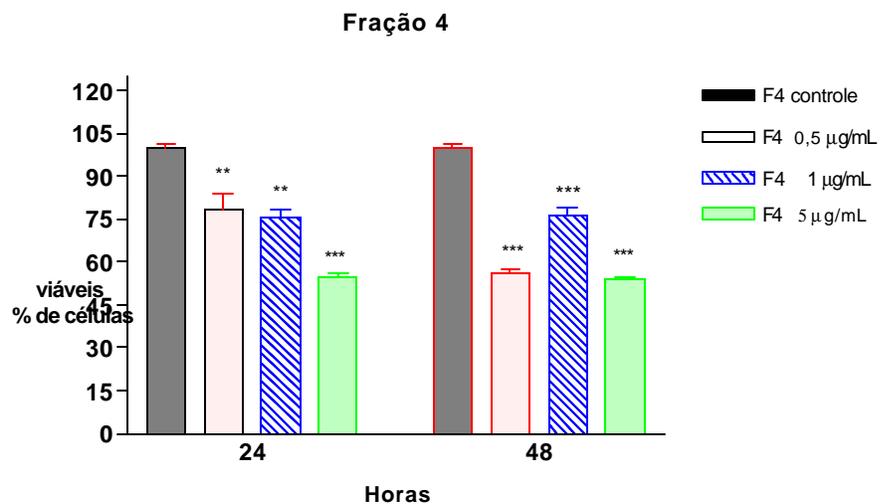
**Figura 8.** Viabilidade das células Hep-2 frente a fração 1 do veneno da serpente *Cdt* até 48 horas em função da concentração de 0,5, 1 e 5 µg / mL. Média e desvio padrão foram obtidos de 2 experimentos em triplicata. O teste t *student* foi realizado para verificar a significância das amostras. A análise foi feita pela metodologia do MTT. Onde \* P < 0,05 e \*\*\* P < 0,001.



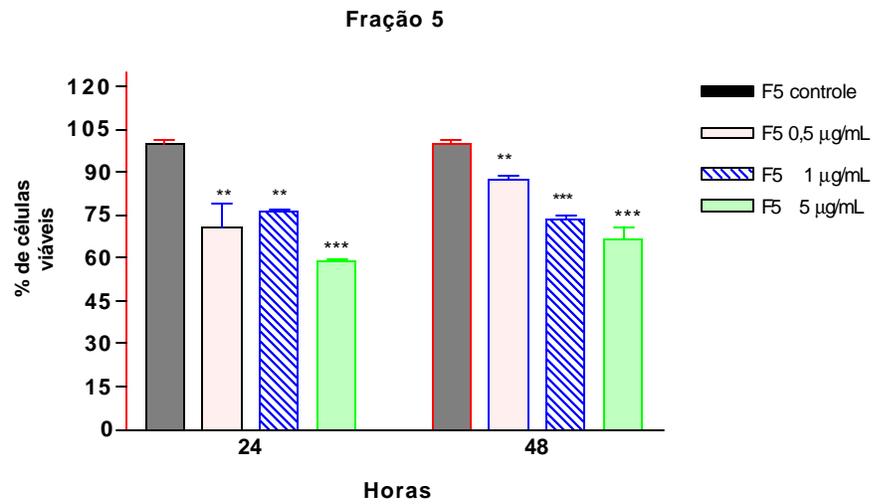
**Figura 9.** Viabilidade das células Hep-2 frente a fração 2 do veneno da serpente *Cdt* até 48 horas em função da concentração de 0,5, 1 e 5 µg / mL. Média e desvio padrão foram obtidos de 2 experimentos em triplicata. O teste t *student* foi realizado para verificar a significância das amostras. A análise foi feita pela metodologia do MTT. Onde \*\* P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001.



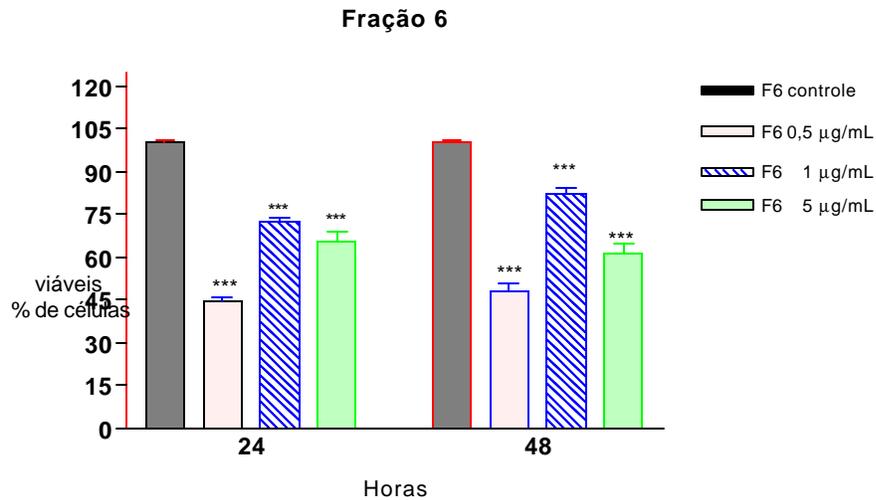
**Figura 10.** Viabilidade das células Hep-2 frente a fração 3 do veneno da serpente *Cdt* até 48 horas em função da concentração de 0,5, 1 e 5  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Média e desvio padrão foram obtidos de 2 experimentos em triplicata. O teste *t student* foi realizado para verificar a significância das amostras. A análise foi feita pela metodologia do MTT. Onde \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$ .



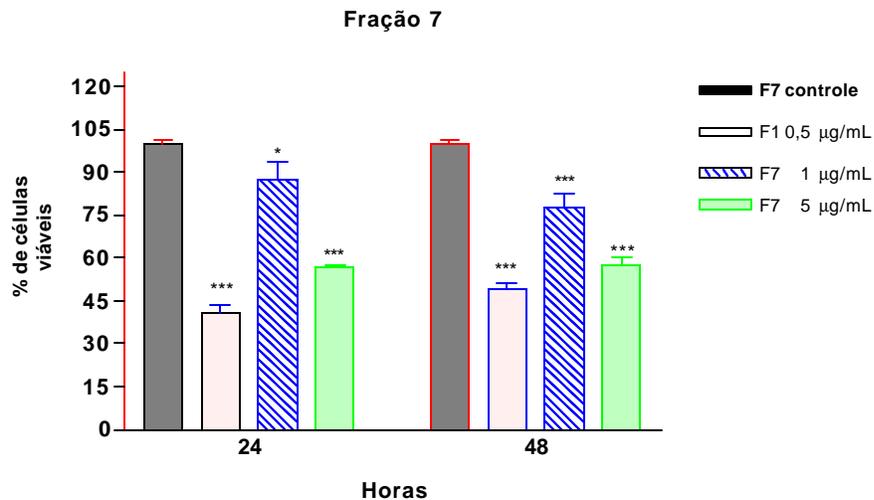
**Figura 11.** Viabilidade das células Hep-2 frente a fração 4 do veneno da serpente *Cdt* até 48 horas em função da concentração de 0,5, 1 e 5  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Média e desvio padrão foram obtidos de 2 experimentos em triplicata. O teste *t student* foi realizado para verificar a significância das amostras. A análise foi feita pela metodologia do MTT. Onde \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$ .



**Figura 12.** Viabilidade das células Hep-2 frente a fração 5 do veneno da serpente *Cdt* até 48 horas em função da concentração de 0,5, 1 e 5 µg / mL. Média e desvio padrão foram obtidos de 2 experimentos em triplicata. O teste t *student* foi realizado para verificar a significância das amostras. A análise foi feita pela metodologia do MTT. Onde \*\* P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001.



**Figura 13.** Viabilidade das células Hep-2 frente a fração 6 do veneno da serpente *Cdt* até 48 horas em função da concentração de 0,5, 1 e 5 µg / mL. Média e desvio padrão foram obtidos de 2 experimentos em triplicata. O teste t *student* foi realizado para verificar a significância das amostras. A análise foi feita pela metodologia do MTT. On de \*\*\* P < 0,001.



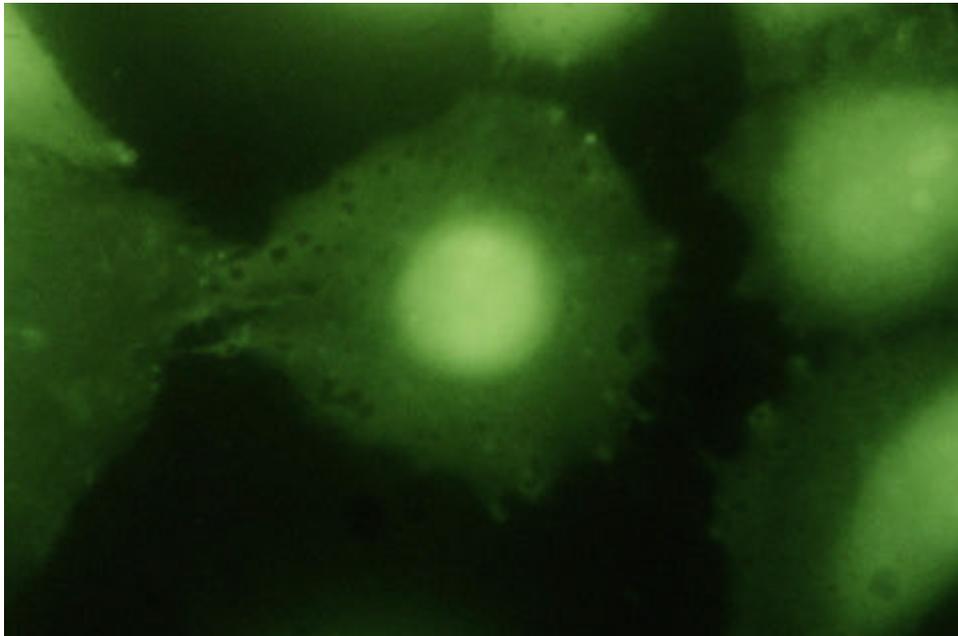
**Figura 14.** Viabilidade das células Hep-2 frente a fração 7 do veneno da serpente *Cdt* até 48 horas em função da concentração de 0,5, 1 e 5  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Média e desvio padrão foram obtidos de 2 experimentos em triplicata. O teste t *student* foi realizado para verificar a significância das amostras. A análise foi feita pela metodologia do MTT. Onde \*  $P < 0,05$  e \*\*\*  $P < 0,001$ .

Na concentração de 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  as frações 1, 2 e 3 não foram significativas nos dois tempos analisados e na F4, F6 e F7 mostraram uma  $DL_{50}$  em 48 horas. Onde as células foram incubadas com a concentração de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , todas as frações foram significativas, tanto em 24 horas como também em 48 horas. Da incubação dessas células com a concentração de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com todas as frações analisadas em 48 horas, ocorreu uma  $DL_{30}$  e com 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a F2, F4 e F7 mostraram uma  $DL_{50}$  e o restante das frações  $DL_{40}$  (F1, F3, F5 e F6).

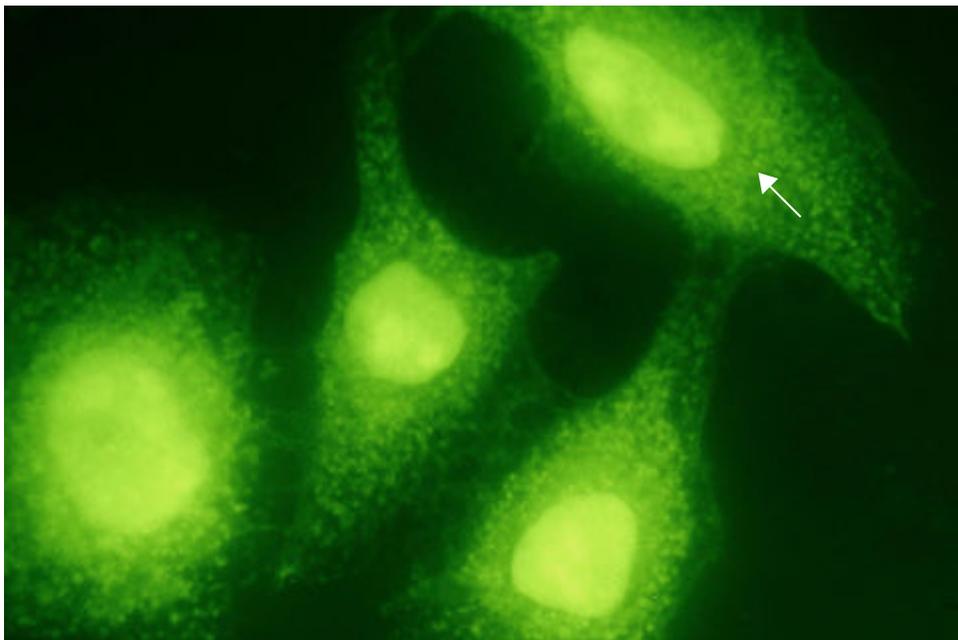
Neste estudo a atividade mitocondrial dessas células foi comprometida frente às frações do veneno da *Cdt*.

### 6.3 Fluorescência

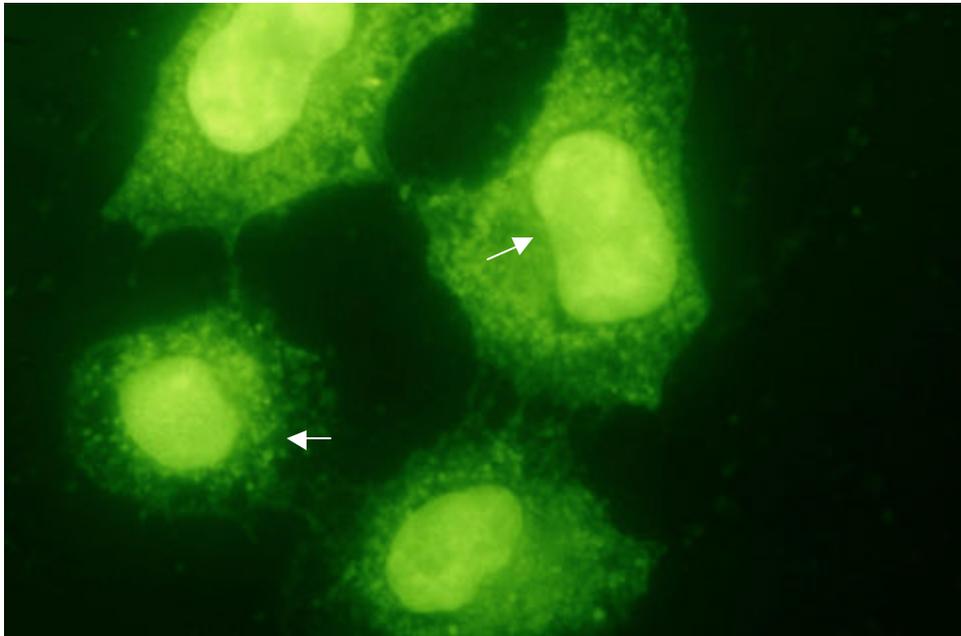
No teste de fluorescência, os nossos resultados indicam que veneno é fluorescente (filtro ultravioleta), por meio da microscopia de fluorescência onde foram realizados os testes com o veneno total da *Cdt* jovem, podendo ser observado pelas fotomicrografias 15, 16, 17, 18, 19, 20 abaixo:



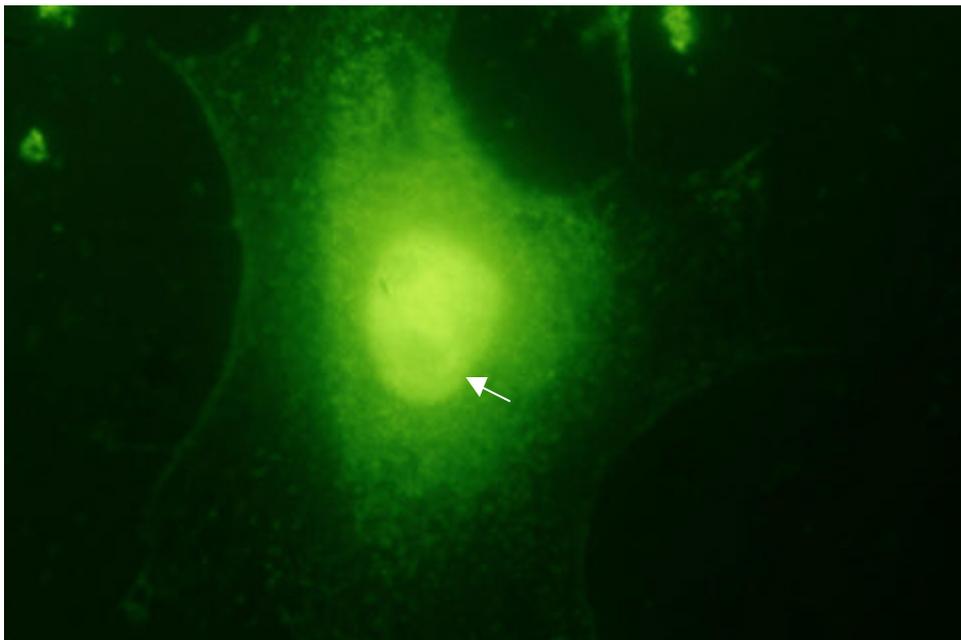
**Figura 15:** Grupo de células Hep-2 controle, sem tratamento. 2.500x.



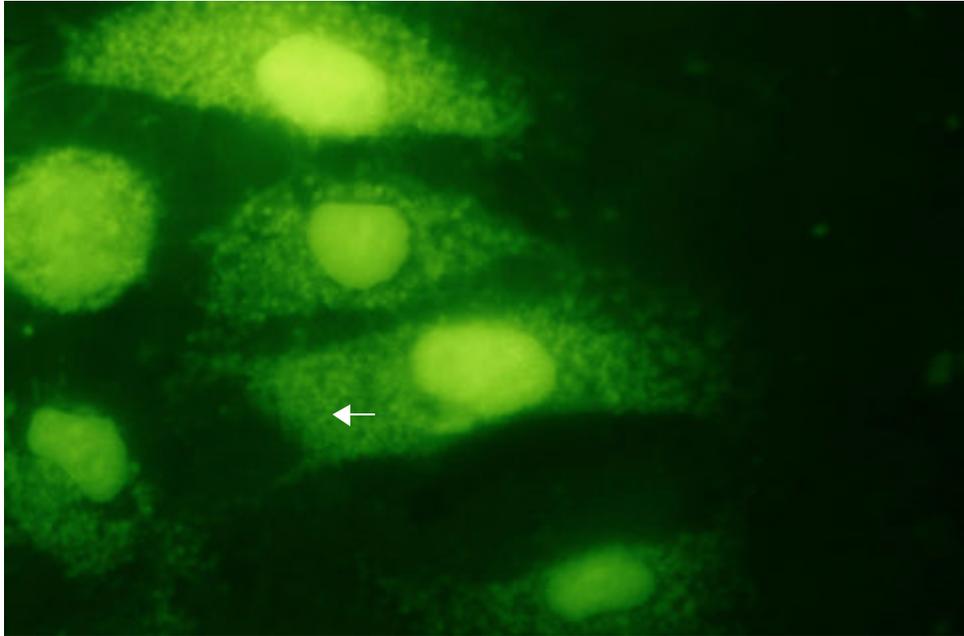
**Figura 16:** Células Hep-2 tratadas com o veneno da *Cdt* jovem (0.5  $\mu$ g/mL) por 15 minutos. Observa-se que o veneno é fluorescente e ocupa toda extensão celular. Conforme seta. 2.500x.



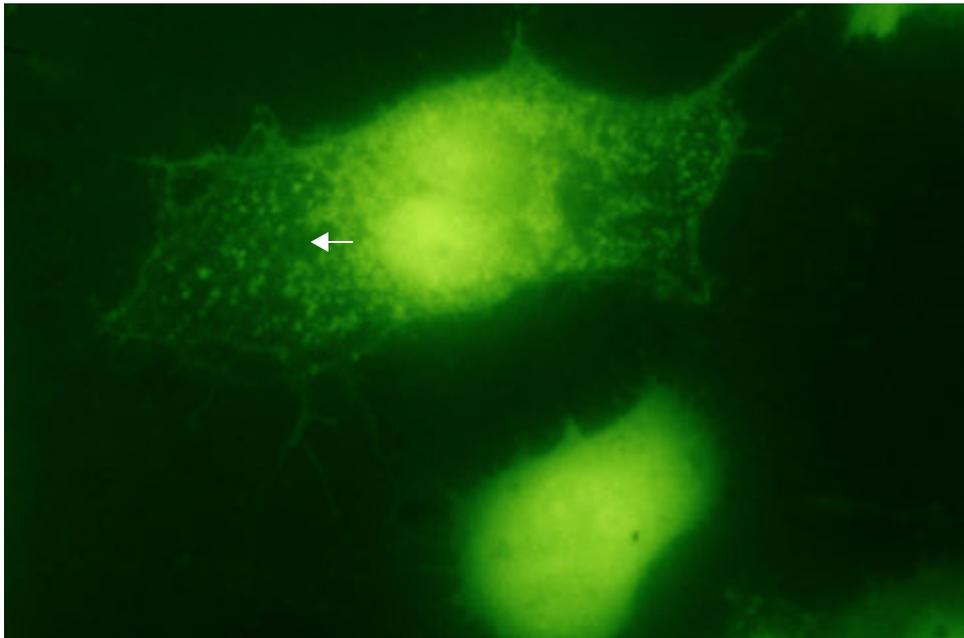
**Figura 17:** As células Hep-2 incubadas com o veneno da *Cdt* jovem (0.5 µg/mL) por 30 minutos, demonstra que o veneno esta em sua maior parte ao redor do núcleo (setas). 2.500x.



**Figura 18:** Incubação do veneno da *Cdt* jovem (0.5 µg/mL) com as células Hep2 por 1 hora. Nota-se que o veneno está concentrado no núcleo. Como mostra a seta. 2.500x.



**Figura 19:** Em 1 ½ hora da incubação das células Hep-2 com o veneno da *Cdt* jovem, percebe-se que o veneno começa a deixar o núcleo e se espalhar pela célula (seta). 2.500x.

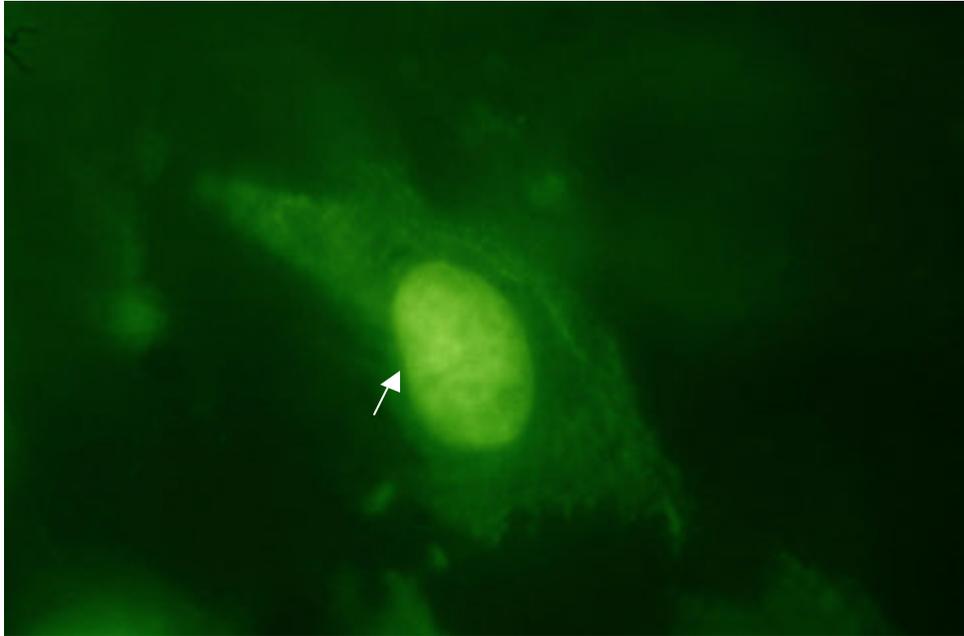


**Figura 20:** Após 2 horas de incubação das células Hep-2 com o veneno da *Cdt* jovem. Observa-se a presença do veneno no citoplasma em grânulos, como mostra a seta. 2.500x.

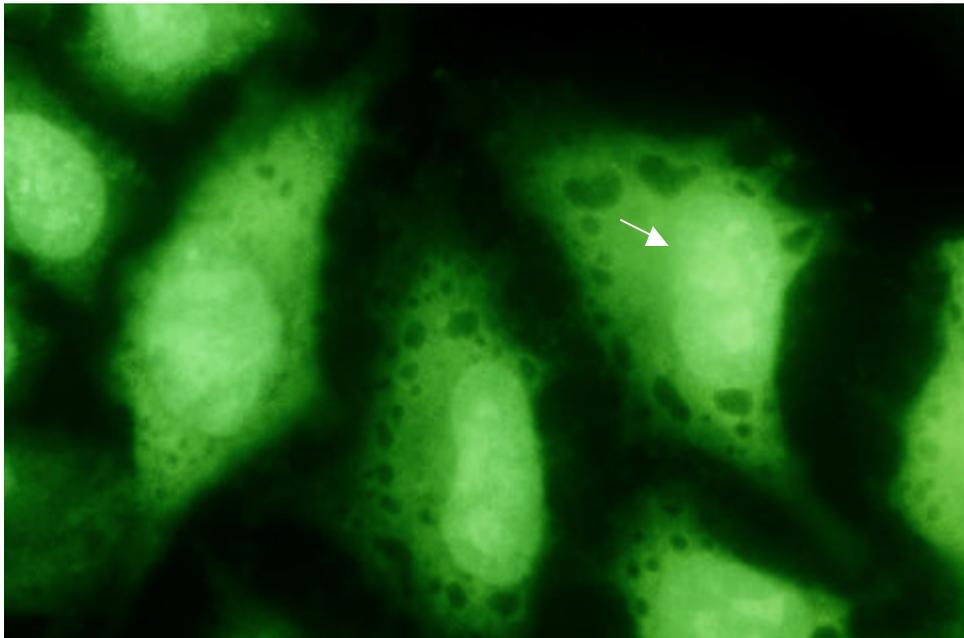
O marcador DAPI nos forneceu informações sobre o núcleo, permitindo assim identificar as alterações após o tratamento das células Hep-2 incubadas com o veneno total da *Cdt* jovem até 72 horas comparadas com as células não tratadas.

O grupo controle não apresentou alterações na estrutura nuclear (observada na figura 21, 22). Esta observação é válida para todos os tempos do controle.

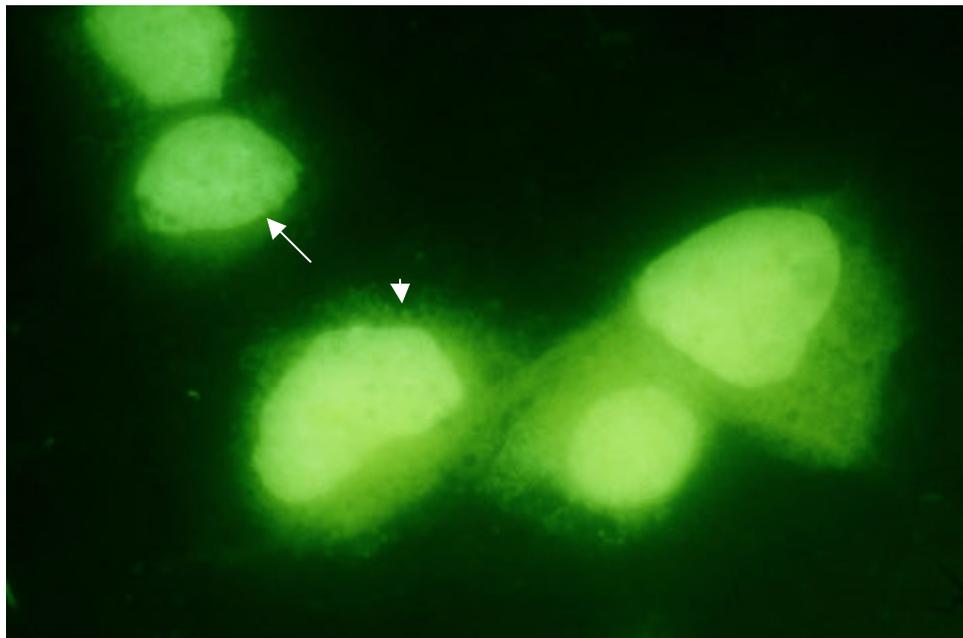
No grupo tratado com o veneno da *Cdt* jovem na concentração de 0,5, 1 e 5 µg/mL por um período de 24 horas, foi constatado a retração celular, devido a diminuição da adesão 24 horas após o tratamento e o comprometimento do núcleo (figura 23). Conforme as fotomicrografias a seguir:



**Figura 21:** Células Hep-2 Controle (sem tratamento) por 24 horas. Marcado com DAPI.. Observa-se núcleo preservado, cromatina e núcleo intacto. como mostra a seta. 2.500x.



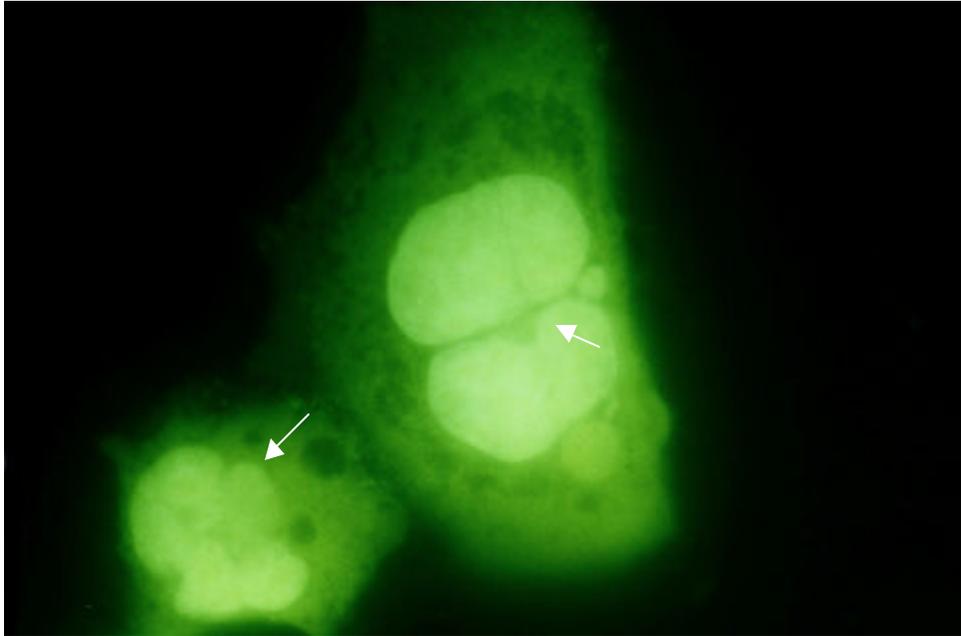
**Figura 22:** Células Hep-2 controle (sem tratamento) por 72 horas. Marcadas com DAPI. Nota-se núcleo intacto. 2.500x.



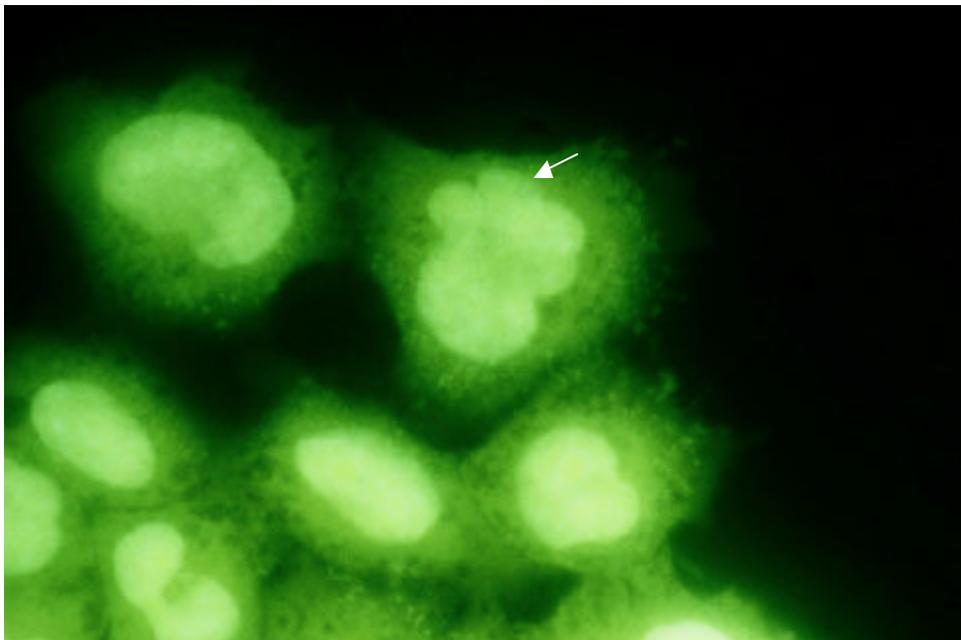
**Figura 23:** Grupo de células Hep-2 tratadas com 0.5  $\mu$ g/mL do veneno da *Cdt* jovem por 24 horas, marcadas com DAPI. Nota-se a retração celular (seta) com alterações morfológicas no núcleo (cabeça de seta). 2.500x.

Após o tratamento com o veneno por 48 e 72 horas ocorreu o comprometimento do núcleo com clara fragmentação do mesmo (figuras: 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30).

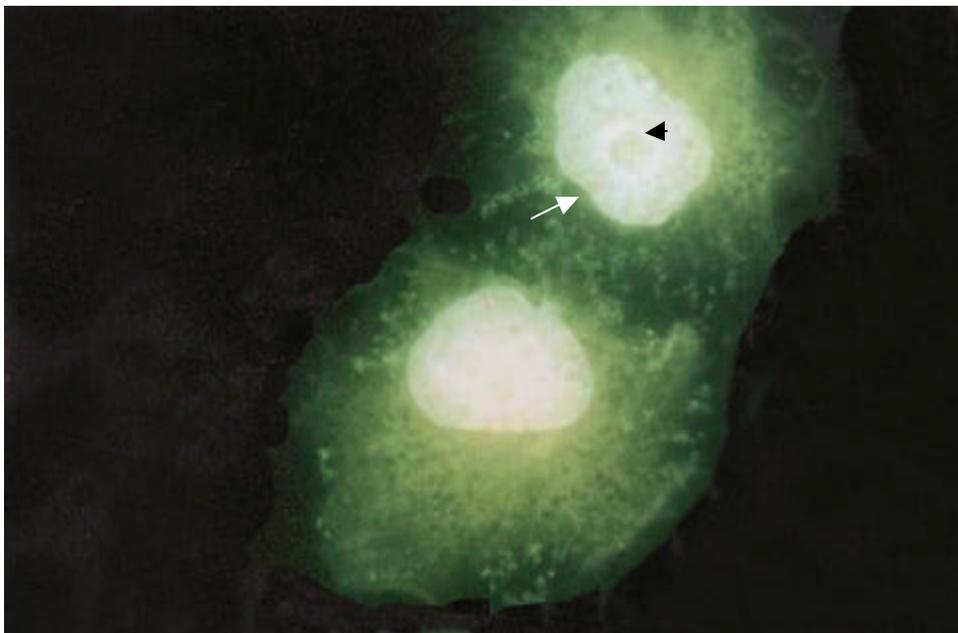
Neste trabalho constatou-se a morte celular em 48 e 72 horas. Como mostra as fotomicrografias a seguir:



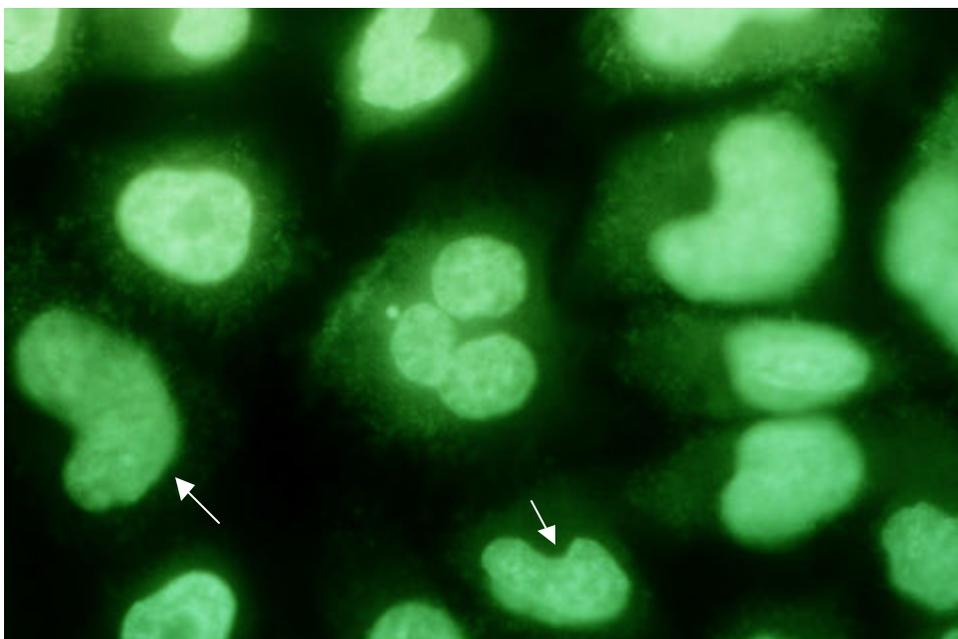
**Figura 24:** Células Hep-2 tratadas com 0.5 µg/mL do veneno da *Cdt* jovem por 48 horas, marcadas com DAPI. Observam-se formações de prolongamentos nucleares conforme mostram as setas. 2.500x.



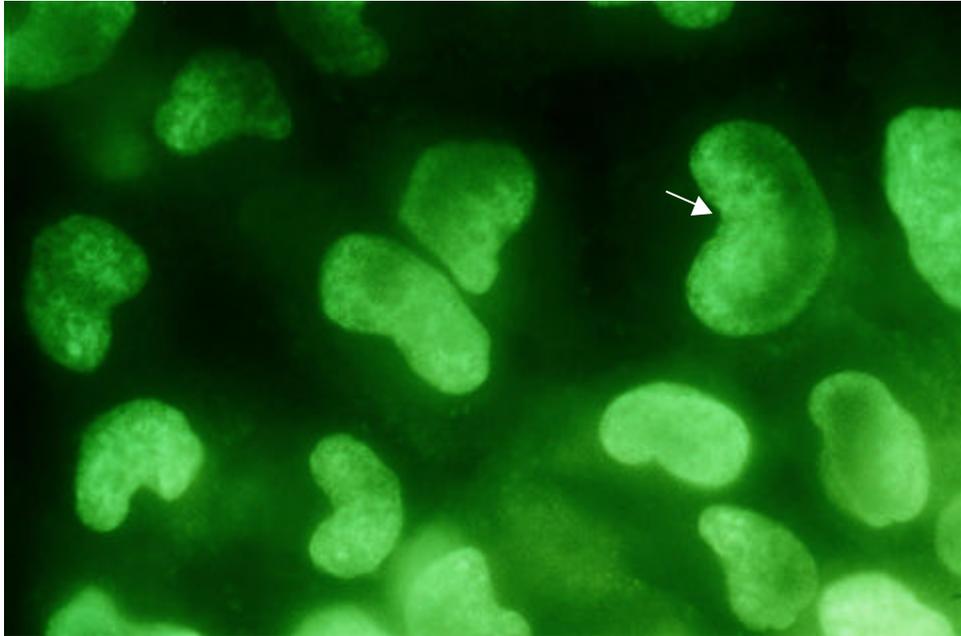
**Figura 25:** Incubação das células Hep-2 tratadas com 0.5 µg/mL do veneno da *Cdt* jovem. Marcadas com DAPI. Nota-se o comprometimento da célula com agregação da cromatina e formação de corpos apoptótico, após 48 horas de tratamento, conforme mostra a seta. 2.500x.



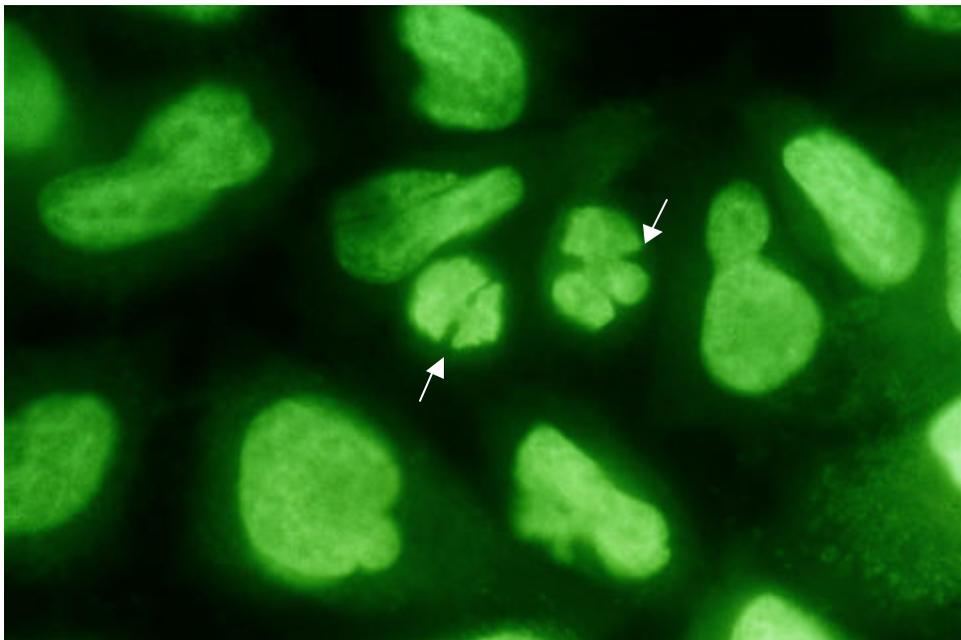
**Figura 26:** O tratamento das células Hep-2 com o veneno da *Cdt* jovem (1  $\mu$ g/mL). Marcadas com DAPI. A célula apresenta alterações morfológicas com perda da integridade nuclear (seta), nucléolo grande e rodeado por um halo (olho de coruja), características de células neoplásicas, conforme mostra a cabeça de seta. 2.500x.



**Figura 27:** No tratamento de células Hep-2 com 0.5  $\mu$ g/mL do veneno da *Cdt* jovem por 72 horas, marcadas com DAPI, foi possível observar retração celular, comprometimento da célula com clara fragmentação do núcleo, conforme as setas. 2.500x.

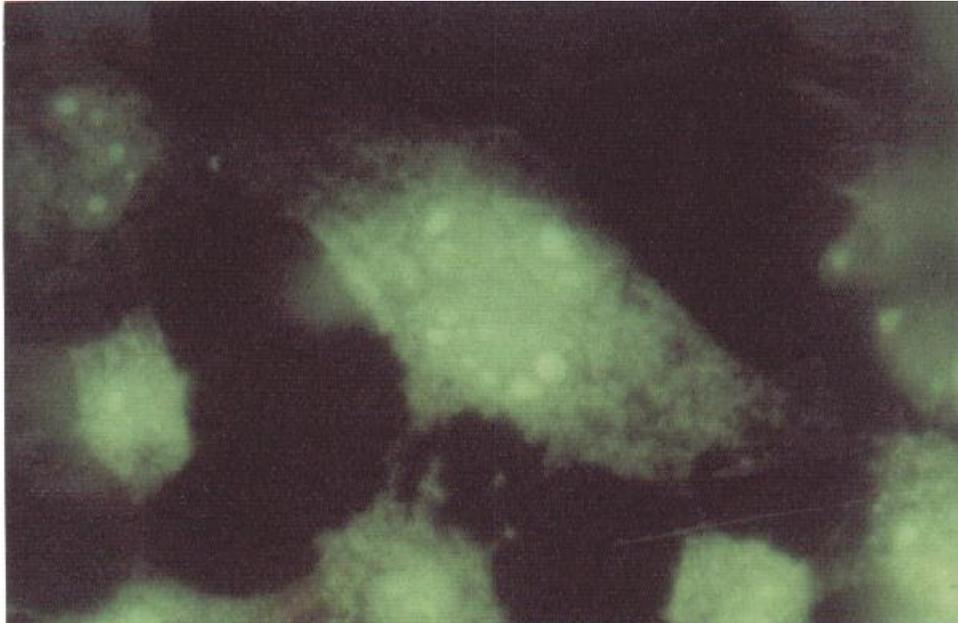


**Figura 28:** As células Hep-2 incubadas com 1 µg/mL do veneno da *Cdt* jovem. Marcadas com DAPI. Podemos observar alterações no núcleo com agregação da cromatina na periferia do núcleo e condensação citoplasmática e nuclear (seta) após 72 horas. 2.500x.

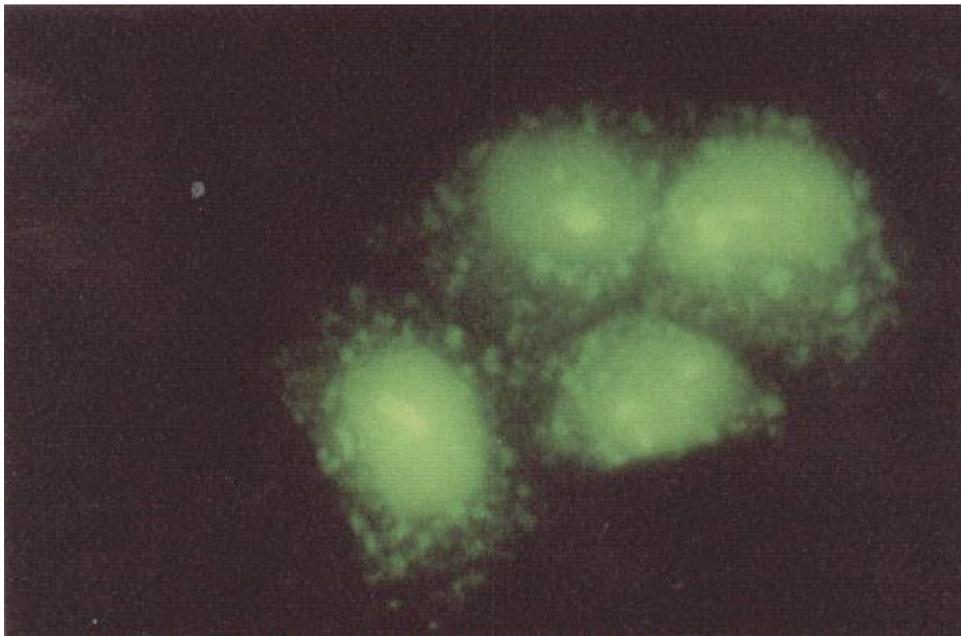


**Figura 29:** Nas células Hep-2 tratadas com o veneno da *Cdt* jovem (5 µg/mL), marcadas com DAPI, foi possível observar os corpos apoptóticos, após 72 horas, conforme mostram as setas. 2.500x.

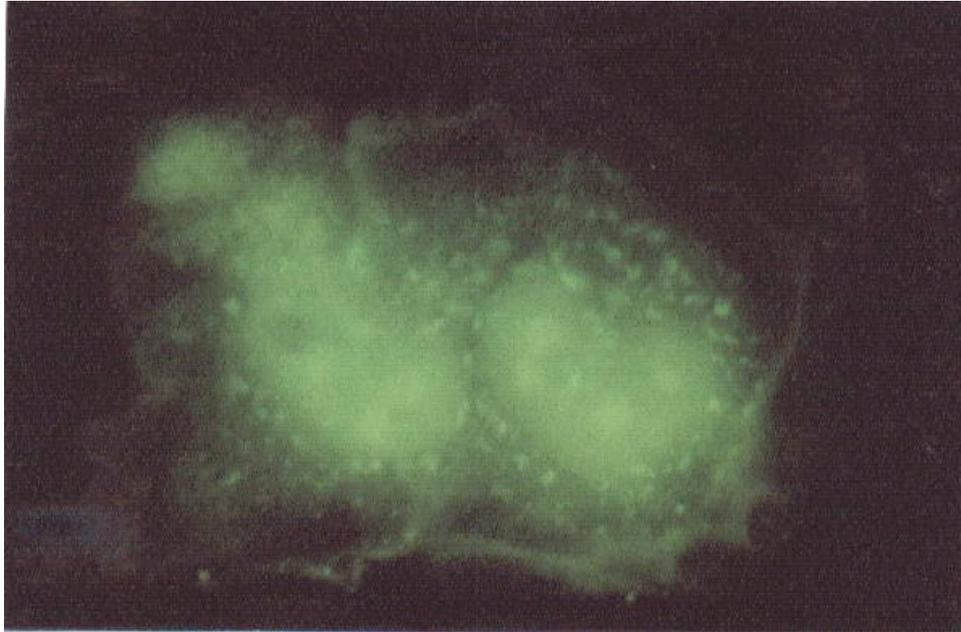
A produção de ATP pode ser observada nas fotomicrografias das figuras 30, 31, 32, 33, 34 na cultura celular Hep-2 incubadas por 24 e 48 horas com o veneno da *Cdt* jovem, conforme pode ser visto pelo halo branco perinuclear com formação de corpos apoptóticos. Como pode ser visto a seguir:



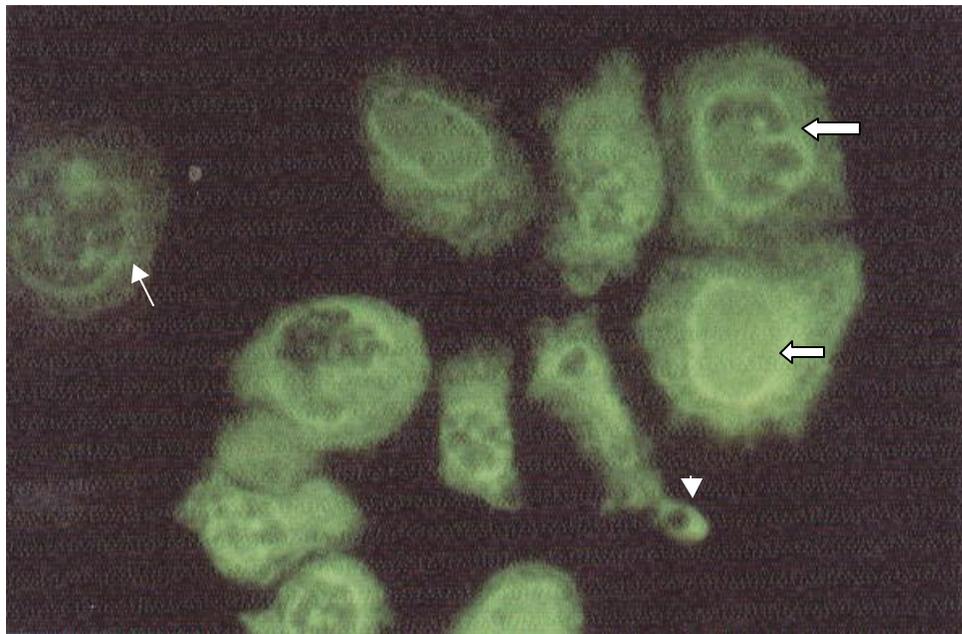
**Figura 30:** Grupo controle das células Hep-2, sem tratamento por 24 horas. Marcadas com Luciferin-Luciferase. 2.500x.



**Figura 31:** Grupo controle das células Hep-2, sem tratamento por 48 horas. Marcadas com Luciferin-Luciferase. 2.500x.



**Figura 32:** Nas células Hep-2 tratadas com o veneno da *Cdt* jovem (5 µg/mL), marcadas com Luciferin-Luciferase. Foi possível observar uma produção maior de ATP em 24 horas de incubação. 2.500x.

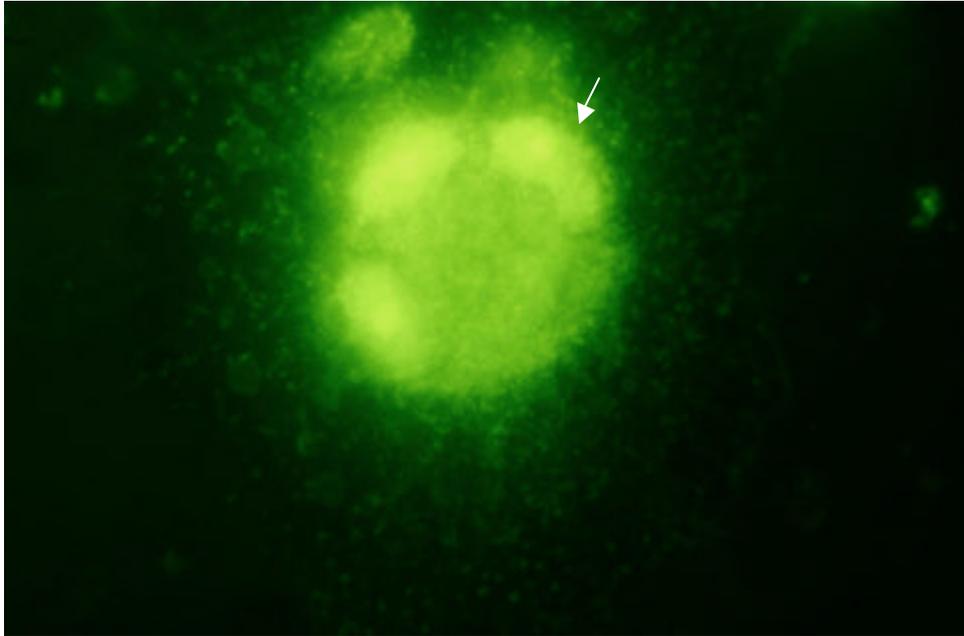


**Figura 33:** As células Hep-2 incubadas com o veneno da *Cdt* jovem (0.5 µg/mL) por 48 horas. Marcadas com Luciferin-Luciferase, foi possível observar perda da adesão celular (seta), concentração de ATP na região perinuclear (seta larga), condensação da cromatina com formação de corpos apoptóticos (cabeça de seta). 2.500x.

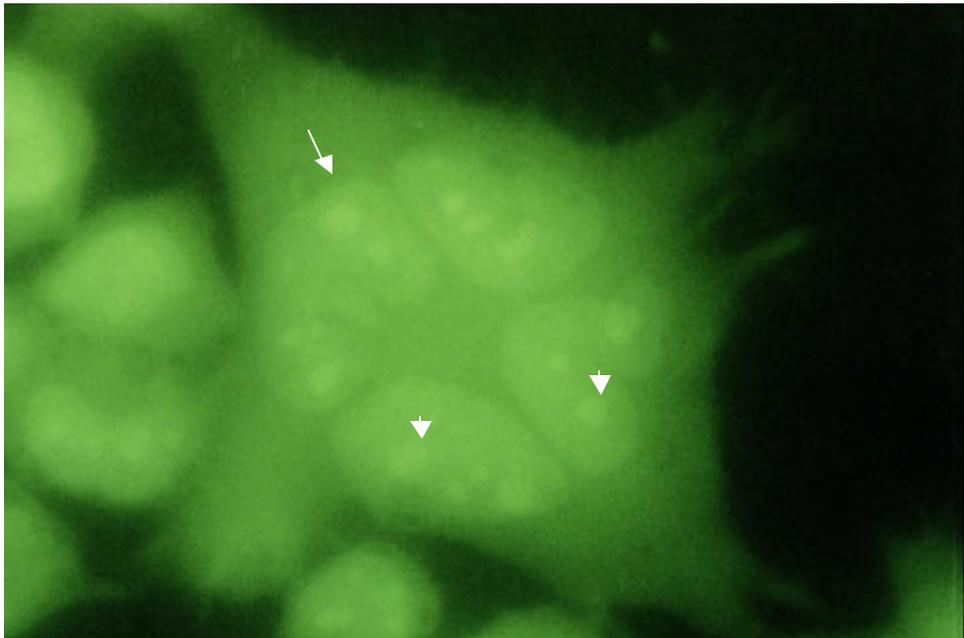


**Figura 34:** Comprometimento total do núcleo nas células Hep-2 incubadas com 5  $\mu$ g/mL do veneno da *Cdt* jovem por 48 horas. Marcadas com Luciferin-Luciferase. Nota-se ATP na região perinuclear, conforme as setas. 2.500x.

De acordo com a literatura, as células tumorais são capazes de sintetizar mais rapidamente as proteínas celulares do que as células normais e segundo Robbins (2000), uma das características mais nítidas da malignidade são as células gigantes neoplásicas e multinucleadas, confirmadas pelos nossos estudos. Abaixo mostramos as fotomicrografias das figuras 35 e 36, conforme pode ser vista a retração celular da célula tratada com o veneno em relação ao controle não tratado.



**Figura 35:** Célula Hep-2 incubada com o veneno (0.51 g/mL) por 2 horas. Observa-se uma célula gigante com três núcleos (seta). 2.500x.



**Figura 36:** Célula gigante neoplásica Hep-2 controle (sem tratamento). Marcadas com DAPI. Nota-se vários núcleos (setas), nucléolos grandes e múltiplos (cabeça de seta). 2.500x.

## 7. DISCUSSÃO

O veneno total da *Cdt* jovem agiu com efeito citotóxico nas células Hep-2, ocorrendo um destacamento das células do substrato dentro de 2 a 4 horas de incubação, com perda no processo celular seguida pela agregação das células, o qual forma espaços, então as células tornando-as redondas e finalmente se destacam do substrato flutuando no meio. Apenas uma população celular foi destacada, a outra aderida ao substrato, consegue se restabelecer e proliferar, até mais que o controle (células não tratadas) em 24 horas. O pico máximo do veneno foi alcançado em 4 horas, permanecendo 30% das células viáveis.

Em outro experimento, as células Hep-2 incubadas com as concentrações de 0,5, 1 e 5 µg/mL do veneno total da *Cdt* jovem, por um período de 24, 48 e 72 horas. Houve proliferação até 24 horas e em 48 e 72 horas houve um declínio em sua viabilidade, embora não significativo.

O resultado obtido para a linhagem Hep-2 frente ao veneno total da *Cdt* jovem, as células morreram em torno de 20 % nas várias concentrações do veneno por um período de 72 horas, não houve significância ( $P > 0,05$ ).

Esses estudos são corroborados por Tamietti (2003) que avaliou a atividade mitocondrial das células CHO-KI (células de ovário de hamster chinês) com o veneno total da serpente *Cdt* adulta nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL por um período de 24 horas e obtendo também o mesmo resultado não significativo.

Comparando a ação do veneno total e frações da *Cdt* sobre a proliferação celular na concentração de 1 µg/mL, demonstramos o efeito citotóxico que as frações do veneno exerce sobre a cultura celular Hep-2 no período de 1, 4, 8 e 24 horas. Obtivemos assim, uma  $DL_{30}$  nas frações: F1 e F2 e no restante das frações ocorreu  $DL_{50}$ . Pode ser observado que o veneno total da *Cdt* em 24 horas induz uma proliferação celular maior. Porém, alguns pontos não estão muito claros, necessitando de um estudo mais detalhado

para a compreensão da ação do veneno na proliferação celular a fim de se determinar qual a fração do veneno responsável por essa proliferação.

Com as frações do veneno purificado da serpente *Cdt*, as células plaqueadas conforme protocolo acima, foram incubadas com as seguintes concentrações: 0,5, 1 e 5  $\mu\text{g/mL}$  por um período de 24 e 48 horas.

As frações do veneno da *Cdt* apresentaram um efeito significativo na linhagem celular Hep-2, indicando um efeito citotóxico por este método MTT.

O tratamento das células Hep-2 com as frações do veneno na concentração de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  apresentou um efeito citotóxico para quase todas as frações, com exceção das frações 1, 2 e 3 onde as células morreram em torno de 10 % a 20 % até 48 horas analisadas. Com o restante das frações obtivemos uma porcentagem de células mortas em torno de 30 % a 60 %, demonstrando então um efeito citotóxico dessas frações, nessa concentração e nesses tempos de 24 e 48 horas. No entanto em 48 horas obtivemos  $DL_{50}$  nas frações: F4, F6 e F7.

Na concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  das frações do veneno da *Cdt* frente as células Hep-2, todas as frações mostraram um efeito citotóxico (~ 30 % de células mortas) por um período de 24 e 48 horas. A dose letal maior obtida foi da fração 1 (1  $\mu\text{g/mL}$ ) no período de 24 horas de incubação, onde alcançou  $DL_{70}$  mas, essas células se proliferaram e em 48 horas estavam viáveis em torno de 70 %.

Com a concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$  das frações do mesmo veneno, as células Hep2 apresentaram sensibilidade pelo mesmo período citado acima, onde em 48 horas a fração 2 apresentou  $DL_{60}$  e  $DL_{50}$  nas frações: F4 e F7 e o restante das frações apresentaram células mortas entre 30 % a 40 %.

O efeito citotóxico pode vir a ocorrer após 1 ou 2 ciclos celulares, de acordo com a droga utilizada. Em nosso estudo esse efeito foi alcançado no período de 48 horas.

O pico máximo da atividade citotóxica do veneno da *Cdt* jovem foi alcançado em 4 horas, após 24 horas os 30 % de células viáveis haviam se proliferado até mais que o controle. Quando incubadas até 72 horas, estas células mostraram um declínio após 48 horas, sugerindo um efeito citotóxico. Embora pelo método MTT, esse teste defina o veneno como sendo não citotóxico para a cultura de células Hep-2, devemos considerar que, existe a possibilidade da atividade da enzima mitocondrial estar aumentada nas células tratadas com o veneno devido a uma apoptose tardia. A mitocôndria pode permanecer intacta até a apoptose tardia. À medida que a célula vai perdendo a função mitocondrial poderá ser um indicador tardio de morte celular apoptótico. Nossos resultados são corroborados por Loo E Rillema (1998) que observou em culturas de neurônios mudanças morfológicas associadas com apoptose, várias horas antes da conversão do MTT.

O teste MTT mede a apoptose bioquimicamente, mas este teste não discrimina entre apoptose ou necrose, sendo então, sensível à atividade mitocondrial, e de acordo com esse teste, o veneno mostrou ser citotóxico, somente nas frações purificadas, em todas as concentrações por um período de 48 horas. Testes mais específicos deverão ser feitos, a fim de se determinar a ação molecular de cada fração frente à linhagem celular.

Um método mais apropriado seria a microscopia eletrônica, que fornece evidências morfológicas definitivas de apoptose, não sendo um método apropriado para quantificar a apoptose. Um método quantitativo mais apropriado seria a identificação do núcleo apoptótico pela eletroforese em gel de agarose.

O teste de citotoxicidade abrange a população celular como um todo e foi detectado pela microscopia de fluorescência apoptose pontual, pelo marcador DAPI e pelo teste da Bioluminescência, indicando que entre 10 a 20% das células morreram por apoptose, sendo este então um dado muito importante, pois talvez se tivéssemos tratado a cultura celular com as concentrações citadas acima, por um período de 8 em 8 horas com o veneno da *Cdt*, talvez obtivéssemos um resultado de apoptose ou necrose total. Esses estudos são corroborados por Ferreira *et al* (2004), em seus estudos com células

HeLa após terapia fotodinâmica com ALPcS<sub>4</sub> analisando a mitocôndria, citoesqueleto e retículo endoplasmático.

Em outro experimento após setenta e duas horas da adição do veneno, as células foram lavadas e o meio fresco foi acrescentado, e essa população celular foi capaz de recupera-se, mostrando então um efeito reversível do veneno da *Cdt*, resultado que é corroborado com Borkow *et al* (1994) que trabalhou com veneno *Crotalidae* e células endoteliais de bovinos e ratos.

De acordo com os resultados observados nas fotomicrografias (1- controle, 2- 15minutos, 3- 30minutos, 4- 1 hora, 5- 1½hora, 6- 2 horas) obtidas por microscopia de fluorescência, aos 15' de incubação com o veneno da *Cdt* jovem, foi mostrado que o veneno penetrou (em contraste com o controle) e permaneceu distribuído em toda extensão celular em 15', 30', 1h, 1½h e 2 horas. No período de 1 hora foi nítida a presença do veneno na região do núcleo e em 2 horas a célula parece excretar o excesso do veneno ou metabolizar. Tal resultado necessita de um estudo mais profundo para melhor compreender a ação do veneno.

Em 24 horas foi possível observar o aspecto morfológico das células Hep-2 frente ao veneno da *Cdt* jovem nas concentrações de 0,5, 1 e 5µg/mL, que foram observadas por microscópio de fluorescência, a cromatina condensada na periferia do núcleo, um afastamento da membrana nuclear em relação ao citoplasma, indicando perda da adesão desta membrana e início de invaginação do núcleo sugerindo formação de corpos apoptóticos. (Figuras 23). O tratamento nas células Hep-2 com veneno da *Cdt* jovem por 48 e 72 horas foi constatado a retração celular devido à diminuição da adesão e o comprometimento do núcleo com a formação de corpos apoptóticos ao longo da membrana plasmática (figuras: 24, 25, 26, 27, 28 29) que resultou em morte celular por "apoptose tardia". Estes resultados são corroborados por Goddar (1999 apud MARTINES,2003) que citou em seus trabalhos três termos referentes a apoptose: imediata, intermediária e tardia. Apoptose imediata é provocada em menos de meia hora e é um mecanismo pré-morte celular programada (MCP), isto é, não requer síntese de proteínas. Apoptose intermediária ocorre dentro de quatro horas, mas requer mais que

meia hora para iniciar (WANG, 1997 apud MARTINES, 2003) e é um mecanismo pré - MCP. Apoptose tardia ocorre após 4 horas (podendo levar dias) e é um mecanismo MCP, dependente de síntese de proteínas.

Na detecção de ATP, no qual o método da bioluminescência é o resultado de uma reação química que envolve diversos componentes, Luciferin-Luciferase, ATP e Oxigênio. Estes combinam para formar um produto eletronicamente excitado capaz de emitir luz e a luz da reação é medida por fluorescência:

LUCIFERIN + LUCIFERASE + ATP + OXIGÊNIO =  
 PRODUTO EXCITADO + LUCIFERASE = LUZ (LEÃO ; L. ; GRIMBERG ;  
 K. E. ; LUCIFERIN, 2001).

As células tumorais são capazes de gerar bastante ATP para preservar funções celulares fundamentais, manutenção tais como: de gradientes iônicos, que atravessam as membranas celulares, controle no caminho de sinalização intracelular, síntese de proteínas e progressão do ciclo celular.

Foi mostrado que após 24 horas de incubação com o veneno, as mitocôndrias apresentavam intensa produção de ATP (figura 32), em comparação com o controle (figura 30 e 31) e em 48 horas as mitocôndrias apresentavam ainda alto potencial de membrana ocorrendo contração da membrana citoplasmática vários vacúolos, concentração de ATP na região perinuclear, condensação da cromatina, com formação de corpos apoptóticos, sugerindo a utilização do ATP para o processo apoptótico e não para a metabolização do veneno, já que apoptose ocorre com gasto de energia, conforme pode ser visto pelas fotomicrografias: 33 e 34. Estes resultados são confirmados pelo teste MTT e visualização pela marcação com o DAPI.

O estudo das neoplasias é um dos assuntos mais importantes da medicina. De acordo com Robbins (2000) tanto as células neoplásicas como seus núcleos são pleomorfos, variando grandemente em tamanho e forma. Frequentemente, o núcleo ocupa a maior parte da célula, a relação núcleo-citoplasma sendo de 1 para 1 ou,

mesmo, de 2 para 1, enquanto a relação normal é de cerca de 1 para 4. Existe aumento da cromatina nuclear, ou seja, hipercromasia. Frequentemente, acha-se reunida em massas grosseiras, particularmente na vizinhança da membrana nuclear, tornando mais nítida a margem do núcleo. Os nucléolos são grandes e algumas vezes múltiplos, em certos casos rodeados por um halo, criando um aspecto assim chamado “olho de coruja”. Essas características foram observadas neste trabalho sendo corroborados por este autor, conforme as fotomicrografias: 35 e 36.

Segundo hipótese de Holley (apud BRAGANÇA, 1976), ocorre modificações nos componentes da superfície celular de células cancerosas resultando diferenças no transporte de certos nutrientes dentro de células malignas. Bragança (1976), revelou que a fração 6 (P6) do veneno da *Naja* é citotóxica a certas células tumorais. A P6 combina com componentes da membrana (lipoproteínas) de células suscetíveis, inibindo a ação da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase no limite da membrana com uma atuação destrutiva sobre essas células, conferindo, então, diferenças nas membranas das células malignas e normais.

Conforme Cotte *et al* (1972), a atuação do veneno *Cdt* em células Hep-2, depende da concentração do veneno e do tempo de contato. Foi demonstrado por ele que o veneno tem um efeito marcante nas células, resultando em morte celular, e que ataca inicialmente o núcleo. Foi observado também que para qualquer concentração maior que 5  $\mu\text{g/mL}$ , ocorre perda da adesão e morte celular em menos de 6 horas sendo o efeito citopatogênico dependente do tempo. Seus estudos demonstraram que em 120 minutos ocorreu um ataque moderado. Em nossos estudos foi encontrado 30 % de células viáveis nesse mesmo tempo com o veneno da *Cdt* jovem nas concentrações abaixo e acima de 5  $\mu\text{g/mL}$ , ou seja 0.5, 1, 5, 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , porém as células se proliferaram até mais que o controle em 24 horas e em 72 horas obtivemos 80 % de células viáveis, contradizendo, então, que o efeito não seja em função do tempo.

Porém, o veneno contém um grande número de proteínas (90 % a 95 %), composto não protéico e enzimas, sendo a principal, a fosfolipase  $\text{A}_2$  que tem atividade hidrolítica, proteolítica e o estudo biológico tem mostrado que esta atua sobre a

morfologia mitocondrial (BRAGANÇA, 1976 ; RABINOVITCH, 1973 apud SILVA *et al*, 1997 ; VARANDA ; GIANNINI, 1994). Segundo Donato *et al* (1996), a fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno da *Cdt* possui atividade antiproliferativa e tem como alvo celular os receptores transmembrana envolvidos na sinalização do crescimento (EGFr – Receptores do fator de crescimento epidérmico). Melo *et al* (2004), concluiu que a despolarização da membrana plasmática seja o indicador no dano celular induzido pela crotoxina.

Nas células incubadas com o veneno da *Cdt* jovem, foi evidenciado que em 1 hora o veneno estava concentrado ao redor do núcleo, indicando que talvez o núcleo seja o principal indicador no dano celular mas, talvez nem todas as frações atinja o mesmo alvo, podendo ser que possa atingir primeiro os receptores de morte, desencadeando a cascata intracelular ou, atingir a membrana plasmática fazendo com que ocorra a permeabilidade da célula e induzindo esta a apoptose ou necrose, ou ainda atrapalhar os sinais extracelular e intracelular que culminará com a morte celular.

Para uma futura aplicação prática no campo da medicina e da farmacologia, os pesquisadores têm interesse em entender a relação entre o hospedeiro e o crescimento neoplásico bem como as moléculas extrínsecas às células que são sinalizadoras, liga-se aos receptores celulares específicos, desencadeando uma cascata sinalizadora intracelular que culminará em uma resposta na expressão gênica da célula que está sendo estimulada pelo sinal. Estudos *in vitro* nos possibilitam determinar a toxicidade de agentes químicos, determinar o caminho bioquímico dessas moléculas sinalizadoras e deixo aqui minha modesta colaboração neste campo, esperando que a mesma tenha acrescentado algo cientificamente.

## 8. CONCLUSÃO

- O veneno total da serpente *Cdt* jovem causou danos celulares irreversíveis em torno de 10 % a 20 % nas células Hep-2 submetidas ao tratamento.
- Nas frações do veneno da *Cdt*, onde as células Hep-2 foram submetidas a esse tratamento, de 30% a 70% dessas células foram observadas morte celular.
- Ocorreu um aumento na síntese de ATP, sugerindo esse aumento para o processo apoptótico, uma vez que a apoptose ocorre com gasto de energia, não podendo ser definido se a mitocôndria foi ou não alterada pelo veneno, uma vez que ela permanece intacta até a apoptose tardia.
- As células neoplásicas Hep-2 submetidas ao veneno da cascavel jovem, mostrou-se com alterações no núcleo e induziram a "Morte Celular" por "Apoptose Tardia", visto que as alterações na adesão celular foram evidenciadas em 24 horas após o tratamento com o veneno.
- As frações que apresentaram  $DL_{50}$  foram: A Fração 2 com a concentração de 5  $\mu$ g/ml e fração 4, 6 e 7 com a concentração do veneno de 0,5  $\mu$ g/ml.

## 9. ESTUDOS FUTUROS

- ❖ Citotoxicidade do veneno da serpente da *Cdt* adulta incubada com a linha celular Hep-2 por um período de 72 horas com intervalos de 24 horas, e com as frações do veneno da *Cdt* jovem, a fim de determinar se existe diferença entre os venenos das serpentes *Cdt* jovem e adulta.
- ❖ Deve ser identificado como o veneno entra e sai da célula, ou se o veneno é metabolizado dentro da mesma.
- ❖ Fazer todos os testes com as mesmas amostras do veneno da serpente, e posteriormente fazer os mesmos testes com amostras de serpentes diferentes do mesmo gênero, no intuito de identificar se a composição do veneno de diferentes serpentes pode atuar diferentemente nestes testes, uma vez que na literatura encontra-se diferença na composição do veneno das serpentes tanto em origem geográfica, quanto à idade e ao sexo.
- ❖ Estudar de uma maneira direta o veneno. Primeiro, isolando uma determinada proteína, segundo, determinando sua caracterização bioquímica e então determinando sua atividade biológica *in vitro* e *in vivo*.
- ❖ Identificar a expressão dos genes em caminhos apoptóticos pelos receptores (Fas/ TNF) em células Hep-2 tratadas com o veneno da serpente *Cdt* jovem e adulta.
- ❖ Nas células tratadas com o veneno, identificar se o processo apoptótico é dependente do tipo de veneno (tratar as células com outros venenos). E também tratar outras células, incluindo células normais, com o mesmo veneno da serpente *Cdt* jovem e adulta.

❖ Produzir anticorpo das frações do veneno em camundongos e aplica-las a cultura celular Hep-2, marcando com uma sonda fluorescente, o caminho intracelular dessas frações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon*. v. 40, p. 335-393, 2002.

ALBERTS, B. ; BRAY, D. ; LEWIS, J. ; RAFF, M. ; ROBERTS, K. ; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da CÉLULA**. 3 ed. Porto Alegre : Artmed, 1997. 1291 p.

APOPTOSIS AND CELL PROLIFERATION. 2 ed. Mannheim: Boehringer. p. 125. Disponível em: ([http://biochem.roche.com/prod\\_inf/manuals/cell\\_man/cell\\_toc.html](http://biochem.roche.com/prod_inf/manuals/cell_man/cell_toc.html)). Acesso em: 02 ago. 2002.

AS REAÇÕES da Fase aguda nos Acidentes Ofídicos. In : BARRAVIERA, B. **Venenos Animais - uma visão integrada**. Rio de Janeiro : EPUC, 1994. p. 91-96.

BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. *Arq. Bras. Med.* v. 64, n. 11, p. 14-20.1990.

BARRAVIERA, B. ; BONJORNO JUNIOR, J. C. ; ARAKAKI, D. ; DOMINGUES, M. A. C. ; PEREIRA, P. C. M. ; MENDES, R. P. ; MACHADO, J. M. ; MEIRA, D. A. A retrospective study of 40 victims of *Crotalus* snake bites. Analysis of the hepatic necrosis observed in one patient. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 22, n. 1, p. 5-12. 1989.

BARRAVIERA, B. Estudo Clínico dos Acidentes Ofídicos. *JBM*. v. 65, n. 4, p. 209-250. 1993.

BEGHINI, D. G. ; RODIGUES ; S. ; TOYAMA ; M. H. ; NOVELLO ; J. C. ; DA CRUZ-HÖFLLNG, M. A. ; MARANGONI, S. Neurotoxic and Myotoxic actions of crotoxin-like and *Crotalus durissus cascavella* whole venom in the chick biventer cervicis preparation. *Toxicon*. v. 43, n. 3, p. 255-261. 2004.

BEGHINI, D. G., TOYAMA, M. H. ; HYSLOP, S. ; SODEK, L. ; NOVELLO, J. C. ; & MARANGONI, S. Enzymatic characterization of a novel phospholipase A<sub>2</sub> from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (maracambóia) venom. *Journal of Protein Chemistry*. v. 19, p. 603-607.2000.

BIOAGENCY Disponível em : <http://www.bioagency.com.br>. Acesso em 12 jun. 2003.

BIOQUÍMICA de Venenos de Serpentes. In : VARANDA, E. A. ; GIANNINI, M. J. S. M. **Venenos Animais - uma visão integrada**. Rio de Janeiro : EPUC, 1994. 205-219 p.

BORKOW, G. ; LOMONTE, B. ; GUTIÉRREZ, J. M. ; OVADIA, M. Effect of Various Viperidae and Crotalidae Snake Venoms on Endothelial Cells *in vitro*. *Toxicon*. v. 32, n. 12, p. 1689- 1695. 1994.

BRAGANÇA, B. M. Biologically Active Components of Cobra Venom in Relation to Câncer Research. *Indian J Med Res*. v. 64, n. 8, p. 1197- 1207. 1976.

BROWN, W. J. ; CHAMBERS, K. ; DOODY, A. Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) Enzymes in Membrane Trafficking: Mediators of Membrane Shape and Function. *Blackwell Munksgard*. v. 4, p. 214-221. 2003.

BUDILON, A. Molecular Genetics of Câncer – Oncogenes and Tumor suppressor genes. *Cancer*. v. 76, n. 10, p. 1869-1873.1995.

CAMILLO, M. A. ; ARRUDA PAES, P. C. ; TRONCONE, L. R. ; ROGERON, J. R. Gyroxin fails to modify *in vitro* release of labeled dopamine and acetylcholine from rat and mouse striatal tissue. *Toxicon*. v. 39, n. 6, p. 843-853. 2001.

CHISARI, A. ; SPINEDI, E. ; VOIROL; M. J. ; GIOVAMBATISTA; A. ; GAILLARD; R. C. A Phospholipase A<sub>2</sub> Related Snake Venom (from *Crotalus durissus terrificus*) Stimulates Neuroendocrine and Immune Functions: Determination of Different Sites of Action. *Endocrinology*. v. 139, n. 2, p. 617-625. 1998.

CULTURA de Células Animais. In: CARVALHO, T. U. **Métodos de Estudo da Célula**. Rio de Janeiro : Fenorte/UENF, 1996. p. 47-57.

CYTOTOXICITY and viability assays. In: WILSON, A. P. **Animal Cell Culture**. New York: University Press, 1994. p. 263-303.

COTTE, C. A. ; ESSENFELD-YAHR, E. ; LAIRET, A. C. Effects of *Crotalus* and *Bothrops* venom on normal and malignant cells cultivated *in vitro*. *Toxicon*. v. 10, p. 157-161. 1972.

DAPI NUCLEIC ACID STAIN. Molecular Probes, 2002. [MPO1306, Product information revised: 24 Oct. 2002].

DE BEM NETO, G. **SERPENTES**. Agudos (SP): [s.n], 2001. [Apostila].

DENIZOT, F. ; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *Journal of Immunological Methods*. v. 89, p. 271-277. 1986.

DE ROBERTIS, E. M. F. ; HIB, J. **Bases da Biologia Celular e Molecular**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2001. 418 p.

DONATO, N. J. ; MARTIN, C. A. ; PEREZ, M. ; NEWMAN, R. A. ; VIDAL, J. C. ; ETCHEVERRY, M.. Regulation of epidermal Growth factor Receptor Activity

by Crotoxin, a Snake Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Toxin. *Biochemical Pharmacology*. v. 51, p. 1535-1543. 1996.

DOYLE, A. ; GRIFFITHS, J. B. **Cell and tissue culture - Laboratory procedures in biotechnology**. Chichester : John Wiley & Sons, 1998. 332 p.

DUKE, R. C. ; OJCIUS, D. M. ; DING-e YOUNG, J. Cell Suicide in Health and Disease. *Scientific American*. p. 1-8, 1996.

FARAH, S. B. **DNA Segredos & Mistérios**. São Paulo : Sarvier, 1997. 272 p.

FAURE, G. ; BON, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*. v. 25, n. 2, p. 229-234. 1987.

FAURE, G. ; CHOUMET, V. ; BOUCHIER, C. ; CAMOIN, L. ; GUILLAUME, J. L. ; MONEGIER, B. ; VUILHORGNE, M. ; BON, C. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Eur J Biochem*. v. 223, p. 161-164. 1994.

FAURE, G. ; VILLELA, C. ; PERALES, L. ; BOM, C. Interaction of the neurotoxic and nontoxic secretory phospholipases A<sub>2</sub> with the crotoxin inhibitor from *Crotalus* serum. *Eur J Biochem*. v. 267, n. 15, p. 4799-4808. 2000.

FECCHIO, D. **INFLAMAÇÃO E TUMOR DE EHRLICH**. 1989. 110 f. Tese (Doutor em Ciências - Imunologia) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1989.

FERREIRA, S. D. R. M. ; SOARES, C. P. ; TEDESCO, A. C. ; SOUZA, G. ; ZÂNGARO, R. A. ; SILVA, N. S. ; SOARES, C. P. Analysis of Mitochondria, Endoplasmic Reticulum and actin Intermediate Filaments after PDT with AIPcS<sub>4</sub>. *Laser in Medical Science*. v. 18, p. 207- 212. 2004.

FLETCHER, J. E. ; HUBERT, M. ; WIELAND, S. J. ; GONG, QI-HUA ; JIANG, MING-SHI. Similarities and Differences in mechanisms of Cardiotoxins, Melittin and Other Myotoxins. *Toxicon*. v. 34, n. 11, p. 1301- 1311. 1996.

FURTADO, M. F. D. ; SANTOS, M. C. ; KAMIGUTI, A. S. Age-related biological activity of South american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis* .v. 9, n. 2, p. 1-9. 2003.

GALLAGHER, P. G. ; BAO, Y. ; SERRANO, S. M. T. ; KAMIGUTI, A. S. ; THEAKSTON, R. D. G. ; FOX, J. W. Use of microarrays for investigating the subtoxic effects of snake venoms: insights into venom-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Toxicon*. v. 41, p. 429-440. 2003.

GRIMBERG, K. E. Processo de produção de luz. disponível em: <http://www2.usp.br/portugues/uspfacil/buscausp/frame.busca.php?num=20&q=luciferas> e. Acesso em : 23 abr. 2004.

HAMPE; O. G. ; BELLÓ; A. A. An *in vivo* Method for Estimating the Concentration of Crotamine in a Solution. *J. Venom. Anim. Toxins*. v. 3, n. 1, p. 1-5. 1997.

INDIRECT Immunofluorescence Microscopy in Cultured Cells. In: WHEATLEY, S. P. ; WANG, YU-LI. **Animal Cell Culture Methods**. San Diego: Academia Press, 1998. p. 313-331.

JORGE, M. T. ; RIBEIRO, L. A. Epidemiologia e Quadro Clínico do Acidente por Cascavel Sul-Americana (*Crotalus durissus*). *Rev. Inst. Med. trop.* v. 34, n. 4, p. 347-354. 1992.

LEÃO, I. Vaga-lumes contra infecção hospitalar. Disponível em : <http://www2.usp.br/portugues/uspfacil/buscausp/frame.busca.php?num=20&q=lucifera> se. Acesso em: 23 abr. 2004.

LEWIN, B. **GENES VII** Porto Alegre : Artmed, 2001. 955 p.

LOWRY, O. H. ; ROSEBROUGH, N.J. ; FARR, A. L. ; & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. v. 193, p. 265-275. 1951.

LUCIFERIN. Molecular Probe, 2001. [MP L-2911, Product Information Revised: 25 fev. 2001].

MADY, E. A. Antitumor and Biochemical Effects of *Echis coloratus* Crude Venom on Ehrlich Ascites Carcinoma Cells *in vivo*. *J. Venom. Anim. Toxins*. v. 8, n. 2, p. 1-11. 2002.

MAGRO, A. J.; SILVA, R. J. ; RAMOS, P. R. R. ; CHERUBINI, A. L. ; ATHAÍDE, P. R. Intraspecific variation in the venom electrophoretic profile of recently captured *Crotalus durissus terrificus* (LAURENTI, 1768) Snakes. *J. Venom. Anim. Toxins*. v. 7, n. 2, p. 276-301, 2001.

MANCIN, A. C. ; SOARES, A. M. ; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H. ; FAÇA, V. M. ; GREENE, L. J. ; ZUCCOLOTTO, S. ; PELÁ, I. R. ; GIGLIO, J. R. The analgesic activity of crostamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus*(South american rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. *Toxicon*. v. 36, n. 12, p. 1927-1937. 1998.

MARTINS A. M. ; TOYAMA, M. H. ; HAVT, A. ; NOVELLO, J. C. ; MARANGONI, S. ; FONTELES, M. C. ; MONTEIRO, H. S. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat Kidneys. *Toxicon*. v. 40, n. 8, p. 1165-1171. 2002.

MARTINES, N. S. Avaliação do Processo de Morte Celular Após Terapia Fotodinâmica. 2003. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba.

MEASUREMENT of Cell Death. In : LOO, D.T. ; RILLEMA, J. R. **ANIMAL CELL CULTURE METHODS**. San Diego : Academia Press, 1998. p.251-264.

MELO, P. A. ; BURNS, C. F. ; BLANKEMEYER, J. T. ; OWNBY, C. L. Membrane depolarization is the initial action of crotoxin on isolated murine skeletal muscle. *Toxicon*. v. 43, n. 2, p. 111-119. 2004.

MENDES, G. P. A. ; GREN, D. R. The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Res*. v. 32, n. 9, p. 1053-1061. 1999.

MONTEIRO, H.S.A. ; SILVA, I.M.S.C. ; MARTINS, A.M.C. ; FONTELES, M. C. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat Kidney. *Braz J Med Res*. v. 34, n. 10, p. 1347-1352. 2001.

MU-CHIN, T. ; CHON-HO, Y. ; MING-JHY, H. ; CHIU-CHEN, T. ; MING-DAW, T. ; DUPUREUR, C. M. Binding proteins on synaptic membranes for crotoxin and taipoxin, two phospholipase A<sub>2</sub> with neurotoxicity. *Toxicon*. v. 33, n. 4, p. 451-457.1995.

PRADO, R. C. O Veneno. *Super Abril*. 1997. p. 58-65.

PINHO, F. M. O. ; OLIVEIRA, E. S. ; FALEIROS, F. Acidente ofídico no estado de Goiás. *Rev. Assoc. Med. Bras*. v. 50, n. 1, p. 1-10. 2004.

PINHO, F. M. O. ; PEREIRA, I. D. Ofidismo. *Rev Ass Med Brasil*. v. 47, n. 1, p. 24-29. 2001.

RÁDIS-BAPTISTA, G. ; KUBO, T. ; OGUIURA, N. ; SVARTMAN, M.; ALMEIDA, T. M. B. ; BATISTA, R. F. ; OLIVEIRA, E. B. ; VIANNA-MORGANTE, A. M. ; YAMANE, T. Structure and chromosomal localization of the gene for crotamine, a toxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*. v. 42, n. 7, p. 747-752. 2003.

REICHMAN, J. **Handbook of optical filters for fluorescence microscopy**. Chroma Technology Corp., 2000.

Neoplasias. In: Robbins, S. L. ; COTRAN, R. S. ; KUMAR, V. ; COLLINS, T. **PATOLOGIA**. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000. p. 233 - 295.

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

SANTORO ; M. L. ; SOUSA e SILVA ; M. C. C. ; GONÇALVES; L. R. C. ; SANTOS ; S. M. A. ; FERREIRA ; I. L. L. ; SAIKI; M. ; PERES ; C. A. ; SANOMARTINS ; I. S. Comparison of Biological Activities of Three Subspecies (*Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus collilineatus*) of the South American Rattlesnake. *J. Venom. Anim. Toxins*. v. 3, n. 1, p. 140-142. 1997.

SCHAEFFERT, J. M. ; HSUEH, A. J. W.  $\alpha$ -Bungarotoxin – Luciferin As a Bioluminescent Probe for Characterization of Acetylcholine Receptors in the Central Nervous System. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 259, n. 4, p. 2055-2058. 1984.

SILVA, E. C. M. **Genética e o Controle da Morte Celular Programada**. Disponível em: <http://www.igce.unesp.br/ib/biológicas/semi.html-4k>. Acesso em: 02 ago. 2002.

SILVA, R. J. ; FECCHIO, D. ; BARRAVIERA, B. Effect of *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) venom on the evolution of Ehrlich Ascites Tumor. *J. Venom. Anim. Toxins*. v. 3, n. 2, p. 1-13. 1997.

SIMULTANEOUS Measurement of Cell Cycle and Apoptotic Cell Death. In : MOORE, A. ; DONAHUE, C. J. ; BAUER, K. D. ; MATHER, J. P. **ANIMAL CELL CULTURE METHODS**. San Diego : Academia Press, 1998. p. 265-277.

SMITH, L. A. ; SCHMIDT, J. J. Cloning and nucleotide sequences of crotamine genes. *Toxicon*. v. 28, n. 5, p. 575-585. 1990.

SOLÁ, S. ; PEDRO, T. ; FERREIRA, H. ; RODRIGUES, C. M. P. Apoptose: Uma Questão de Vida ou de Morte. *Biológicas*. n. 2, fev. 2001.

TAMIETTI, B. F. P. **Ação do veneno da *Crotalus durissus terrificus* em células CHO-K1**. 2003. 47 f. Trabalho de Graduação (Ciências Biológicas) - Faculdade de Educação, Universidade do Vale do Paraíba, 2003.

TZENG; MU-CHIN. ; YEN; CHON-HO. ; HSEU; MING-JHY. ; TSENG; CHIU-CHEN. ; TSAL; MING-DAW. ; DUPUREUR; C. M. Binding proteins on synaptic membranes for crotoxin and taipoxin, two phospholipases A<sub>2</sub> with neurotoxicity. *Toxicon*. v. 33, n. 4, p. 451-457. 1995.

VALENTE, R. H. ; NOVELLO, J. C. ; MARANGONI, S. ; OLIVEIRA, B. ; PEREIRA-DA-SILVA, L. ; MECEDO, D. V. Mitochondrial swelling and oxygen consumption during respiratory state 4 induced by phospholipase A<sub>2</sub> isoforms isolated from the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. *Toxicon*. v. 36, n. 6, p. 901-913. 1998.

## GLOSSÁRIO

Anti-oncogene: São genes inibidores da proliferação celular

Apoptose: Morte celular programada

Caspase: Cisteína-aspartato-protease

Citocromo c: Proteína intermembrana mitocondrial

Oncogene: São proto-oncogenes ativados

Paralisia espástica: Enrijecimento da musculatura

Proto-oncogene: São genes relacionados com o crescimento, diferenciação e proliferação celular normais. Codificam fatores de crescimento, receptores de membrana e proteínas de ligação do DNA.

Rabdomiólise: Síndrome na musculatura esquelética, resultando em um extravazamento para o plasma do conteúdo de células musculares (mioglobulina, potássio, fosfato, etc.)

Retinoblastoma: Neoplasia maligna da retina

**ANEXOS (01):****Tampão Fosfato 0,2 M**Solução A (*Fisher Scientific*)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,76 g / 100 mL
--	-----------------

Solução B (*Fisher Scientific*)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,36 g / 100 mL
---	-----------------

Ou

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	7,17 g / 100 mL
--	-----------------

Ou

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	2,84 g / 100 mL
---------------------------	-----------------

Solução A  $\Rightarrow$  16,5 mL +Solução B  $\Rightarrow$  33,5 mL

50,0 mL pH 7,1

**Tampão Fosfato Salina (PBS) pH 7,0**

Tampão Fosfato 0,2 M	50 mL
Água Destilada	950 mL
NaCL (Merck)	9 g

**Tampão Phem – Solução estoque pH 6,8**

Pipes (Sigma).	10,36 g
Hepes (Sigma).	3,25 g
EGTA (Merck)	1,90 g
MgCl <sub>2</sub> (Merck)	0,27 g
Água ultrapura	500 mL

**Tripsina – Solução estoque pH 7,2**

Tripsina (Gibco BRL)	0,1 %
EDTA (Carlo Erba)	0,05%
PBS	100 mL