

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO
EFEITO ANTITUMORAL DA PEÇONHA DE
Crotalus durissus terrificus E AVALIAÇÃO DO
SEU POTENCIAL USO NA DETECÇÃO DE
TUMORES**

Marcella Araugio Soares

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais
como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre.

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Comissão Nacional de Energia Nuclear
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA NUCLEAR
**Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia das Radiações,
Minerais e Materiais**
Área de concentração: Ciência e Tecnologia das Radiações
Técnicas Nucleares aplicadas na Saúde e na Biologia

**“IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DA
PEÇONHA DE *Crotalus durissus terrificus* E AVALIAÇÃO DO SEU
POTENCIAL USO NA DETECÇÃO DE TUMORES”**

MARCELLA ARAUGIO SOARES

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre.

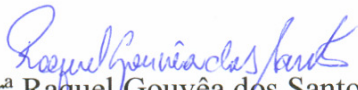
Área de concentração: Ciência e Tecnologia das Radiações: Técnicas Nucleares aplicadas na Saúde e na Biologia.

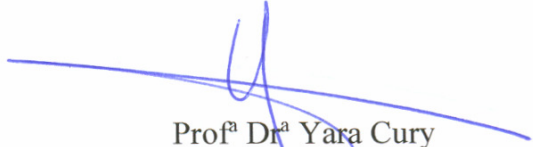
Orientadora: Dra. Raquel Gouvêa dos Santos

Belo Horizonte
2007

A presente dissertação de mestrado, intitulada “**Identificação e caracterização do efeito antitumoral da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* e avaliação do seu potencial uso na detecção de tumores**” de autoria de **MARCELLA ARAUGIO SOARES**, foi defendida e aprovada em 30 de maio de 2007 pela Banca Examinadora abaixo assinada.

Belo Horizonte, 30 de maio de 2007


Prof^ª Dr^ª Raquel Gouvêa dos Santos
CDTN - Orientadora


Prof^ª Dr^ª Yara Cury
Instituto Butantan


Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali
UFMG


Prof^ª Dr^ª Maria José Neves
CDTN

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar o meu caminho e por estar sempre tão perto em todos os momentos da minha vida...

Aos meus pais, pelo amor que tanto me conforta... Por me ensinarem a seguir sempre o caminho do bem, a valorizar os pequenos gestos e as coisas mais simples... Pelo olhar carinhoso nos momentos de tristeza, por me incentivarem a encarar os maiores desafios e por vibrarem sempre com as minhas vitórias.

À Dra. Raquel Gouvêa, pela oportunidade, confiança e pelos ensinamentos valiosos que me acompanharão durante toda a vida...

Às minhas avós Marena e Zizinha, guerreiras...grandes exemplos de vida... Por transmitirem através do olhar a importância de ter sempre muita vontade de viver, mesmo diante das maiores dificuldades...

À tia Anna, minha segunda mãe... minha primeira professora de Biologia... Quem me ensinou a acreditar e confiar em Deus... Obrigada por tudo!

Ao Reizer, companheiro de todos os momentos... Pelo carinho, incentivo, paciência, generosidade... por me fazer tão feliz...

Ao Beca, por estar sempre presente... Pela amizade e companheirismo...

Às minhas amigas queridas: Di, Cris, Magdinha e Nanô, pela amizade sincera e incondicional... Por trazerem tranquilidade nos momentos mais conturbados e por ouvirem com tanta paciência minhas intermináveis lamentações... Pelos tantos momentos felizes que vivemos juntas...

À Priscilla Pujatti, amiga querida e colaboradora imprescindível neste projeto. Por estar sempre disposta a ajudar e pela alegria de viver que contagia todos que estão à sua volta...

Aos amigos da Radiobiologia: Tetê, Lu, Ju Soprani, Ju Matos, Thaíssa, Karine, Ariane, Paulo, Nino, Fred, Edinho e Flaviano, minha segunda família durante esses dois anos... Pelas idéias compartilhadas, churrascos, congressos, gargalhadas, lágrimas... Por crescerem junto comigo a cada dia...

Às amigas Kezia e Marina... por se fazerem tão presentes mesmo estando distantes... Pelos conselhos valiosos e pela amizade sincera.

Aos amigos da pós: Karynne, Carol, Vanessa, Valdirene, Léo e Daniel, pelo carinho, companheirismo e por tornarem os meus dias no CDTN muito mais alegres!

Aos professores da Radiobiologia: Dra. Maria José Neves e Dr. Antero Silva, pelos grandes ensinamentos e pela boa vontade em esclarecer minhas dúvidas durante todos esses anos...

Ao Professor Dr. Alfredo Góes, por permitir o uso dos equipamentos do seu laboratório e por estar sempre disposto a colaborar.

Aos Professores Dr. Carlos Chávez e Dra. Consuelo Fortes Dias pela colaboração no fracionamento da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*.

À Professora Dra. Marinez Souza pela colaboração nas análises bioquímicas toxicológicas.

À Dra. Liz Antonelli, pela atenção e colaboração nas análises de citometria de fluxo.

Ao Professor Dr. Geovanni Cassali e suas alunas Patrícia e Ana Paula, pela atenção, boa vontade e pela colaboração nos experimentos com animais implantados com tumor de Ehrlich.

Ao Dr. Carlos Simal, por fornecer o ^{99m}Tc .

Aos funcionários do LIG: Cida, Rogério Rivail, Eduardo e Ricardo Ferracini, pelas irradiações das culturas de células.

Aos professores da pós-graduação: Dr. José Correia Neves, Dr. Javier Rios, Dr. Maximiliano Martins, Dra. Adelina Santos, Dra. Clascidia Furtado e Dr. Waldemar Macedo.

Aos Professores de Inglês Leonardo Lessa e de Espanhol Edgar Flores.

Aos funcionários do reator: Fausto, Paulinho, Rocha, Amaral e José Augusto.

Ao Zacarias, Dovenir e Julinho, pelo apoio técnico.

Às bibliotecárias Lenira, Virgínia e Nívea.

Às secretárias da pós-graduação Andréia e Roseli.

Aos funcionários do RH, Machado e Marilene.

Ao CDTN pelas instalações e apoio financeiro.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

SOARES M.A. - “Identificação e caracterização do efeito antitumoral da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* e avaliação do seu potencial uso na detecção de tumores”

Os conhecimentos fundamentais sobre neoplasias estão aumentando rapidamente, no entanto, poucos avanços estão sendo obtidos na clínica para terapia e diagnóstico de tumores. Por este motivo o desenvolvimento de drogas alternativas é de extrema importância na tentativa de melhorar o prognóstico da doença e aumentar a sobrevivência dos pacientes. Peçonhas de serpentes constituem fontes naturais de substâncias bioativas com grande potencial terapêutico. O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar o efeito antitumoral da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (PC) e seus polipeptídeos, Crotoxina e Crotamina, sobre linhagens de tumores cerebrais, bem como avaliar seu potencial radiosensibilizador e sua aplicabilidade para detecção de tumores *in vivo*. Os resultados obtidos demonstraram que PC possui potente efeito antitumoral sobre tumores benigno, adenoma de pituitária (GH3), e maligno, glioblastoma multiforme (RT2), com IC₅₀ de 0,96µg/mL e 2,15µg/mL, respectivamente. Este efeito antitumoral ocorre via apoptose, é ciclo específico e dependente de cálcio extracelular, um importante fator para a atividade fosfolipásica A2 do principal componente da PC, Crotoxina. PC também apresentou um importante efeito radiosensibilizador, tornando os tumores até 66% mais sensíveis à radioterapia. O efeito antitumoral da PC pode ser atribuído, pelo menos parcialmente, aos polipeptídeos Crotoxina e Crotamina, que também induziram apoptose das células de tumores cerebrais. Estes componentes da PC interagiram de maneira específica com tumores sólidos malignos *in vitro* e foram capazes de detectar foco tumoral *in vivo*. Apesar da conhecida nefrotoxicidade e neurotoxicidade da PC, o tratamento agudo com a dose antitumoral da PC estabelecida *in vitro* não foi tóxico para os animais analisados. Estes resultados indicam o potencial biotecnológico da PC como fonte de moléculas moldes para o desenvolvimento de fármacos e radiofármacos para a terapia e/ou diagnóstico do câncer.

ABSTRACT

SOARES, M.A. - Identification and characterisation of *Crotalus durissus terrificus* venom antitumoral effect and evaluation of its potential use for tumours detection.

The neoplasms basic knowledge is increasing quickly, however, few advances have been reached in clinical therapy and diagnosis of tumours. For this reason, the development of alternative drugs is relevant in the attempt to improve prognosis and to increase the patients survival. Snake venoms are natural sources of bioactive substances with therapeutically potential. The objective of this work was to identify and to characterise the antitumoral effect of *Crotalus durissus terrificus* venom (PC) and its fractions, Crotoxin and Crotamine, on brain tumours, as well as, to evaluate its radiosensibilising potential and its applicability for tumours detection *in vivo*. The results demonstrated that PC possess a powerful antitumoral effect for benign (pituitary adenoma) and malignant (glioblastoma multiforme) tumours with IC₅₀ values of 0,96µg/mL and 2,15µg/mL, respectively. This antitumoral effect is mediated by apoptosis induction; it is cell cycle specific and dependent of extracellular calcium, an important factor for Crotoxin phospholipase A2 activity. Besides being a powerful antitumoral agent, PC also presented an important radiosensibilising effect, increasing in 66% the tumour radiotherapy sensitivity. The PC antitumoral effect can be ascribed, at least partially, to the polypeptides Crotoxin and Crotamine that also induced brain tumours apoptosis. These PC polypeptides specifically interacted with malignant tumours *in vitro* and demonstrated to be capable to detect tumoral focus *in vivo*. In spite of the PC known nephrotoxicity and neurotoxicity, acute treatment with its antitumoral dose established *in vitro* was not found to be toxic for the analysed animals. These results indicate the biotechnological potential of PC as source of templates for pharmaceutical and radiopharmaceutical design for cancer therapy and diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Desenho esquemático das fases do ciclo celular e seus respectivos pontos de checagem (Ilustração adaptada de CANCER LINE, 2006. Disponível em http://www.cancerline.com).	22
FIGURA 2: Complexos ciclina/cdk reguladores das diferentes fases do ciclo celular de mamíferos (Adaptado de COOPER, 2000).	23
FIGURA 3: Regulação da atividade transcricional de E2F (Adaptado de JOHNSON et al., 1999).	24
FIGURA 4: Alterações que diferenciam a morte apoptótica da morte necrótica. (Adaptado de ZIEGLER et al., 2004).	27
FIGURA 5: Desenho esquemático da apoptose via mitocondrial (Adaptado de ZIMMERMANN et al., 2001).	28
FIGURA 6: Desenho esquemático da apoptose via receptores de morte (Adaptado de FLEISCHER et al., 2006).	29
FIGURA 7: Desenho esquemático da apoptose ativada por TNF α e mediada por esfingomielinase (Adaptado de DING et al., 2004).	30
FIGURA 8: Desenho esquemático da apoptose induzida por cFLA2 (Adaptado de ZHAO et al., 2002).	31
FIGURA 9: Desenho esquemático da imunidade contra tumores e os mecanismos de fuga da resposta imune presentes na maior parte das células de tumores malignos (Adaptado de ABBAS et al., 2005).	33
FIGURA 10: Frequência dos diferentes tipos de tumores cerebrais primários (Adaptado de AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION, 2006).	36
FIGURA 11: Alterações genéticas em glioblastoma multiforme (Adaptado de BRAT et al., 2003).	38
FIGURA 12: Alterações genéticas em adenoma de pituitária.	40
FIGURA 13: Desenho esquemático das características de penetração das radiações ionizantes (ANDREUCCI, 2005).	47
FIGURA 14: Sinalização da paralisação do ciclo celular após um dano causado pela radiação ionizante.	51
FIGURA 15: <i>Crotalus durissus terrificus</i> (Foto de Laura Watson – Disponível em: http://www.serpentario.edu.uy/expolaura/2.html).	54

FIGURA 16: Interação da Crotoxina com a membrana plasmática (Adaptado de CELTIC BIOTECH, 2006. Disponível em: http://www.celticbiotech.com/bio_pharmaceuticals.php).....	56
FIGURA 17: Câmara de Neubauer (MANNHEIM, 1998)	60
FIGURA 18: Desenho esquemático do MTT sendo reduzido pelas enzimas desidrogenases de células metabolicamente viáveis e dando origem ao Formazan.	63
FIGURA 19: Desenho esquemático do controle de qualidade da radiomarcagem com ^{99m} Tc por cromatografia ascendente em SILICA GEL 60 descendente em papel WHATTMAN N°1.....	75
FIGURA 20: Efeito citotóxico da peçonha de <i>Crotalus durissus terrificus</i> para as células GH3.	79
FIGURA 21: Efeito citotóxico da peçonha de <i>Crotalus durissus terrificus</i> para as células RT2.....	80
FIGURA 22: Efeito citotóxico da radiação gama para as células GH3.	81
FIGURA 23: Efeito citotóxico da radiação gama para as células RT2.	82
FIGURA 24: Efeito da peçonha de <i>Crotalus durissus terrificus</i> sobre a proliferação de linhagens de tumores cerebrais.....	84
FIGURA 25: Colônias formadas após tratamento com PC.....	85
FIGURA 26: Efeito da radiação gama sobre a proliferação das linhagens de tumores cerebrais.....	86
FIGURA 27: Colônias formadas após tratamento com radiação gama.....	87
FIGURA 28: Fotomicrografia das células GH3 e RT2 tratadas com PC.....	89
FIGURA 29: Fotomicrografia das células GH3 e RT2 tratadas com radiação gama.....	90
FIGURA 30: Avaliação da degradação do DNA induzida pela PC e pela radiação gama.	92
FIGURA 31: Apoptose induzida por PC, radiação gama e cisplatina (CTL+) em células GH3, visualizada através da coloração com DAPI.....	94
FIGURA 32: Apoptose induzida por PC, radiação gama e cisplatina (CTL+) em células RT2 visualizada através da coloração com DAPI.	95
FIGURA 33: Análise do ciclo celular de células tratadas com PC e cisplatina (CTL+).97	
FIGURA 34: Análise do sobrenadante das células GH3 e RT2 tratadas com PC, em gel de acrilamida (SDS/PAGE) e Zimografia (SDS/PAGE-Gelatina).....	99
FIGURA 35: Avaliação da influência do Ca ⁺² e SFB na atividade da PC.....	101

FIGURA 36: Perfil protéico da PC e avaliação da sua atividade gelatinolítica.....	102
FIGURA 37: Avaliação do potencial radiosensibilizador da PC em células GH3.....	104
FIGURA 38: Avaliação do potencial radiosensibilizador da PC em células RT2.....	105
FIGURA 39: Apoptose induzida pelo tratamento combinado de PC e radiação gama, visualizada através da coloração com DAPI.	106
FIGURA 40: Análise das alterações hematológica induzidas pelo tratamento agudo com	108
FIGURA 41: Análise das alterações bioquímicas induzidas pelo tratamento agudo com	109
FIGURA 42: Fotomicrografia do fígado, pulmão, rim, coração e cérebro de um animal representativo do grupo tratado com a	110
FIGURA 43: Avaliação do efeito citotóxico da Crotoxina para as células GH3 e RT2.	113
FIGURA 44: Avaliação do efeito citotóxico da Crotamina sobre as células GH3 e RT2.	114
FIGURA 45: Fotomicrografia das células GH3 e RT2 tratadas com Crotoxina e Crotamina.	115
FIGURA 46: Apoptose induzida pela Crotoxina e Crotamina em células GH3 e RT2, visualizada pela coloração com DAPI.....	116
FIGURA 47: Estudo da interação dos polipeptídeos da PC radiomarcados com os receptores de membrana das células RT2, Ehrlich e P2.....	119
FIGURA 48: Atividade hemolítica indireta de PC nativa e ^{99m} Tc-PC.....	121
FIGURA 49: Cinética da concentração da ^{99m} Tc-PC no sangue de animais com tumor de Ehrlich.	124
FIGURA 50: Cinética da concentração da ^{99m} Tc-PC no tumor de Ehrlich.....	124
FIGURA 51: Análise comparativa da concentração da ^{99m} Tc-PC no tumor de Ehrlich e na pata sem tumor.....	125
FIGURA 52: Comparação do perfil de biodistribuição das moléculas radiomarcadas e dos possíveis contaminantes presentes nos radiofármacos (^{99m} TcO ₂ , ^{99m} TcO ₄ ⁻ e Na ¹²⁵ I).	126

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Diferenciação entre tumores benignos e malignos	20
TABELA 2: Graduação da <i>performance</i> dos pacientes pelo índice de Karnofsky	37
TABELA 3: Análise comparativa do efeito citotóxico dos diferentes tratamentos estudados	82
TABELA 4: Síntese de sondas radioativas da Crotoxina e Crotamina utilizando ^{125}I como radiotraçador	117
TABELA 5: Síntese da sonda radioativa da PC utilizando $^{99\text{m}}\text{Tc}$ como radiotraçador	120
TABELA 6: Cinética da biodistribuição da $^{99\text{m}}\text{Tc-PC}$ (%DI/g) em animais com tumor de Ehrlich.....	122
TABELA 7: Biodistribuição da $^{99\text{m}}\text{Tc-PC}$, $^{125}\text{I-Crtx}$, $^{125}\text{I-Crota}$	127
30 minutos após a injeção (%DI/g)	127
TABELA 8: Proporção entre a concentração de $^{99\text{m}}\text{Tc-PC}$, $^{125}\text{I-Crtx}$, $^{125}\text{I-Crota}$ no tumor e órgãos adjacentes.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **AA:** Ácido araquidônico.
- **ACTH:** Adrenocorticotrofina.
- **Apaf1:** Fator de ativação da apoptose.
- **ATCC:** American Type Cell Collection.
- **ATM :** Gene mutado da ataxia telangiectasia.
- **ATR :** Gene da ataxia telangiectasia e relacionado a RAD3.
- **Bad:** Promotor de morte associado a Bcl-2.
- **Bak:** Antagonista homólogo de Bcl-2.
- **Bax:** Proteína X associada a Bcl-2.
- **BCL-2:** B-Linfoma celular 2.
- **BCNU:** 1,3-bis (2-cloroetil)-nitrosouréia.
- **Bid:** Agonista do domínio de morte de interação BH3.
- **Bq:** Becquerel.
- **BSA:** Albumina sérica bovina.
- **Ca⁺²:** Cálcio.
- **Cdk:** Quinase dependente de ciclina.
- **Cdt:** *Crotalus durissus terrificus*.
- **CEBIO:** Centro de bioterismo.
- **céls:** Células.
- **Chk:** proteína quinase que regula os pontos de checagem.
- **Ci:** Curie.
- **CK:** Creatina Quinase.
- **CKI:** Inibidor do complexo ciclina/cdk.
- **cm:** Centímetro.
- **c-MYC:** c-miolócitomatose.
- **CO₂:** Dióxido de carbono.
- **Crota:** Crotamina
- **Crtx:** Crotoxina.
- **CTL+:** Controle positivo.
- **Da:** Daltons.
- **DAPI:** 4',6- diamidine- 2'- phenindole dihydrochloride.
- **DD:** Domínio de morte.
- **DED:** Domínio efetor da morte.
- **DFF:** Fator de fragmentação do DNA.
- **DL:** Dose letal.
- **DMEM:** Dulbecco's modified Eagle's Medium.
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido.
- **DNA-PK :** proteína quinase dependente de DNA.
- **DI :** Dose injetada.
- **DP:** Desvio Padrão.
- **dps:** Desintegrações por segundo.
- **DSB:** Quebra de fita dupla.
- **EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético.
- **EGFR:** receptor de crescimento epidermal.
- **EPI:** Equipamentos de proteção individual.
- **eV:** Elétronvolt.
- **FAN:** Fator associado à ativação de esfingomielinase neutra.
- **FasL:** Ligante de Fas.
- **FLA₂:** Fosfolipase A₂.
- **FLICE:** Enzima conversora de IL-1 β FADD-like.
- **FSH:** Hormônio estimulante folicular.
- **GBM:** Glioblastoma multiforme.
- **GH:** Hormônio do crescimento.
- **GH3:** Linhagem de células de adenoma de hipófise murino.
- **Gy:** Gray.
- **h:** Horas.
- **HCl:** Ácido clorídrico.
- **HER2/neu:** Receptor de fator de crescimento epidermal humano.
- **i.m.:** Intramuscular.
- **i.p.:** Intraperitoneal.
- **i.v.:** Intravenosa.
- **IL:** Interleucinas.
- **INF- γ :** Interferon γ .
- **IP:** Iodeto de propídio.
- **kDa:** Kilodaltons.
- **keV:** Kiloelétronvolt.
- **Kg:** Kilograma.
- **LH:** Hormônio luteinizante.
- **M.O.:** Microscópio óptico.
- **M:** Molar.
- **m²:** Metro quadrado.
- **mCi:** Milicurie.
- **MDM2 :** Minuto duplo murino.
- **mg:** Miligrama.
- **min.:** Minuto.

- **mM**: Milimolar.
- **mm²**: Milímetro quadrado.
- **MN**: Mononucleares.
- **MTT**: 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide.
- **Na⁺**: Sódio.
- **NaBH₄**: Borohidreto de sódio.
- **NaOH**: Hidróxido de sódio.
- **NF**: Fator nuclear.
- **ng**: Nanograma.
- **NK**: Células *Natural killer*.
- **nM**: Nanomolar.
- **Nº**: Número.
- **°C**: Graus Celsius.
- **P2**: Sinaptossomas de cérebro de rato.
- **PBS**: Tampão Fosfato de sódio.
- **PC**: Peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*.
- **PDGF**: Fator de crescimento derivado de plaquetas.
- **PET**: Tomografia por emissão de pósitron.
- **PM**: Peso molecular.
- **PMN**: Polimorfonucleares.
- **PN**: Pata normal.
- **PRL**: Prolactina.
- **Proteína Rb**: Proteína do retinoblastoma.
- **PT**: Para com tumor.
- **PTEN**: Fosfatase e homólogo de tensina mutado.
- **PTTG**: Gene de transformação do tumor de pituitária.
- **RM**: Ressonância Magnética.
- **Rpm**: Rotações por minuto.
- **RT2**: Linhagem de células de glioblastoma murino.
- **s.c.**: Subcutânea.
- **SDS/PAGE**: Eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS.
- **SDS**: Dodecil sulfato de sódio.
- **SFB**: Soro fetal bovino.
- **Smase**: Esfingomielinase.
- **SNC**: Sistema nervoso central.
- **SnCl₂**: Cloreto estanoso.
- **SPECT**: Tomografia por emissão de fóton único.
- **T^{1/2}**: Meia vida.
- **TAE**: Tampão Tris, acetato de sódio e EDTA.
- **TBSA**: Tampão Tris BSA.
- **TC**: Tomografia computadorizada.
- **TEMED**: N,N,N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano.
- **TMZ**: Temozolomida.
- **TNF**: Fator de necrose tumoral.
- **TNFR**: Receptores de fator de necrose tumoral.
- **TP53BP1** : proteína de ligação à p53.
- **TRAIL**: Ligante indutor de apoptose relacionado à TNF.
- **TSH**: Tireotrofinas.
- **UV**: Ultravioleta.
- **V**: Volt.
- **µg**: Micrograma.
- **µm**: Micrômetro.
- **¹²⁵I**: Iodo 125.
- **¹³¹I**: Iodo 131.
- **¹⁸F**: Flúor 18.
- **¹⁸F-FDG**: ¹⁸F-Fluordesoxiglicose.
- **²⁰¹Ta**: Tálcio 201.
- **⁶⁷Ga**: Gálio 67.
- **^{99m}Tc**: Tecnécio 99 metaestável.
- **^{99m}Tc-DTPA**: ^{99m}Tc-ácido-dietilenotriaminopentacético.
- **^{99m}Tc-HIDA** : ^{99m}Tc-ácido-hepatoiminodiacético.
- **^{99m}Tc-MDP**: ^{99m}Tc-medronato.
- **^{99m}TcO₄⁻** : Pertecnetato.
- **^{99m}TcO₂** : Tecnécio coloidal.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Câncer: definição, causas e dados estatísticos	17
1.2	Distúrbios do crescimento e diferenciação celular	18
1.2.1	Classificação e nomenclatura dos tumores	19
1.3	Biologia Molecular dos tumores	21
1.3.1	O Ciclo Celular	21
1.3.2	Morte celular programada (Apoptose)	25
1.4	Imunidade contra tumores	31
1.5	Diagnóstico de tumores: aplicações da Medicina Nuclear	34
1.6	Os Tumores cerebrais	35
1.6.1	Glioblastoma Multiforme	36
1.6.2	Adenoma de Pituitária	38
1.7	Principais formas de tratamento de tumores	40
1.7.1	Tratamento cirúrgico	40
1.7.2	Quimioterapia	41
1.7.3	Radioterapia	44
1.8	A busca de novas terapias	51
1.9	A peçonha da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	53
1.9.1	Estudos experimentais sobre a atividade antitumoral da peçonha de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e da sua principal toxina	56
2	JUSTIFICATIVA	58
3	OBJETIVOS	59
	Objetivo Geral	59
	Objetivos Específicos	59
4	MATERIAIS E MÉTODOS	60
4.1	Cultivo celular	60
4.2	Peçonha de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e seus polipeptídeos	61
4.3	Radiação Gama	61
4.4	Cisplatina	61
4.5	Animais	62

4.6	Avaliação do efeito antitumoral da peçonha de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e da radiação gama em células de tumores cerebrais.....	62
4.6.1	Estudo do efeito citotóxico da PC e da radiação gama: avaliação da taxa de sobrevivência das células tratadas	63
4.6.2	Estudo do efeito da PC e da radiação gama sobre a proliferação celular.....	64
4.7	Avaliação do mecanismo de ação antitumoral da PC e da radiação gama .	64
4.7.1	Análise morfológica	64
4.7.2	Análise eletroforética da fragmentação do DNA induzida pela PC e pela radiação gama.....	65
4.7.3	Análise das alterações do DNA cromossomal, induzidas pela PC e pela radiação gama, através da coloração com DAPI	65
4.7.4	Análise do ciclo celular das células tratadas com PC por citometria de fluxo	66
4.7.5	Análise do sobrenadante das células tratadas com PC por eletroforese (SDS-PAGE) e Zimografia.....	66
4.7.6	Avaliação da influência do Ca ⁺² e do SFB na atividade antitumoral da PC ..	68
4.8	Avaliação da atividade gelatinolítica da PC.....	68
4.9	Avaliação do potencial radiosensibilizador da PC.....	69
4.10	Avaliação da toxicidade aguda produzida pela administração da dose antitumoral da PC estabelecida in vitro.....	69
4.11	Avaliação do papel da Crotoxina e da Crotamina no efeito antitumoral da PC	71
4.12	Síntese de sonda radioativa da Crotoxina e da Crotamina, utilizando ¹²⁵I como radiotraçador, para estudos de interação com células tumorais in vitro e biodistribuição em animais com tumor de Ehrlich	72
4.12.1	Síntese de sonda radioativa da Crotoxina e da Crotamina utilizando ¹²⁵ I como radiotraçador	72
4.12.2	Estudo da interação da Crotoxina e da Crotamina radiomarcadas com alvos presentes na membrana das células tumorais	73
4.13	Síntese de sonda radioativa da PC, utilizando o radioisótopo ^{99m}Tc como radiotraçador, para estudos de biodistribuição em animais com tumor de Ehrlich	73
4.14	Avaliação da interação, in vivo, da ^{99m}Tc-PC, ¹²⁵I-Crtx e ¹²⁵I-Crota com células tumorais – Biodistribuição em animais com tumor de Ehrlich.....	75
4.15	Análise estatística.....	76
5	RESULTADOS	77
5.1	Avaliação do efeito antitumoral da PC e da radiação gama em células de tumores cerebrais	77
5.1.1	Estudo do efeito de citotóxico da PC e da radiação gama: avaliação da taxa de sobrevivência das células tratadas	77
5.1.2	Estudo do efeito da PC e da radiação gama sobre a proliferação celular.....	83

5.2	Avaliação do mecanismo de ação antitumoral da PC e da radiação gama.	88
5.2.1	Análise morfológica	88
5.2.2	Análise eletroforética da fragmentação do DNA induzida pela PC e pela radiação gama	91
5.2.3	Análise das alterações do DNA cromossomal, induzidas pela PC e pela radiação gama, através da coloração com DAPI	93
5.2.4	Análise do ciclo celular das células tratadas com PC por citometria de fluxo	96
5.2.5	Análise do sobrenadante das células tratadas com PC por eletroforese (SDS-PAGE) e Zimografia.....	98
5.2.6	Avaliação da influência do SFB e do Ca ⁺² na atividade antitumoral da PC	100
5.3	Avaliação da atividade gelatinolítica da PC.....	102
5.4	Avaliação do potencial radiosensibilizador da PC.....	103
5.5	Avaliação da toxicidade aguda produzida pela administração da dose antitumoral da PC estabelecida in vitro	107
5.6	Avaliação do papel da Crotoxina e da Crotamina no efeito antitumoral da PC	111
5.7	Síntese de sonda radioativa da Crotoxina e da Crotamina, utilizando ¹²⁵I como radiotraçador, para estudos de interação com células tumorais in vitro e biodistribuição em animais com tumor de Ehrlich	117
5.7.1	Síntese de sonda radioativa da Crotoxina e da Crotamina utilizando ¹²⁵ I como radiotraçador.....	117
5.7.2	Estudo da interação, <i>in vitro</i> , da Crotoxina e da Crotamina radiomarcadas com alvos presentes na membrana das células tumorais.....	118
5.8	Síntese de sonda radioativa da PC, utilizando o radioisótopo ^{99m}Tc como radiotraçador, para estudos de biodistribuição em animais com tumor de Ehrlich	120
5.9	Avaliação da interação, in vivo, da ^{99m}Tc-PC, ¹²⁵I-Crtx e ¹²⁵I-Crota com células tumorais – Biodistribuição em animais com tumor de Ehrlich	122
6	DISCUSSÃO	129
7	CONCLUSÕES.....	137
	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	138
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
	APÊNDICE.....	152

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer: definição, causas e dados estatísticos

O câncer é uma patologia caracterizada pela multiplicação e propagação descontrolada de formas anômalas das células do organismo. Os termos câncer, neoplasia maligna e tumor maligno são sinônimos e distinguem-se dos tumores benignos principalmente devido ao poder de invasão e capacidade de metastatizar (RANG et al., 2003). Além disso, diferente das neoplasias benignas que são bem diferenciadas, as neoplasias malignas são caracterizadas por uma variedade de graus de diferenciação das células parenquimatosas, que podem ser muito bem diferenciadas ou até completamente indiferenciadas.

As células tumorais multiplicam-se de forma acelerada, invadem os tecidos à sua volta e estimulam a formação de novos vasos sanguíneos que as nutrirão, permitindo a manutenção do crescimento descontrolado. O acúmulo dessas células forma os tumores malignos, que adquirem a capacidade de se desprender e migrar. Invadem inicialmente os tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através desses, dissemina-se formando as metástases. O processo de formação do tumor, ou tumorigênese, em geral se dá lentamente; são necessários vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor visível (INCA, 2007).

São vários os fatores de risco que aumentam a propensão individual ao câncer e a urbanização, a industrialização e a maior expectativa de vida da população têm contribuído bastante para o aumento desses fatores, favorecendo não só a maior produção dos agentes carcinógenos ambientais, mas também, a maior e mais prolongada exposição dos seres humanos a esses agentes. Os principais fatores de risco implicados na gênese de diversos tipos de câncer são: fumo, hábitos alimentares com elevada ingestão de gordura saturada e baixa ingestão de fibras, consumo de álcool e a exposição às várias formas de radiação (TRICHPOULAS et al., 1996). No entanto, os agentes biológicos também têm sido reconhecidos como importantes desencadeadores do processo de tumorigênese. O papilomavírus, por exemplo, tem sido identificado em 18 a 95% dos carcinomas de colo uterino e embora a infecção viral sozinha não seja suficiente para iniciar o processo de transformação maligna do epitélio cervical, numerosas evidências indicam que a presença do vírus predispõe a alterações genéticas

adicionais (ZUR HAUSEN, 2001). Além dos fatores químicos, físicos e biológicos que levam à tumorigênese, estima-se que 5-10% de todos os tumores estão relacionados a fatores hereditários (AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION, 2006).

O câncer é um dos mais antigos males da humanidade. As estatísticas mundiais mostram que mais de 11 milhões de casos novos de câncer são diagnosticados todos os anos e estima-se que em 2020 este número será equivalente a 16 milhões. O câncer mata cerca de 7 milhões de pessoas por ano, o que corresponde a 12,5% das causas de morte no mundo. Os cinco tipos de câncer mais comuns na população mundial são os de pulmão, mama, estômago, cólon-retal e colo de útero, sendo os de mama e colo de útero os mais comuns entre as mulheres e estômago e pulmão os mais comuns entre os homens. As maiores taxas de incidência de câncer são encontradas nos países desenvolvidos (Estados Unidos, Itália, Austrália, Alemanha, Canadá e França) e nos países em desenvolvimento, as taxas mais elevadas encontram-se nos países africanos e no leste asiático (WHO, 2007).

No Brasil, as neoplasias representam a segunda maior causa de morte por doenças, atrás somente das doenças do aparelho circulatório. Em 2006 ocorreram 472.050 casos novos de câncer. Os tipos com maior incidência foram os de próstata e pulmão no sexo masculino e mama e colo do útero no sexo feminino. A distribuição dos casos novos de câncer segundo localização primária é bem heterogênea entre estados e capitais do país; as regiões Sul e Sudeste apresentam as maiores taxas, enquanto que as regiões Norte e Nordeste mostram taxas mais baixas. As taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário (INCA, 2007).

1.2 Distúrbios do crescimento e diferenciação celular

Os limites entre os crescimentos não-neoplásicos e neoplásicos não são, ainda, bem definidos. No entanto, pode-se afirmar que algumas lesões proliferativas não-neoplásicas evoluirão para um crescimento neoplásico, ou seja, um processo proliferativo controlado passará a crescimento não-controlado (INCA, 2007).

As principais lesões proliferativas não-neoplásicas são:

- Hiperplasia: caracteriza-se pelo aumento localizado e limitado do número de células de um órgão ou parte dele. As células hiperplásicas, apesar de formarem uma população nova de células crescendo no local, conservam os mecanismos de controle da divisão

celular. A hiperplasia é um processo reversível, ou seja, se o agente causador da hiperplasia deixar de atuar, as células voltam ao nível normal. Ela pode ser fisiológica, como ocorre no útero durante a gravidez e na mama durante a puberdade, ou patológica como ocorre em casos de hiperfunção da tireóide e em inflamações crônicas.

- Metaplasia: é a substituição de um tipo de tecido adulto (epitelial ou mesenquimal) por outro da mesma linhagem. Representa uma tentativa do organismo de substituir um tecido exposto a um estímulo agressor por um tecido mais apto a suportá-lo. Um exemplo de metaplasia é a transformação de um epitélio não ceratinizado em um epitélio ceratinizado, como ocorre no epitélio da boca ou esôfago em consequência de irritação prolongada.

- Displasia: caracterizada por alterações importantes do crescimento e da diferenciação celular. Os exemplos mais conhecidos são as displasias epiteliais, nas quais ocorrem, em graus variados, aumento do crescimento celular (hiperplasia), distúrbios da maturação das células e atipias celulares e arquiteturais. Não raro, estão associadas com ou se originam de tecidos metaplásicos. Nem sempre uma displasia progride para o câncer, já que pode estacionar ou até regredir.

A neoplasia é definida como proliferações localizadas de células que têm crescimento autônomo (FILHO et al., 2000).

1.2.1 Classificação e nomenclatura dos tumores

A classificação das neoplasias leva em consideração três aspectos básicos: o comportamento clínico (maligno ou benigno), o aspecto microscópico (critério histomorfológico) e a origem da neoplasia (critério histo-genético). De acordo com o comportamento clínico os tumores são classificados como malignos e benignos e os critérios que permitem estabelecer a diferença entre esses dois tipos de tumores são (TAB. 1):

- Crescimento: tumores benignos apresentam crescimento lento e expansivo, possuem estroma com bom suprimento vascular e raramente apresentam necrose e hemorragia. Os tumores malignos possuem crescimento rápido e desorganizado, têm caráter infiltrativo, alto índice de multiplicação e, por isso, apresentam grande desproporção entre o parênquima tumoral e o estroma vascularizado. Áreas extensas de necrose ou hemorragia são encontradas nesse tipo de tumor.

- Encapsulação: tumores benignos possuem pseudocápsulas fibrosas, formadas devido à compressão dos tecidos vizinhos pelo crescimento lento e expansivo do tumor. Em tumores malignos, o crescimento rápido, desordenado e infiltrativo não permite a formação das pseudocápsulas.
- Morfologia: as células tumorais apresentam graus variados de diferenciação. Células de tumores benignos são bem diferenciadas e possuem aspectos característicos dos tecidos que as originaram. Células de tumores malignos variam desde bem diferenciadas até completamente indiferenciadas e apresentam caracteres morfológicos que se afastam, em grau variado, daqueles da célula de origem.
- Mitoses: tumores malignos, por apresentarem alta taxa proliferativa, possuem maior número de figuras mitóticas.
- Metástases: caracteriza-se pelo crescimento neoplásico secundário, à distância, sem continuidade com foco primitivo. Apenas os tumores malignos possuem a capacidade de metastatizar (INCA, 2007).

TABELA 1: Diferenciação entre tumores benignos e malignos

CRITÉRIOS	BENIGNOS	MALIGNOS
Crescimento	Lento, expansivo e bem delimitado.	Rápido, infiltrativo com delimitação imprecisa.
Encapsulação	Presença freqüente.	Geralmente ausente.
Morfologia	Reproduz o aspecto do tecido de origem.	Caracteres diferentes do tecido de origem.
Mitoses	Raras.	Freqüentes.
Metástases	Não ocorrem.	Freqüentes.

Fonte: INCA, 2007.

A nomenclatura de quase todos os tipos de tumores recebe o sufixo –oma, que significa literalmente tumor. Os tumores benignos recebem o nome dos tecidos que o compõem acrescido do sufixo –oma como, por exemplo, o tumor benigno do tecido glandular que recebe o nome de adenoma. Quanto aos tumores malignos, é necessário considerar a origem embrionária dos tecidos, dos quais se deriva o tumor, para aplicar as regras da nomenclatura. Os tumores malignos originários do epitélio de revestimento são denominados carcinomas; um tumor originado de um epitélio glandular, por

exemplo, é chamado adenocarcinoma. Tumores malignos originários dos tecidos conjuntivos são denominados sarcomas (ex: lipossarcoma) e aqueles originários de células blásticas são denominados blastomas (ex: neuroblastoma). Alguns tumores recebem o nome dos cientistas que os descreveram pela primeira vez, como por exemplo: linfoma de Burkitt, sarcoma de Ewing, tumor de Wilms, dentre outros (FILHO et al., 2000; INCA, 2007).

1.3 Biologia Molecular dos tumores

1.3.1 O Ciclo Celular

O ciclo celular é um processo altamente ordenado que resulta na duplicação e transmissão da informação genética de uma geração de células para a outra. Para isso, o DNA deve ser replicado e cópias idênticas dos cromossomos devem ser distribuídas para duas células filhas. O ciclo celular compreende duas fases distintas: a mitose (fase M) onde ocorre a divisão celular propriamente dita e a interfase, que corresponde ao intervalo entre o final de uma mitose e início da outra (ISRAELS et al., 2000).

A interfase é dividida em três fases:

- A fase G_1 (*Gap1*) corresponde ao intervalo entre a mitose (fase M) e a fase de síntese do DNA (fase S). É nesta fase que a célula recebe os sinais mitogênicos e inibitórios do crescimento e decidem se devem proceder, parar ou sair do ciclo celular. RNA e proteínas são sintetizados durante esta fase.
- A fase S é definida como aquela em que todo o DNA é replicado. Durante esta fase, o conteúdo de DNA aumenta de um valor diplóide $2n$ para um valor completamente replicado $4n$.
- A fase G_2 (*Gap2*) corresponde ao intervalo entre a fase S e a fase M. É nesta fase que a célula se prepara para a divisão (JOHNSON et al., 1999).

Em células somáticas animais, essa seqüência de eventos do ciclo celular é repetida a cada 18-24 horas. A fase G_1 usualmente ocupa a maior parte deste período, variando de ~ 6 horas em células de crescimento acelerado e ~12 horas em células de crescimento lento. A duração da fase S é determinada pelo tempo requerido para a replicação de todo o genoma, o que normalmente ocorre em 6-8 horas. A fase G_2 é a

mais curta da interfase e compreende essencialmente a preparação para a mitose. A fase M geralmente ocorre em menos de 1 hora (LEWIN, 2004).

Eventualmente, a célula pode sair de G_1 e entrar em uma fase denominada G_0 , na qual o metabolismo celular é reduzido e não há crescimento. Se a célula em G_0 perde a capacidade de se dividir ela é denominada célula senescente, mas, se ela estiver em G_0 e puder voltar para G_1 em qualquer momento, ela é denominada célula quiescente (ISRAELS et al., 2000).

Os eventos do ciclo celular são fortemente controlados em pontos específicos denominados pontos de checagem. Existem três pontos de checagem ao longo do ciclo celular, localizados na interface entre as fases G_1/S , G_2/M e na fase M (FIG. 1). O ponto de checagem em G_1/S é altamente regulado e tem como objetivo verificar se as condições do ambiente estão favoráveis para a divisão, se há disponibilidade de nutrientes e se o tamanho da célula está adequado para a síntese de DNA, que ocorre na fase S. No ponto de checagem em G_2/M é verificado se o DNA foi replicado corretamente e se não está danificado. Caso seja necessário realizar reparos no DNA ou a replicação não tenha sido completa, a célula não poderá proceder para a fase M. No ponto de checagem em M é feita a avaliação da formação adequada do fuso mitótico e do alinhamento equatorial dos cromossomos (MOLINARI, 2000).

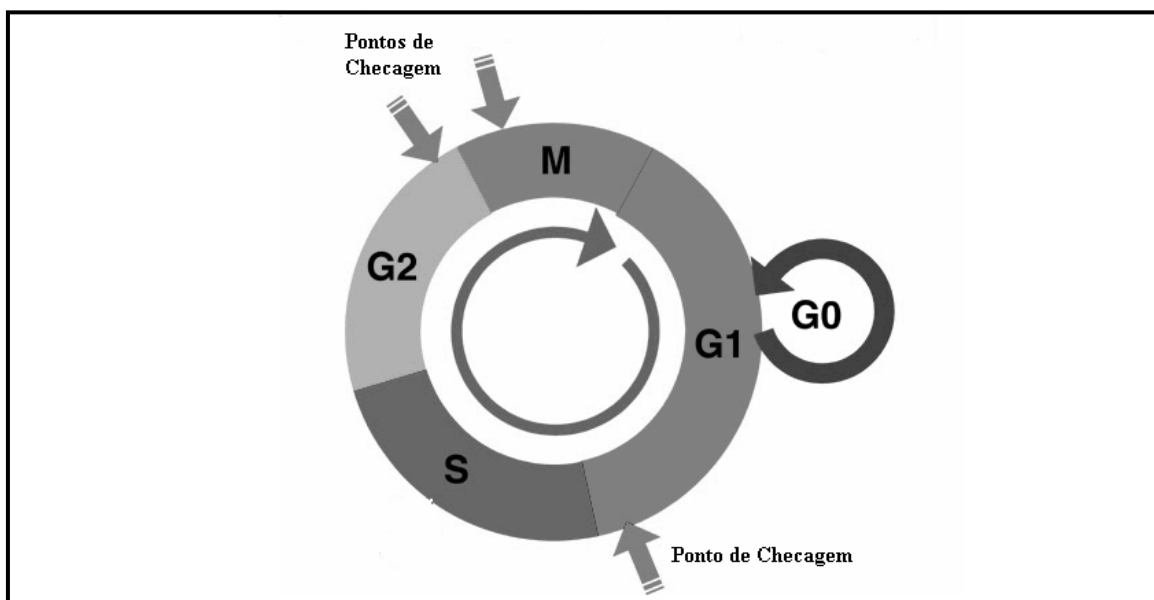


FIGURA 1: Desenho esquemático das fases do ciclo celular e seus respectivos pontos de checagem (Ilustração adaptada de CANCER LINE, 2006. Disponível em <http://www.cancerline.com>).

Nos pontos de checagem, os danos no DNA de uma célula normal são reconhecidos por proteínas sensoras, tais como: ATM/ATR, DNA-PK e RAD50/Mre11/NBS. O sinal é então transmitido pelos transdutores ATM/ATR e a resposta ao dano (parada no ciclo, reparo, manutenção do cromossomo ou indução de morte programada) é mediada por efetores tais como: Chk1, Chk2, MDM2, p53, TP53BP1 e Mre11/RAD50 (NORBURY et al., 2001).

A progressão do ciclo celular é regulada por complexos heterodiméricos de ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (cdks). Existem vários complexos ciclina/cdk e cada fase do ciclo celular é regulada por um complexo diferente (FIG. 2):

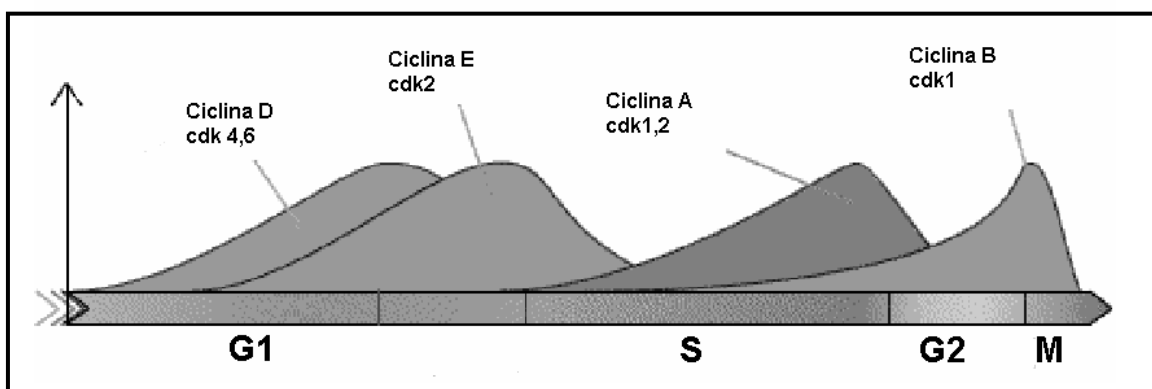


FIGURA 2: Complexos ciclina/cdk reguladores das diferentes fases do ciclo celular de mamíferos (Adaptado de COOPER, 2000).

Os níveis de cdks nas células permanecem relativamente estáveis, mas, para serem ativadas, elas devem fosforilar as ciclinas apropriadas. Ao contrário, os níveis de ciclinas aumentam e diminuem de acordo com o estágio do ciclo. As principais funções dos complexos ciclina/cdk são: ativar as atividades celulares associadas a cada fase particular do ciclo; ativar o complexo ciclina/cdk que controla o próximo estágio no ciclo; inativar o complexo ciclina/cdk do estágio anterior e em alguns casos, desencadear a própria inativação ou degradação (COOPER, 2000).

As ciclinas D são as primeiras a serem sintetizadas quando as células são estimuladas a sair de G_0 e entrar no ciclo celular. Os níveis de ciclina D, ao contrário das outras ciclinas, são controlados pela presença de fatores de crescimento. As ciclinas D associam-se com as cdks 4,6 ativando-as e o primeiro substrato para o complexo ciclinaD/cdk4,6 é a proteína do retinoblastoma (Rb). A proteína Rb exerce papel importante na regulação da fase G_1 e no ponto de checagem presente nesta fase do ciclo. Rb liga e regula um grande número de proteínas celulares incluindo os membros da

família de fatores de transcrição E2F. Os fatores E2F regulam a expressão de vários genes que expressam proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular e síntese de DNA, incluindo ciclinas E e A, cdc2 (em leveduras ou cdk1 em mamíferos) e DNA polimerase α . A ligação de Rb ao E2F inibe a capacidade transcrricional de E2F e a fosforilação de Rb pelo complexo ciclinaD/cdk4,6 resulta na dissociação de Rb-E2F e, conseqüentemente, na expressão dos genes regulados por E2F. Em resumo, Rb fosforilado deixa E2F livre que, por sua vez, permitirá a progressão do ciclo (FIG. 3) (JOHNSON et al., 1999).

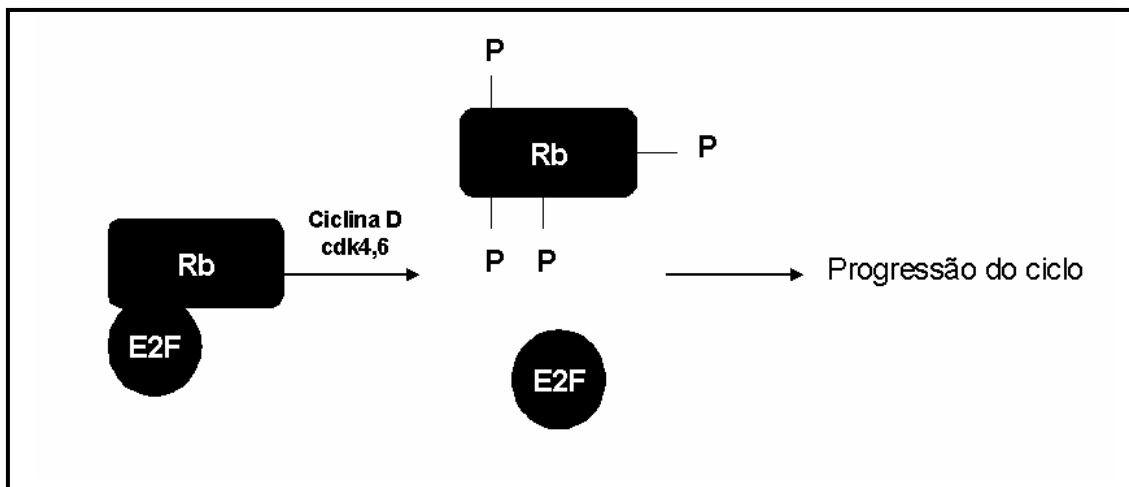


FIGURA 3: Regulação da atividade transcrricional de E2F (Adaptado de JOHNSON et al., 1999).

Os complexos ciclina/cdk podem ser inibidos pelos chamados inibidores de ciclina/cdk (CKIs). Dentre os CKIs estão os membros da família CIP/KIP (p21, p27, p57) e da família INK₄ (p15, p16, p18, p19). O controle das ciclinas no ciclo celular é feito por ubiquitinação, onde a ubiquitina, uma proteína de 76 aminoácidos, se liga à extremidade da ciclina alvo marcando-a. Após a marcação, a ciclina é, então, degradada (ALBERTS et al., 2002).

Em um organismo multicelular a proliferação deve ser controlada de modo que cada célula entre em divisão somente quando uma célula adicional é necessária ao organismo. Assim, para a proliferação de uma célula animal, além de nutrientes, a célula deve receber também um sinal estimulador de outras células. Estes sinais atuam transpondo os mecanismos intracelulares de parada, que tendem a restringir o crescimento celular e bloquear a progressão do ciclo celular (ISRAELS et al., 2000).

O crescimento descontrolado das células tumorais ocorre devido a um ciclo celular completamente desregulado. Estas células não respondem a estímulos de parada nos pontos de checagem e nem aos sinais que induzem morte celular. Alguns estudos sugerem que essa falta de controle do ciclo resulta da combinação de uma baixa expressão dos genes supressores tumorais e uma superexpressão de oncogenes (KARPINETS et al., 2005).

Os oncogenes são derivados de proto-oncogenes que fazem parte do mecanismo normal de regulação do ciclo celular. Quando mutados, os proto-oncogenes se transformam em oncogenes ficando excessiva ou inapropriadamente ativos, desregulando a proliferação celular. Dentre os oncogenes estão o HER2/neu, RAS, c-RAF, c-SRC, c-MYC e BCL-2. Os genes supressores tumorais codificam proteínas que funcionam normalmente inibindo a divisão celular, atuando principalmente nos pontos de checagem. São genes supressores tumorais: BRCA1, BRCA2, NF1, NF2, RB, P53 e PTEN (BLUME-JENSEN, 2001).

O gene supressor tumoral P53 codifica uma fosfoproteína de 53kda que, por sua vez, desempenha importante papel no controle do ciclo celular atuando nos pontos de checagem G₁/S e G₂/M. Essa fosfoproteína é capaz de limitar a proliferação celular após uma lesão do DNA por dois mecanismos: parada no ciclo celular para permitir o reparo do DNA ou ativação da morte celular programada ou apoptose. Dentre os efetores associados à parada no ciclo celular induzida por p53 está o p21, um inibidor de ciclina/cdk, também conhecido como WAF1 ou CIP1. Outros alvos de p53 no controle do ciclo celular incluem a proteína 14.3.3 e a ribonucleotídeo redutase p53R2. Dentre os reguladores chave da apoptose, p53 pode induzir a ativação de Bax e do receptor de morte Fas. A perda da função de p53 na tumorigênese pode resultar tanto na progressão inapropriada no ciclo após um dano do DNA, quanto na sobrevivência de uma célula que estava destinada à morte. Mutações no gene P53 têm sido demonstradas em cerca de 50% dos tumores humanos (STOKLOSA et al.,2005).

1.3.2 Morte celular programada (Apoptose)

Um importante mecanismo fisiológico e patológico de controle do ciclo celular é a apoptose, ou morte celular programada. A apoptose promove a eliminação seletiva de células danificadas, visando a integridade do organismo e a manutenção da vida. Ela

pode ser deflagrada por sinais de estresse tais como lesão não reparada do DNA, alterações nas vias metabólicas (aumento do cálcio intracelular, redução do pH, estresse oxidativo), quimioterapia, radioterapia, toxinas ou privação dos fatores de crescimento.

Apoptose é um processo que requer gasto de energia, caracterizado morfológicamente pela diminuição do volume citoplasmático, condensação da cromatina, degradação do DNA em porções específicas de 180 pares de bases e formação de corpos apoptóticos. Diferente da morte por necrose, que provoca uma resposta inflamatória potencialmente prejudicial, a apoptose causa alterações na superfície da célula que promovem a fagocitose por macrófagos, antes de ocorrer a liberação do seu conteúdo citoplasmático (FIG. 4) (ZIEGLER et al., 2004).

Muitos genes que controlam o ciclo celular, como P53, c-MYC e RB, estão envolvidos no processo de morte por apoptose. Proteínas da família BCL-2 (Bcl-2, Bax, Bad, Bid, dentre outros) também desempenham papel importante no processo de morte programada (RICCI et al., 2006).

Existem duas vias principais de regulação da apoptose: a via mitocondrial ou intrínseca e a via de receptores de morte ou extrínseca; ambas as vias ativam caspases iniciadoras e ambas convergem para uma via final comum de caspases efetoras. As caspases são cisteíno proteases que, em resposta a estímulos pró-apoptóticos, clivam o substrato após um resíduo de aspartato. As caspases iniciadoras (ex: caspase 8 e caspase 9) ativam caspases efetoras pela clivagem proteolítica de pró-caspase. As caspases efetoras (ex: caspase 3), após serem ativadas pelas caspases iniciadoras, agem sobre substratos específicos, como inibidores de apoptose (Bcl-2), proteínas regulatórias do citoesqueleto, moléculas que mantêm estoques de ATP (PARP – Polimerase poli ADP-ribose), fator de fragmentação de DNA (DFF) e lâminas nucleares (STRASSER et al., 2000).

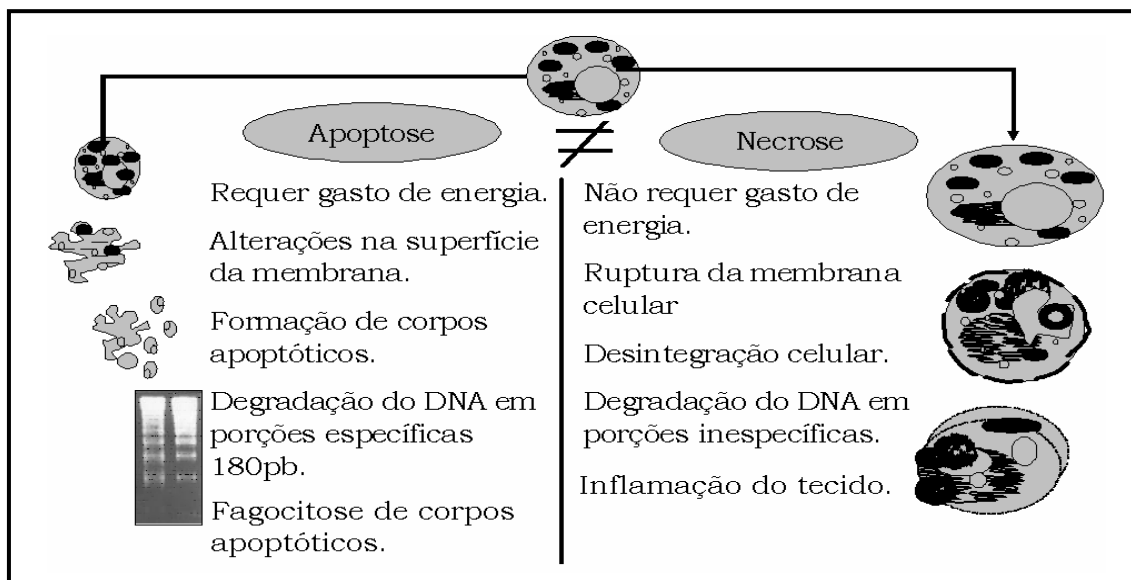


FIGURA 4: Alterações que diferenciam a morte apoptótica da morte necrótica. (Adaptado de ZIEGLER et al., 2004).

A apoptose por via mitocondrial ocorre quando proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, como Bad, Bid, Bax e Bak se ligam na superfície da mitocôndria, onde estão algumas proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-X1). Ao se ligarem à superfície da mitocôndria, as proteínas pró-apoptóticas inativam as proteínas anti-apoptóticas induzindo a formação de poros transmembranares na mitocôndria e conseqüentemente, a liberação de citocromo c. No citoplasma, o citocromo c se liga à Apaf1 (fator de ativação da apoptose) e a pró-caspase 9 formando um complexo chamado apoptossoma. O apoptossoma ativa caspase 9 que, por sua vez, ativa caspase 3. Depois de ativada, a caspase 3 atua sobre substratos específicos que levam a célula à morte apoptótica (FIG. 5) (ZIMMERMANN et al., 2001).

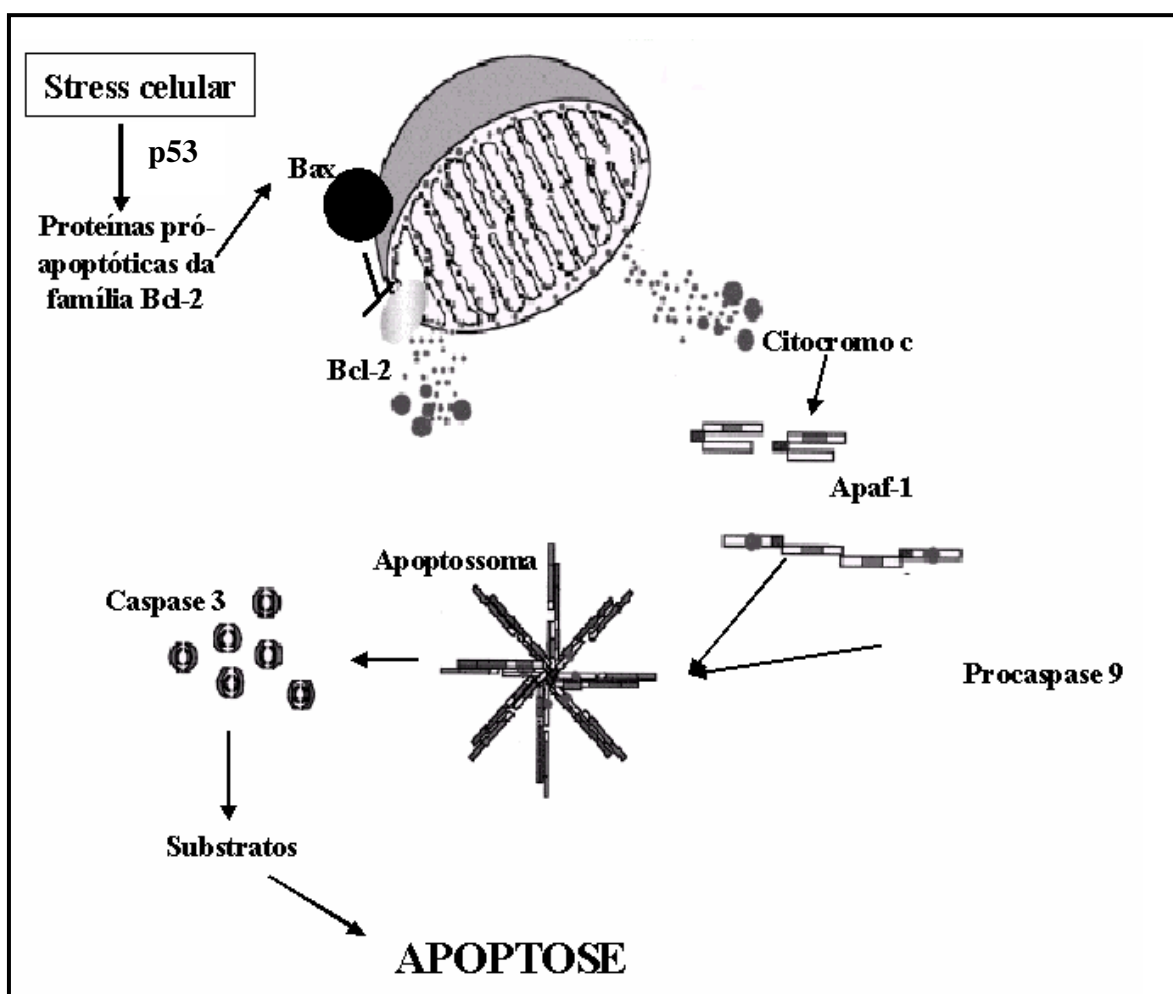


FIGURA 5: Desenho esquemático da apoptose via mitocondrial (Adaptado de ZIMMERMANN et al., 2001).

Os sinais de dano celular também podem ser recebidos por receptores especializados localizados na superfície da membrana plasmática. Neste caso, a apoptose será desencadeada via receptores de morte. Os receptores de morte da família TNFR (receptores de fator de necrose tumoral) incluem o TNFR1, Fas e receptor de TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado à TNF), que podem ser ativados por TNF- α (fator de necrose tumoral α), FasL (ligante de Fas) e TRAIL, respectivamente. Os membros desta família são caracterizados estruturalmente por 2-5 repetições extracelulares ricas em cisteína. Os receptores de morte desencadeiam a apoptose através da ativação direta das caspases: porções citoplasmáticas dos receptores podem interagir, através de várias proteínas adaptadoras (ex: FADD – Domínio de morte relacionado a Fas e TRADD - Domínio de morte relacionado a TRAIL), com pró-caspase 8 ativando-a. As proteínas adaptadoras se ligam aos receptores de morte através da interação dos domínios de morte (DD) e à pró-caspase 8 através do domínio efetor da

morte (DED). Ao se ligar ao receptor de morte, a pró-caspase 8 (também conhecida como FLICE) é clivada originando a caspase 8, que ativa as caspases efetoras (ex : caspase 3) iniciando, então, o processo de morte celular (FIG. 6) (FLEISCHER et al., 2006).

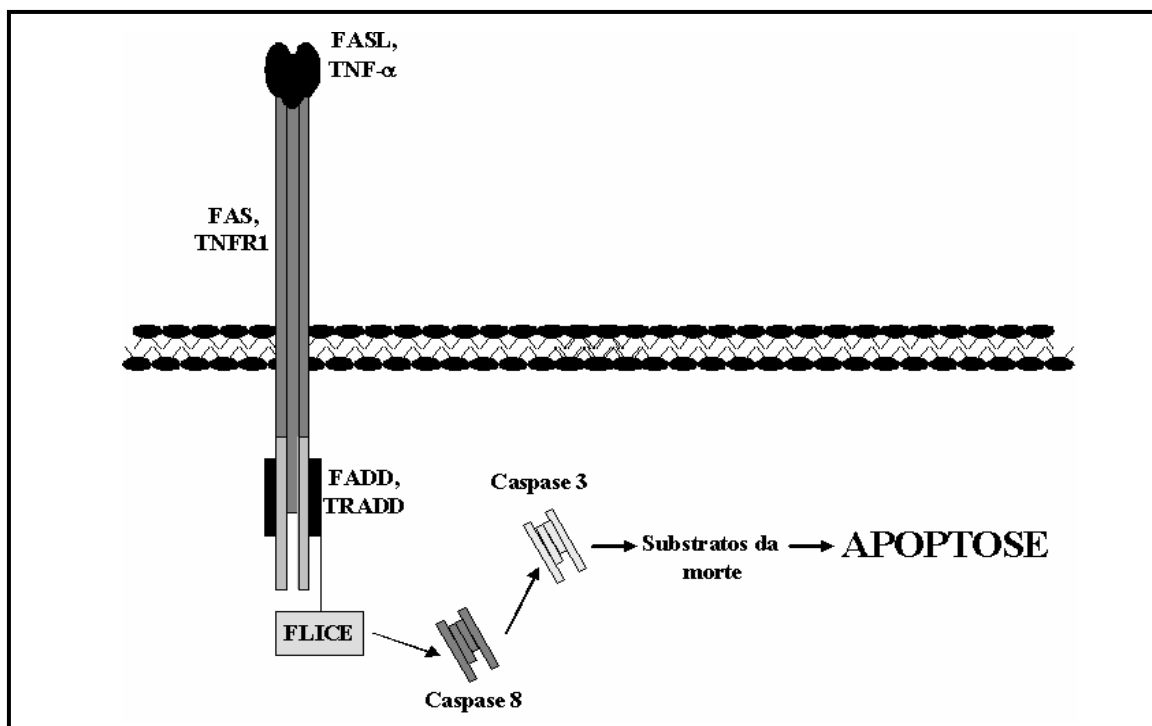


FIGURA 6: Desenho esquemático da apoptose via receptores de morte (Adaptado de FLEISCHER et al., 2006).

A ligação de TNF- α ao receptor de morte TNFR1 também pode ativar a apoptose mediada por esfingomielinases (Smases). As Smases são enzimas que degradam a esfingomielina, um esfingolípido encontrado na membrana plasmática de todas as células de mamíferos, promovendo a formação de ceramidas. As ceramidas induzem uma série de sinais pró-apoptóticos que provocam o aumento da permeabilidade mitocondrial desencadeando a apoptose. A ativação das Smases pelo receptor de morte é mediada por uma proteína denominada FAN (Fator associado à ativação de esfingomielinase neutra) (FIG. 7) (DING et al., 2004).

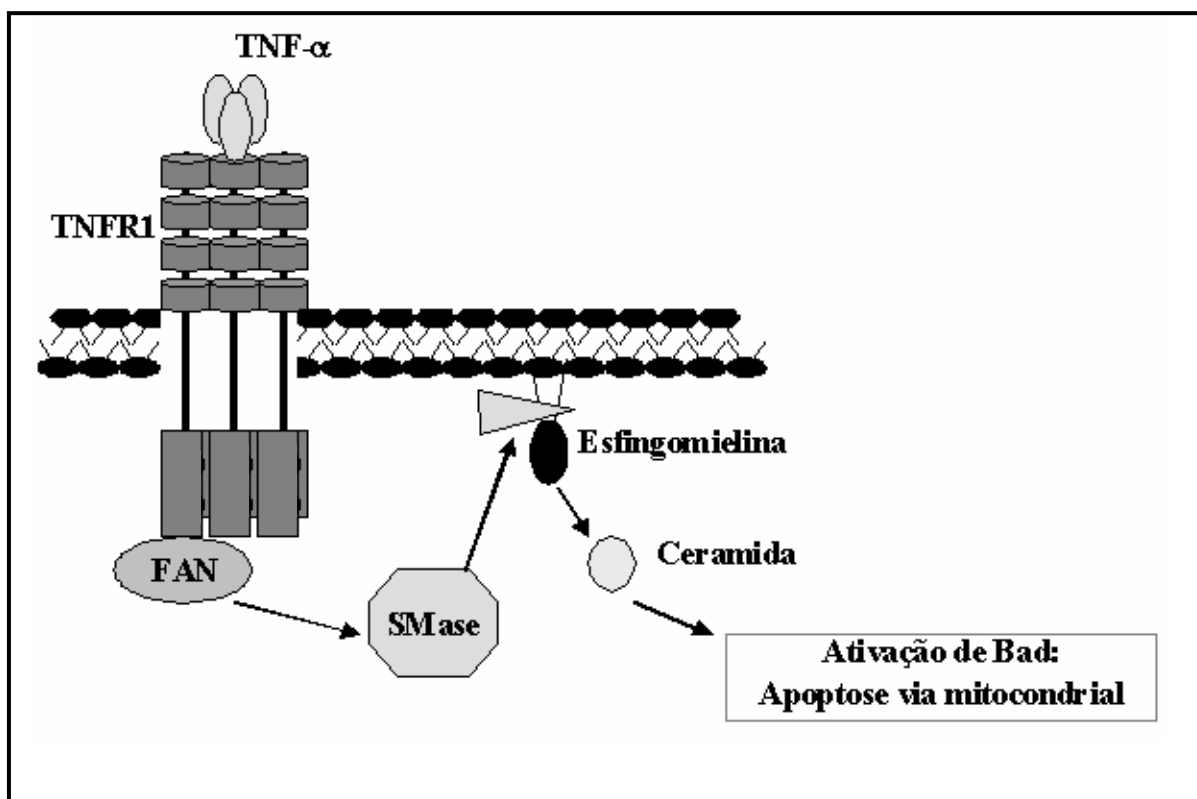


FIGURA 7: Desenho esquemático da apoptose ativada por TNF α e mediada por esfingomielinase (Adaptado de DING et al., 2004).

A apoptose também pode ser induzida por enzimas citosólicas como as fosfolipases A_2 (cFLA $_2$) (ATSUMI et al., 2000). A FLA $_2$ é uma diversa classe de enzimas que catalisam a hidrólise de fosfolipídios e ácidos graxos, desempenhando papel importante em vários eventos biológicos incluindo metabolismo de fosfolipídios e transdução de sinal (HIRABAYASHI, 2004). A hidrólise de fosfolipídios pela FLA $_2$ gera ácido araquidônico (AA) e lisofosfolipídios. São os ácidos araquidônicos que, mediados por enzimas cicloxigenases e lipoxigenases, geram as ROS (espécies reativas de oxigênio), as quais causam o rompimento da mitocôndria, permitindo a liberação de citocromo c e, conseqüentemente, induzindo a apoptose (FIG. 8). O ácido araquidônico também tem sido indicado como mediador da formação de ceramidas através da esfingomielinase (ZHAO et al., 2002).

Defeitos na via apoptótica são bastante comuns no processo de formação de tumores, pois permite que células danificadas continuem proliferando. Além disso, a apoptose desregulada afeta a quimio e radiorresistência, aumentando o limiar para a morte celular. Uma alternativa para o tratamento de tumores é utilizar substâncias que

atuem diretamente sobre moléculas chave da apoptose, ativando aquelas pró-apoptóticas e inibindo as anti-apoptóticas (FLEISCHER et al., 2006).

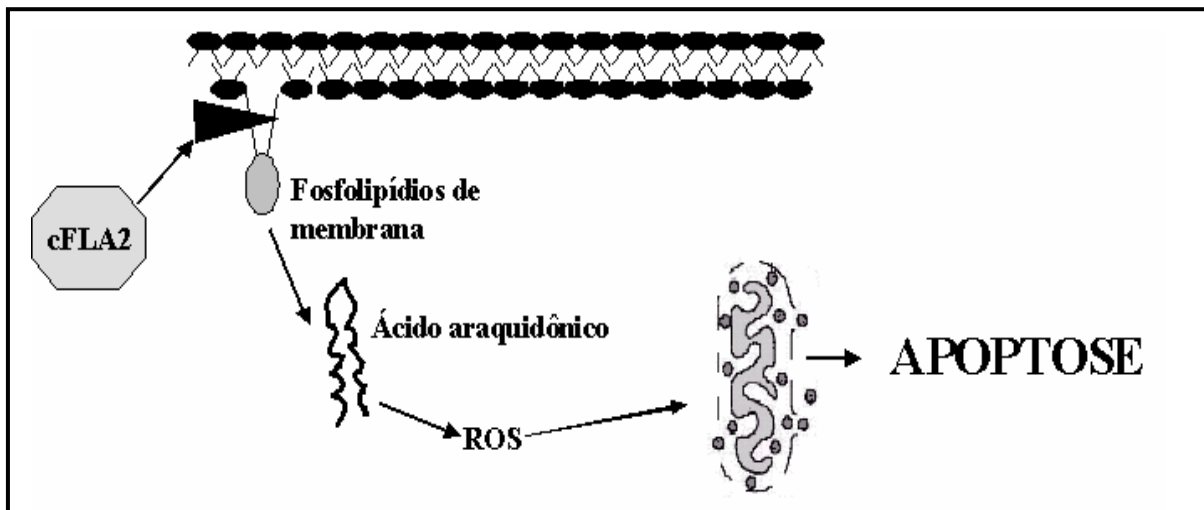


FIGURA 8: Desenho esquemático da apoptose induzida por cFLA2 (Adaptado de ZHAO et al., 2002).

1.4 Imunidade contra tumores

Células tumorais possuem diversas mutações em seu DNA que resultam na expressão de proteínas que normalmente não são expressas no organismo. Muitas dessas proteínas são reconhecidas como estranhas, desencadeando uma resposta imune específica que pode suprimir o crescimento da célula tumoral (JANEWAY et al., 2002).

Os tumores expressam peptídeos antigênicos, também conhecidos como antígenos de rejeição tumoral, que podem se tornar alvos para uma resposta de células T específica. Existem seis categorias distintas de antígenos de rejeição tumoral que podem ser reconhecidos pelo sistema imune: os antígenos derivados de oncogenes e genes supressores tumorais mutados, os antígenos de diferenciação, os antígenos de expressão gênica anormal, os antígenos que apresentam modificações pós-traducionais e os antígenos derivados de proteínas oncovirais (Id., *ibid*).

O principal mecanismo de imunidade tumoral é a destruição das células tumorais por linfócitos T citotóxicos. Estes reconhecem e destroem as células potencialmente malignas, que expressam peptídeos derivados de proteínas celulares mutantes, os quais são apresentados em associação a moléculas do MHC da classe I. A importância das células T auxiliares na imunidade tumoral é menos clara, porém, elas podem fornecer

citocinas para o desenvolvimento dos linfócitos T efetores. Além disso, células T auxiliares específicas para antígenos tumorais podem secretar citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF) e interferon- γ (INF- γ) que podem aumentar a expressão de MHC da classe I em células tumorais e a sensibilidade à lise por linfócitos T citotóxicos. Além disso, portadores de tumores podem produzir anticorpos contra diversos antígenos tumorais e estes podem destruir as células tumorais através da ativação do complemento ou citotoxicidade mediada por células, onde macrófagos e células *natural killer* (NK) participam da destruição. As células NK destroem especialmente células tumorais com baixa expressão de MHC da classe I, característica que impede o reconhecimento e destruição por linfócitos T citotóxicos. A capacidade tumoricida das células NK é aumentada pelas citocinas, incluindo interferon e interleucinas (IL-2 e IL-12) (ABBAS et al., 2005).

Os macrófagos também desempenham papel importante na imunidade antitumoral. Eles, provavelmente, são ativados através do reconhecimento direto de alguns antígenos presentes na superfície dos tumores ou ativação por IFN- γ , produzido pelas células T. Os macrófagos destroem as células por mecanismos que incluem a liberação de enzimas lisossomais, intermediários reativos de oxigênio e óxido nítrico. Macrófagos ativados também podem produzir a citocina TNF que é capaz de induzir trombose nos vasos sanguíneos tumorais destruindo o tumor (Id., *ibid.*).

Muitas das células tumorais, principalmente aquelas de tumores malignos, possuem mecanismos que permitem que elas escapem da resposta imune (FIG. 9):

- Células tumorais podem não expressar ou expressar uma quantidade reduzida de MHC da classe I, impedindo o reconhecimento por linfócitos T citotóxicos.
- Algumas células tumorais, principalmente aquelas de crescimento acelerado, perdem a expressão de antígenos tumorais (ex: antígenos gp100 em melanomas) que provocam respostas imunes.
- Células tumorais podem produzir proteínas imunossupressoras como, por exemplo, ligantes de Fas (FasL) que induzem a morte apoptótica em leucócitos.
- Os antígenos de superfície celular em tumores podem estar escondidos do sistema imune por moléculas do glicocálice, processo conhecido como mascaramento antigênico (Id., *ibid.*).

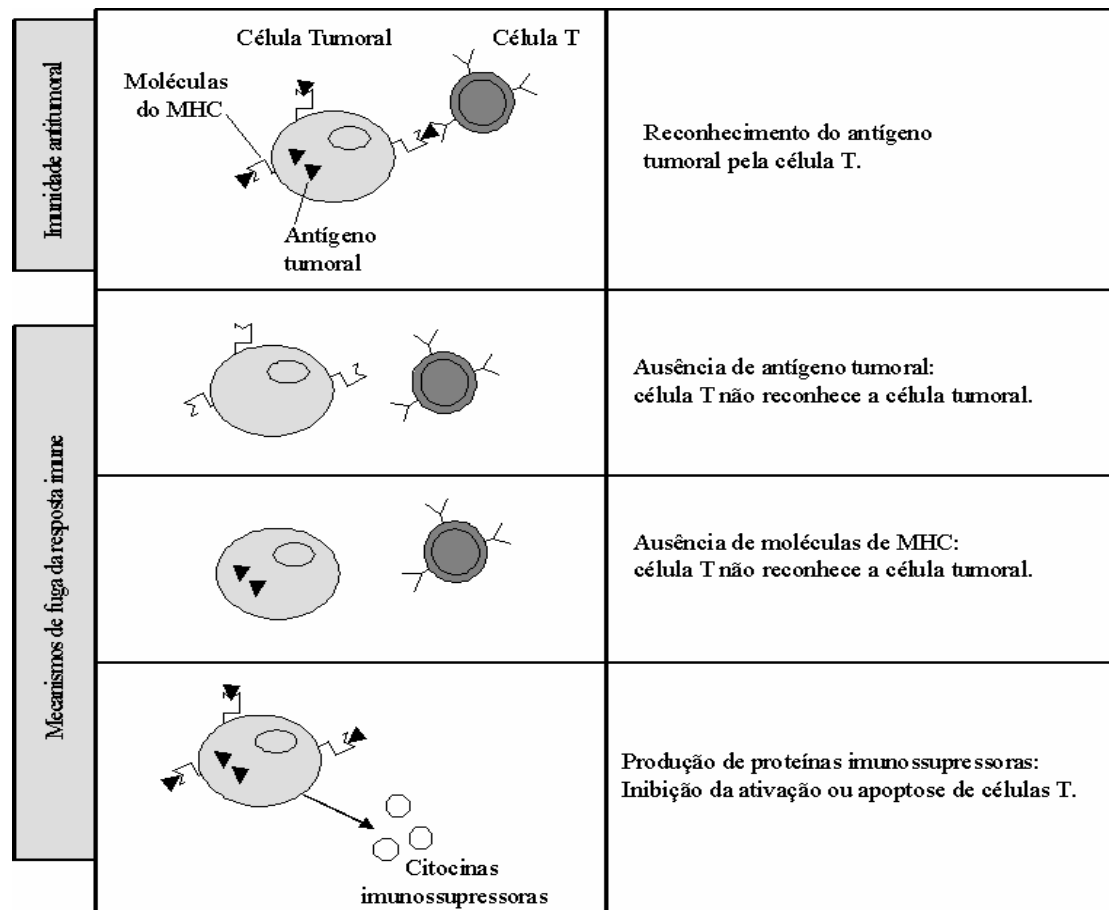


FIGURA 9: Desenho esquemático da imunidade contra tumores e os mecanismos de fuga da resposta imune presentes na maior parte das células de tumores malignos (Adaptado de ABBAS et al., 2005).

Além dos mecanismos de escape, outros dois fatores impedem que o sistema imune reconheça as células tumorais como estranhas. Primeiro, o rápido crescimento e disseminação do tumor podem superar a capacidade do sistema imune de erradicar as células tumorais e segundo, a semelhança entre células tumorais e as células normais torna as células tumorais pouco imunogênicas (JANEWAY et al., 2002).

Este segundo fator tem sido relacionado às principais falhas da terapia com anticorpos monoclonais, que visa eliminar as células tumorais com anticorpos capazes de reconhecê-las de maneira específica. A especificidade dos anticorpos para o tumor deve ser alta o suficiente para que eles não se liguem às células não tumorais, o que faz com que essa terapia seja dificilmente bem sucedida. Tal fato pode ser comprovado por um estudo recente publicado por MARSHALL (2006) na revista Science que relatou uma violenta reação causada pelo tratamento com anticorpos monoclonais em pacientes voluntários de uma pesquisa científica. O objetivo da pesquisa era tratar leucemia e

doenças auto-imunes, porém, após receber o tratamento com anticorpos monoclonais, todos os pacientes apresentaram reações graves e precisaram ser internados.

1.5 Diagnóstico de tumores: aplicações da Medicina Nuclear

O diagnóstico de tumores pode ser feito através de análises bioquímicas do sangue, estudos citopatológicos e anátomopatológicos, imuno-histoquímica e imagem.

Os métodos de imagem convencionais têm importante papel na avaliação não invasiva dos pacientes com neoplasias. A tomografia computadorizada (TC), a imagem por ressonância magnética (IRM) e o ultra-som permitem caracterizar alterações anatômicas decorrentes da doença, porém, esta avaliação nem sempre é conclusiva. A presença de massa residual em pacientes com boa resposta ao tratamento, assim como a infiltração de linfonodos de pequenas dimensões, são exemplos de situações nas quais a avaliação estrutural é insuficiente (OLIVEIRA et al., 2006).

A imagem na Medicina Nuclear permite a caracterização funcional e metabólica dos tecidos, complementando os dados anatômicos e, desta forma, auxiliando no diagnóstico e principalmente no acompanhamento e otimização do tratamento dos pacientes com tumores. As técnicas de imagem na Medicina Nuclear são a tomografia por emissão de fóton único (SPECT) e tomografia por emissão de pósitron (PET) (TINOIS, 2005).

A SPECT utiliza radiofármacos convencionais e permite a aquisição e exibição de imagem tridimensional. Os radiofármacos mais comumente usados na imagem oncológica em SPECT são aqueles marcados com os radioisótopos ^{131}I (364keV), ^{67}Ga (93keV), ^{201}Ta (135 e 167keV) e o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (140keV). O tecnécio 99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) transformou-se em um traçador muito importante para imagem tumoral, devido a sua disponibilidade, dosimetria favorável, meia vida curta ($T_{1/2} = 6$ horas) e emissão de fóton gama único de energia favorável para a imagem. Alguns dos radiofármacos que utilizam o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ como traçador para detectar tumores primários ou metastáticos são: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -medronato ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP) para cintilografia óssea, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -enxofre coloidal para fígado e baço, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -gluco-heptonato e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ácido-dietilenotriaminopentacético ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA) para cintilografia cerebral, e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ácido dimercaptossuccínico ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA) para cintilografia do córtex renal. Estes radiofármacos não são específicos para tumores, e sim para órgãos, o que permite detectar “áreas quentes” (hipercaptantes) e “áreas frias”

(hipocaptantes ou não-captantes). O ^{99m}Tc -ácido-hepatoiminodiacético (^{99m}Tc -HIDA) é específico para tumores benignos ou malignos de hepatócito (THRALL et al., 2003).

O PET é um tipo de tomografia que detecta radiação gama proveniente da aniquilação de pósitrons. Quando os pósitrons adquirem energia térmica, eles se combinam com elétrons negativos e se aniquilam dando origem a dois fótons de 511keV na mesma direção, porém, em sentidos opostos. Os agentes tumorais mais comumente usados em PET são o ^{18}F -Fluordesoxiglicose (^{18}F -FDG) e ^{11}C -Metionina, porém estes não são específicos para tumores, podendo se ligar inespecificamente em órgãos com alta taxa metabólica e fluxo sanguíneo (Id., *ibid.*).

1.6 Os Tumores cerebrais

Os tumores cerebrais são todos aqueles que possuem sua origem no cérebro, nervos craniais, meninges e glândula pituitária (tumores cerebrais primários) e também aqueles que se iniciam em alguma parte do corpo e metastatizam para o cérebro (tumores cerebrais metastáticos). Os tumores cerebrais constituem apenas 1-2% dos tumores em adultos, no entanto, são de difícil prognóstico e a sobrevida dos pacientes geralmente é muito baixa. Além disso, esses tumores representam os tumores sólidos mais comuns em crianças, sendo responsáveis por 25% das mortes relacionadas ao câncer em menores de 20 anos (PEREZ et al., 1997).

Os tumores cerebrais são classificados como benignos ou malignos dependendo do grau de malignidade e, para facilitar a comunicação e o plano de tratamento, a OMS classifica os tumores cerebrais malignos por categorias. Os tumores classificados biologicamente como grau I são aqueles menos agressivos e aqueles classificados como grau IV são os mais agressivos. Geralmente, os tumores cerebrais possuem células de diferentes graus de diferenciação e aquelas pertencentes ao grau mais anaplásico determinarão o grau do tumor, mesmo se a maioria das células for de um grau mais baixo (AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION, 2006).

Dentre os tumores cerebrais primários, os meningiomas são os mais frequentes representando cerca de 30%. Os astrocitomas de grau II representam 12%, os glioblastomas 23%, os tumores neuronais 8%, os adenomas de pituitária 7%, os linfomas 3%, os oligodendrogliomas 3% e os meduloblastomas 2% (FIG. 10). Os tumores metastáticos são os tumores cerebrais mais comuns, com uma incidência anual

cinco vezes maior do que os tumores primários. Os principais tumores que metastatizam para o cérebro são os de mama e de pulmão (Id., *ibid.*).

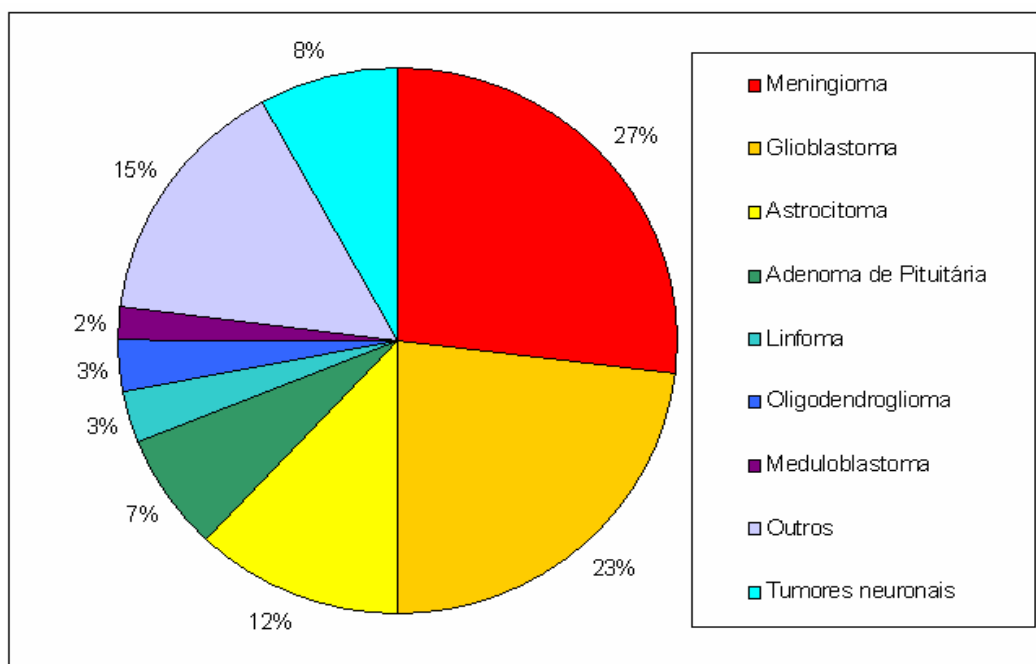


FIGURA 10: Frequência dos diferentes tipos de tumores cerebrais primários (Adaptado de AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION, 2006).

1.6.1 Glioblastoma Multiforme

O glioblastoma multiforme (GBM) ou astrocitoma de grau IV tem sua origem nos astrócitos e representa o astrocitoma de maior incidência. Ele é mais comum em adultos, sendo mais freqüente em homens. Os sintomas mais comuns são: dores de cabeça, náuseas, vômito, perda de memória ou fala, alterações visuais e fraqueza. O glioblastoma possui capacidade de criar novos vasos sanguíneos (angiogênese) e invadir os tecidos adjacentes de maneira difusa, o que torna sua completa remoção uma tarefa praticamente impossível (BERNSTEIN et al., 2000). Por esse motivo, a sobrevida média dos pacientes com glioblastoma multiforme é de 50 semanas (BRAT et al., 2003).

A *performance* dos pacientes com glioblastoma é avaliada, geralmente, pelo índice de Karnofsky e depende da combinação de sinais e sintomas neurológicos, independência nas atividades da vida diária e grau de cuidados médicos que o paciente necessita (TAB. 2). A sobrevida dos pacientes com GBM reduz com a regressão do

índice de Karnofsky, independente de outras variáveis prognósticas. O tratamento do GBM é efetuado rotineiramente com cirurgia, radioterapia e quimioterapia, dependendo do tamanho e localização do tumor, do estágio da doença e da idade e condição neurológica do paciente (COLLI et al., 2001).

TABELA 2: Graduação da *performance* dos pacientes pelo índice de Karnofsky

Habilidade do paciente	Percentual do índice de Karnofsky	Estado do paciente
Atividade normal; não necessita cuidados especiais.	100	Normal; sem queixas, sem evidência da doença
	90	Atividade normal; sinais menores da doença.
	80	Atividade normal c/ esforço; alguns sinais da doença.
Incapaz de trabalhar; capaz de viver em casa; capaz de realizar a maioria das necessidades pessoais; necessita de uma quantidade variável de cuidados.	70	Cuida de si; incapaz de efetuar atividades de trabalho.
	60	Requer assistência ocasional, supre a maioria das suas necessidades.
	50	Requer considerável assistência e cuidados médicos freqüentes.
Incapaz de cuidar-se; requer cuidado hospitalar; a doença está progredindo rapidamente.	40	Incapacitado; requer cuidados e assistências especiais.
	30	Muito incapacitado; hospitalização indicada sem risco de morte iminente.
	20	Muito doente, hospitalização necessária.
	10	Moribundo; progressão fatal rápida.
	0	Óbito.

Fonte: COLLI et al., 2001.

A patogênese do GBM é um processo que parece envolver uma série de alterações genéticas. Cerca de 40% dos GBM apresentam superexpressão de receptores de crescimento epidermal (EGFR) (SMITH et al., 2001). Além disso, outras alterações genéticas presentes nesses tumores incluem: a perda ou mutação do cromossomo 10 (PTEN), inativação ou perda do gene p53, superexpressão de receptores de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e superexpressão de MDM2, que marca p53 para que ela seja inativada (BENJAMIN et al., 2003; BRAT et al., 2003) (FIG. 11).

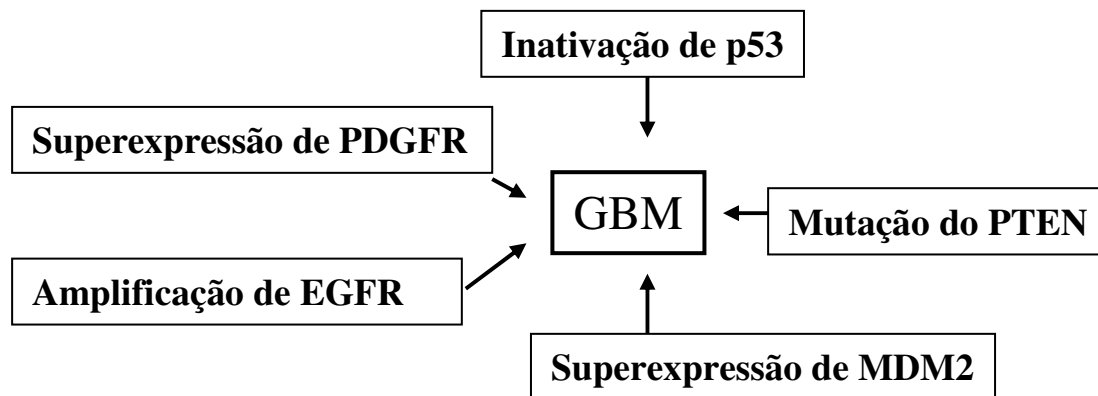


FIGURA 11: Altera es genéticas em glioblastoma multiforme (Adaptado de BRAT et al., 2003).

1.6.2 Adenoma de Pituitária

A glândula pituitária, ou hipófise, está localizada na porão mediana do cérebro e têm como fun o a síntese e secre o de alguns hormônios essenciais tais como a prolactina (PRL) e hormônio de crescimento (GH). Além destes, a pituitária também secreta hormônios responsáveis por regular a secre o de outros hormônios de várias outras glândulas e  rgoos do corpo humano, incluindo a tireóide (hormônio TSH), adrenais (hormônio ACTH), testículos e ovários (hormônios FSH e LH). A glândula pituitária libera os hormônios na corrente sanguínea, onde eles sero carreados aos seus respectivos  rgoos ou glândulas. Estes, por sua vez, liberaro outros hormônios que faro o *feed back* para o hipotálamo, que daro o sinal para que a pituitária interrompa a síntese dos hormônios ou para que produza uma quantidade ainda maior, dependendo das necessidades do organismo (AYUK et al., 2006).

Os adenomas de pituitária são neoplasmas relativamente comuns na população, no entanto, apenas uma pequena fração destes tumores leva a manifestações clínicas, que podem ocorrer pela compressão de estruturas vizinhas ou devido a síndromes endócrinas causadas por hipersecreção hormonal (DONANGELO, et al., 2004).

Os adenomas de pituitária podem ser classificados pelo tamanho, tipo de hormônio que secretam e pela análise microscópica das células tumorais. Aqueles menores que 1cm são classificados como microadenomas e aqueles maiores que 1cm são classificados como macroadenomas. Adenomas secretores de prolactina (PRL), adrenocorticotrofina (ACTH), hormônio do crescimento (GH) e tireotrofinas (TSH) normalmente secretam altas quantidades desses hormônios na corrente sanguínea; já os adenomas de gonadotrofinas raramente secretam altas quantidades de FSH e LH e, por esta razão, são referidos como adenomas de pituitária não secretores. Cerca de 70% dos tumores de pituitária são funcionais ou secretores e os sintomas mais comuns causados por esse tipo de tumor estão relacionados ao excesso de produção hormonal. Os somatotropinomas, adenomas de hipófise secretores de GH, representam cerca de 30% dos adenomas hipofisários com manifestações clínicas e podem causar acromegalia e gigantismo. Hiperatividade da tireóide, dores de cabeça, sono, desbalanço hídrico e alterações visuais também estão presentes em pacientes com adenoma de hipófise (PICKETT, 2003).

A maior parte dos adenomas de pituitária desenvolve na porção frontal da glândula, região denominada adenohipófise ou pituitária anterior, sendo raramente encontrados na neurohipófise ou pituitária posterior. Geralmente, os adenomas de pituitária são benignos e de crescimento lento, porém, em cerca de um terço dos casos, ele se transforma em carcinoma hipofisário, adquirindo comportamento invasivo e dando origem às metástases (MELMED et al., 2003).

A teoria monoclonal é a mais aceita para a iniciação da tumorigênese na pituitária, ou seja, acredita-se que uma única célula sofre alguma(s) mutação (ões) que lhe confere capacidade proliferativa (CLAYTON et al., 2001). Além disso, estímulos provenientes do hipotálamo também podem contribuir para o crescimento do tumor (DONANGELO et al., 2004).

Algumas das alterações genéticas frequentemente encontradas em adenomas de hipófise são: perda alélica das regiões cromossômicas 11q13 e 13q14 – RB1 e baixa expressão de pRb (HONDA et al., 2003); baixa expressão de p27 (CKI) (TEIXEIRA et al., 2000); baixa expressão do gene supressor tumoral Nm23 e superexpressão do proto-

oncogene PTTG (ZHANG et al., 1999) (FIG. 12). Raramente são encontradas anomalias na expressão de p53 (OLIVEIRA et al., 2002).

O tratamento do adenoma de pituitária depende do tamanho e da atividade hormonal do tumor, bem como da idade e do estado de saúde do paciente. O principal objetivo do tratamento é remover ou reduzir a massa tumoral e/ou regular os níveis hormonais. A cirurgia, radioterapia e quimioterapia são os tratamentos mais comumente utilizados (AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION, 2006).

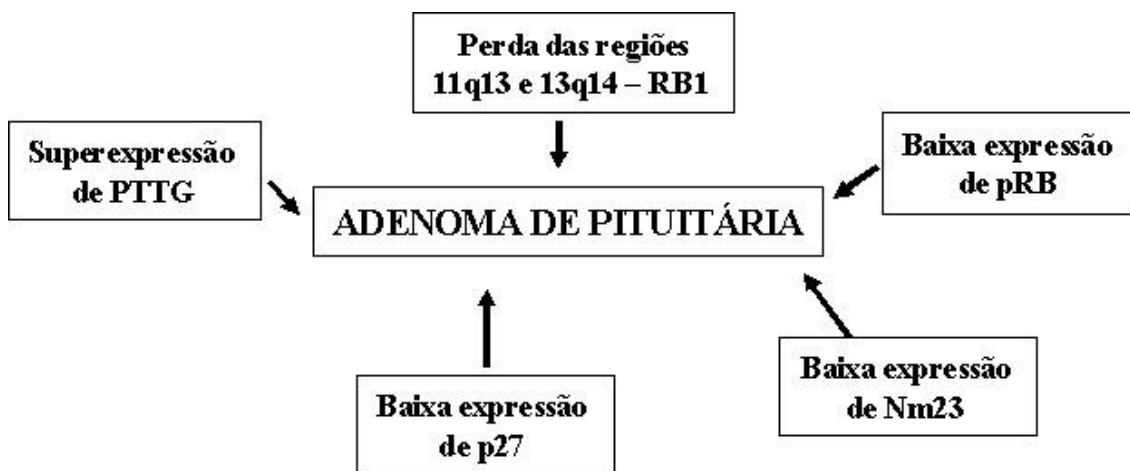


FIGURA 12: Alterações genéticas em adenoma de pituitária.

1.7 Principais formas de tratamento de tumores

1.7.1 Tratamento cirúrgico

O tratamento cirúrgico é uma boa opção para o controle e cura do câncer quando este se encontra na fase inicial, podendo ter caráter curativo ou paliativo. O tratamento curativo é indicado nos casos iniciais da maioria dos tumores sólidos e promove a remoção do tumor primário com margem de segurança. A margem de segurança na cirurgia oncológica varia de acordo com a localização e tipo do tumor: o tumor benigno possui margem de segurança equivalente ao seu limite macroscópico; o câncer exige ressecção mais ampla, devido ao seu caráter de invasão microscópico. O tratamento cirúrgico paliativo tem como objetivo reduzir o número de células tumorais ou controlar

sintomas que põem em risco a vida do paciente ou comprometem a sua qualidade de vida (INCA, 2007).

A cirurgia também permite o diagnóstico histológico da lesão, que é a base para todos os outros processos terapêuticos. O tamanho e a localização dos tumores e o estado clínico e neurológico do paciente são variáveis importantes no planejamento de um procedimento cirúrgico. A extensão de uma ressecção é limitada pelos riscos de morbidade e mortalidade que devem ser estabelecidos e aceitos em comum acordo entre o médico e o paciente (COLLI et al., 2001).

Em pacientes com GBM, raramente a cirurgia por si só é um procedimento curativo, apesar de existirem vários trabalhos indicando que as ressecções mais extensas propiciam um prognóstico melhor. Geralmente, a curva de sobrevida de um paciente após o tratamento cirúrgico não excede 4 meses (MOOTS et al., 1998).

Para pacientes com adenoma de pituitária, a excisão cirúrgica é o tratamento mais indicado. Cerca de 90% dos pacientes com microadenomas têm sua taxa hormonal regulada após a cirurgia, no entanto, o mesmo só ocorre em 50% dos pacientes com macroadenomas. Pacientes com adenomas muito grandes necessitam de outras formas de terapia após a cirurgia (ABOSH, et al., 1998).

1.7.2 Quimioterapia

A quimioterapia antineoplásica consiste no uso de substâncias químicas para o tratamento de neoplasias malignas. É geralmente escolhida para tratamento de tumores malignos do sistema hematopoético e para tumores sólidos que apresentam metástases.

O tumor maligno é constituído por três grupos de células: as que se dividem ativamente, as paradas na fase Go do ciclo celular e as que perdem a capacidade reprodutiva. Quanto menor a massa tumoral, maior o número de células em reprodução. À medida que o tumor cresce, as células iniciam uma competição por nutrientes, oxigênio e espaço, fazendo com que o número de células em reprodução diminua. Células que se reproduzem ativamente são as mais sensíveis à quimioterapia (INCA, 2007).

Os quimioterápicos antineoplásicos podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química e função celular ou de acordo com a sua atuação no ciclo celular. Em relação à sua estrutura química e função celular os agentes antineoplásicos podem ser:

alquilantes, que possuem grupos alquil capazes de formar ligações covalentes com componentes celulares (ex: Nitrosouréias como a Carmustatina - BCNU); antimetabólitos, que bloqueiam as vias de síntese do DNA (ex: Antagonistas do folato como o Metotrexano – MXT); antibióticos citotóxicos, que fragmentam ou inibem a síntese do DNA e RNA (ex: Antraciclinas como a Doxorrubicina); derivados vegetais que, em geral, inibem a mitose e a síntese de DNA (ex: Alcalóides da vinca como a vincristina) e hormônios, usados em tumores derivados de tecidos hormônio-dependentes (ex: Estrógenos como o fosfestrol). Quanto à relação com o ciclo celular, eles podem ser: ciclo-específicos, mais eficazes em tumores de crescimento rápido já que atuam em células que estão no ciclo de divisão celular (neste caso podem ser também fase específicos e fase inespecíficos); ou ciclo inespecíficos, que possuem eficácia independente da célula estar se dividindo ou em repouso (Ex: Alquilantes- ciclo inespecíficos; Antimetabólitos- ciclo específicos e fase específicos, atuando na fase de síntese; Antibióticos citotóxicos- ciclo específicos e fase inespecíficos) (SIKIC, 1999).

A quimioterapia pode ser:

- Curativa: visa acabar com a doença.
- Paliativa: visa minimizar os sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente.
- Potencializadora: utilizada simultaneamente à radioterapia, com o objetivo de melhorar a relação dose terapêutica/ dose tóxica do tratamento com radiação.
- Adjuvante: administrada posteriormente ao tratamento principal, cirúrgico ou radioterápico, com o objetivo de eliminar células residuais metastáticas.
- Neo-adjuvante, administrada previamente ao tratamento principal, cirúrgico ou radioterápico, com o objetivo de diminuir o volume tumoral e eliminar metástases (MCKNIGHT, 2003).

Os determinantes básicos na escolha do tratamento quimioterápico são: diagnóstico histológico e localização do tumor, estágio da doença, toxicidade potencial, duração da toxicidade presumida e condições clínicas do paciente, que podem ser quantificadas pelo índice de Karnofsky. Alguns dos requisitos para a aplicação da quimioterapia são: perda de peso inferior a 10%; ausência de contra-indicação para as drogas selecionadas; ausência de infecção ou infecção sob controle; contagem das células do sangue e dosagens séricas dentro dos limites. A quimioterapia é totalmente contra-indicada para portadores de doença maligna em fase terminal, grávidas no primeiro trimestre, portadores de infecções graves e pacientes comatosos (KUFÉ et al., 2003).

A aplicação dos agentes quimioterápicos pode ser: regional, onde o agente é aplicado diretamente em uma artéria ou cavidade, atingindo altas concentrações regionais (ex: intravesical, intrapleural, intra-tecal, intrapericárdio, intraperitoneal); local, onde a droga é injetada diretamente no local do tumor; sistêmica, método mais utilizado, têm como objetivo tratar o organismo como um todo (ex: oral, intravenosa, intra-arterial, subcutânea e intramuscular) (MCKNIGHT, 2003).

A dose do agente quimioterápico administrada é determinada a partir do cálculo da superfície corporal do paciente expressa em m^2 , que é feito de acordo com a seguinte equação (DUBOIS et al., 1916):

$$\text{Superfície Corporal (m}^2\text{)} = 0,007184 \times (\text{Altura em cm})^{0,725} \times (\text{Peso em kg})^{0,425}$$

A resposta do paciente à quimioterapia pode ser completa, quando a doença desaparece completamente; parcial, quando há a redução de 50% ou mais das lesões mensuráveis por exame físico ou técnicas radiológicas; a doença pode se tornar estável, quando ocorre uma redução menor que 50% ou até um aumento de 25% das lesões mensuráveis; ou a doença pode continuar progredindo, quando ocorre um aumento maior que 25% das lesões mensuráveis (MILOSAVLJEVIC et al., 1997).

Os agentes quimioterápicos agem de forma não específica, atuando indistintamente no tumor e em células de proliferação rápida, como as do sistema hematopoético e das mucosas, o que obriga uma interrupção periódica do tratamento para a recuperação do paciente. A quimioterapia tende a produzir, em maior ou menor grau, os seguintes efeitos tóxicos gerais: mielossupressão, cicatrização deficiente, alopecia, lesão do epitélio gastrointestinal, depressão do crescimento em crianças, esterilidade e teratogenicidade (WORKMAN et al., 2002).

Alguns dos fatores que dificultam o tratamento quimioterápico de pacientes com tumores cerebrais são a limitação da concentração da droga no cérebro e no tumor pela barreira hematoencefálica e a pouca tolerância do SNC aos agentes quimioterápicos convencionais. São várias as tentativas efetuadas para aumentar a liberação dos agentes quimioterápicos dentro dos tumores do SNC, tais como a administração intra-arterial, a quebra da barreira hematoencefálica através da administração de solução saturada de manitol, quimioterapia intratumoral e administração de quimioterápicos associados a polímeros biodegradáveis. No entanto, as técnicas desenvolvidas para aumentar as

concentrações dos agentes quimioterápicos nos tumores do SNC com reduzida toxicidade sistêmica detêm-se nos efeitos tóxicos sobre o SNC (COLLI et al., 2001).

Os agentes quimioterápicos mais usados no tratamento de gliomas de alto grau são os alquilantes, porém, alcalóides naturais, antimetabólitos e antagonistas de hormônios também têm sido empregados. O agente alquilante mais utilizado no tratamento do GBM é a 1,3-bis (2-cloroetil)-nitrosouréia (BCNU), uma nitrosouréia lipossolúvel, de baixo peso molecular e baixa ionização em pH fisiológico, o que possibilita atravessar a barreira hematoencefálica e atingir altas concentrações intratumorais. Estudos comprovam que o uso de BCNU como adjuvante no tratamento radioterápico aumentou em 15% a sobrevida dos pacientes com GBM (FINE et al., 1993).

Outros agentes alquilantes como temozolomida (TMZ), procarbazina, diaziquona, dacarbazina, carboplatina, cisplatina e dibromodulcitol também têm sido testados no tratamento de astrocitomas de alto grau (MOOTS et al., 1998). Dentre os derivados vegetais, os taxanos e os alcalóides da vinca também estão sendo testados em pacientes com GBM (NICHOLAS et al., 1997).

Em pacientes com adenoma de pituitária, os análogos de somatostatina são os agentes quimioterápicos mais utilizados desde a década de 80, no entanto, sua baixa meia-vida requer várias injeções durante o dia. Doses efetivas variam de 100-1500µg/dia, administradas subcutaneamente em 3-4 doses, fazendo com que os gastos com esse tratamento atinjam cerca de \$8000 por ano (MELMED, 1990). Agonistas de dopamina, como a bromocriptina, também têm sido utilizados, entretanto, apenas 15% da massa tumoral é reduzida (ABS et al., 1998).

1.7.3 Radioterapia

A radioterapia é uma modalidade terapêutica que utiliza as radiações ionizantes no combate às neoplasias, com o objetivo de cura ou melhora da qualidade de vida do paciente.

As técnicas de radioterapia mais comumente usadas atualmente são:

- Teleterapia: terapia à distância; a fonte de radiação fica a 1 metro de distância do paciente. Nesta categoria são utilizados os emissores de raios gama (Cobalto-60 e Césio-137) e os raios X. Os aceleradores lineares podem ser utilizados para a produção

de raios X: eles aceleram elétrons que, ao se chocarem com um alvo metálico de alto número atômico, são subitamente desacelerados, liberando raios X de frenagem, que podem ser utilizados na terapia. Outra forma de utilizar essa técnica é permitir que os próprios elétrons acelerados atinjam diretamente o paciente, neste caso, os elétrons não penetram profundamente nos tecidos, permitindo apenas o tratamento de lesões superficiais.

- Braquiterapia: terapia de curta distância, utiliza fontes de emissores β ou γ encapsuladas. A fonte é colocada a poucos centímetros da massa tumoral (SBRT, 2006).

São vários os efeitos tóxicos causados pelo tratamento radioterápico e estes variam principalmente de acordo com a localização do tumor, a energia utilizada, o volume do tecido irradiado, a dose total de irradiação e o estado geral de saúde do paciente. As reações comuns e que independem do local de aplicação são a fadiga, reações de pele e a inapetência, que costumam aparecer após a segunda semana de tratamento. O tratamento radioterápico não é indicado para crianças menores que 36 meses e adultos com mau estado de saúde (HENDRY et al., 2006).

A grande maioria dos pacientes com glioblastoma são candidatos à radioterapia. Estudos prévios demonstraram que doses inferiores à 45Gy estavam associadas a recorrências precoces destes tumores e doses acima de 60Gy aumentavam os riscos de toxicidade (CHANG et al., 1983). A radioterapia convencional de GBM utiliza doses totais de 60Gy, administradas em aproximadamente 30 sessões de 1,8-2Gy cada, em um período de 6 a 6,5 semanas, 5 dias por semana (NICHOLAS et al., 1997).

No período anterior à década de 70, pacientes com GBM recebiam irradiação de todo o cérebro. Após a implantação da tomografia computadorizada (TC), que permitiu a melhor localização do tumor, as doses de radioterapia passaram a ser mais localizadas, atingindo apenas um campo que envolve o tumor e uma margem circundante de alguns centímetros. Isso possibilitou a diminuição dos riscos de toxicidade e o aumento da sobrevida dos pacientes (FORSYTH et al., 1995).

Sensibilizadores como pirimidinas halogenadas e alguns agentes quimioterápicos, têm sido utilizados, com sucesso, para aumentar o efeito antitumoral da radiação sem aumentar os efeitos tóxicos para os tecidos normais. Dentre os agentes quimioterápicos, a cisplatina, a hidroxiuréia, o taxol e a suramina são os mais utilizados, no entanto, apenas a hidroxiuréia têm apresentado efeitos promissores (COLLI et al., 2001).

A braquiterapia também é utilizada para tratamento de pacientes com GBM, porém, ela é indicada apenas para pacientes com boas condições neurológicas e com tumores de tamanho limitado. A braquiterapia pode aumentar em cerca de 40% a sobrevida dos pacientes (NICHOLAS et al., 1997).

A radioterapia consegue regular a secreção de hormônios em 70-80% dos pacientes com adenoma de pituitária. São utilizadas no tratamento doses diárias de 1,6-1,8Gy, durante 4-6 semanas, totalizando uma dose de 40-50Gy. A radioterapia não é indicada para pacientes com adenomas muito pequenos, ou que estejam a uma distância menor do que 3mm do quiasma óptico e dos nervos craniais (PICKETT, 2003).

1.7.3.1 As Radiações Ionizantes

As radiações ionizantes são aquelas que possuem energia suficiente para atravessar a matéria e remover elétrons, ionizando os átomos e moléculas. Elas podem ser particuladas (partículas alfa, beta e neutrôns) ou eletromagnéticas (raios gama e raios X). As partículas *alfa* são constituídas de dois nêutrons e dois prótons, caracterizando um núcleo atômico de Hélio (${}^4_2\text{He}$). Devido ao alto peso e tamanho, elas possuem pouca penetração e são facilmente absorvidas por poucos centímetros de ar. As partículas *beta* são constituídas por elétrons com carga elétrica negativa (β^- - negatron) ou positiva (β^+ - pósitron); elas possuem um poder de penetração superior às radiações *alfa*, porém, podem ser absorvidas por alguns centímetros de acrílico ou plástico (FIG. 13). As radiações X e *gama* são eletromagnéticas e possuem alto poder de penetração nos materiais (THRALL, 2003; ANDREUCCI, 2005).

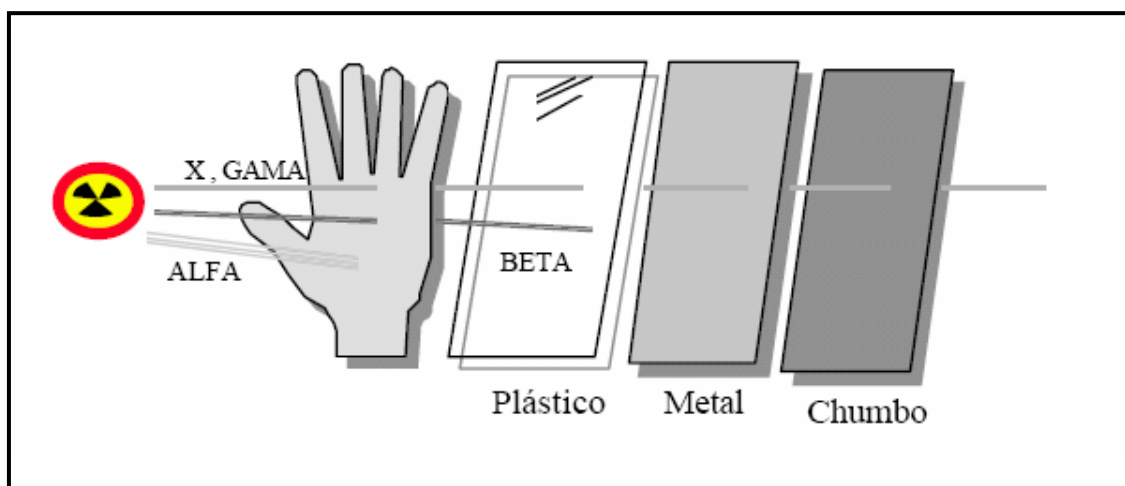


FIGURA 13: Desenho esquemático das características de penetração das radiações ionizantes (ANDREUCCI, 2005).

A interação das radiações ionizantes com a matéria consiste na transferência linear da sua energia (LET) para o meio irradiado. Essa transferência de energia pode promover a excitação ou a ionização do meio, a qual é a principal promotora dos danos biológicos. As radiações que transferem alta quantidade de energia durante uma trajetória linear, partículas alfa e os nêutrons, são classificadas como radiações de alto LET. As radiações que transferem baixa quantidade de energia durante uma trajetória linear, partículas beta e as radiações eletromagnéticas, são classificadas como radiações de baixo LET. Um raio γ percorrendo uma distância de $8\mu\text{m}$ promove 70 ionizações no meio; uma partícula α percorrendo essa mesma distância promove cerca de 23.000 ionizações (GOODHEAD, 1999). As moléculas ionizadas têm a estrutura comprometida podendo ficar inativadas, já que a remoção dos elétrons leva ao rompimento de ligações químicas (energia liberada por ionização: 33eV ; energia associada à ligação $\text{C}=\text{C}$: $4,9\text{ eV}$). Apesar da grande quantidade de ionizações promovidas pelas partículas α durante um determinado percurso, esse tipo de radiação só causa danos biológicos se inalados ou ingeridos, uma vez que possuem baixíssimo poder de penetração (PRASAD, 1995).

A produção artificial de isótopos radioativos para as fontes de radioterapia é feita em reatores nucleares, através de reações de ativação neutrônica. O fenômeno de ativação ocorre quando elementos naturais são colocados junto ao núcleo de um reator nuclear e são irradiados por nêutrons térmicos, fazendo com que o equilíbrio energético no núcleo seja quebrado. O restabelecimento do equilíbrio energético do núcleo do átomo excitado é feito pela liberação de energia, ou seja, um átomo submetido ao

processo de ativação possui seu núcleo em um estado excitado de energia e, por isso, passa a emitir radiação. O número de átomos capazes de emitir radiação diminui gradualmente e de maneira randômica com o decorrer do tempo, caracterizando o decaimento radioativo (ANDREUCCI, 2005), o qual pode ser expresso matematicamente pela seguinte equação:

$$N = N_0 \cdot e^{-\lambda \cdot t}$$

Onde:

N_0 = número inicial de átomos excitados.

N = números de átomos excitados após certo intervalo de tempo.

e = base do logaritmo neperiano.

λ = constante de desintegração, característica do material radioativo.

t = tempo.

O tempo necessário para que metade dos átomos de um determinado elemento radioativo se torne estável é chamado de meia vida ($T_{1/2}$). A taxa de desintegração dos átomos é diferente de um elemento para outro, portanto, as meias vidas de diferentes elementos radioativos também irão se diferir. A meia vida de um radioisótopo pode ser calculada a partir da seguinte equação:

$$T_{1/2} = \frac{0,693}{\lambda}$$

Onde:

$T_{1/2}$ = meia-vida do elemento.

λ = constante de desintegração radioativa.

A atividade de um radioisótopo é proporcional ao número de átomos no estado excitado e, portanto, pode ser calculada por uma equação semelhante a do decaimento radioativo:

$$A = A_0 \cdot e^{-\lambda \cdot t}$$

Onde:

A_0 = atividade inicial do elemento radioativo.

A = atividade do elemento radioativo após certo intervalo de tempo.

e = base do logaritmo neperiano.

λ = constante de desintegração, característica do material radioativo.

t = tempo.

A unidade padrão da atividade de um radioisótopo é o *Becquerel* (Bq), equivalente a 1 átomo se desintegrando por segundo (1Bq = 1dps). Porém, a atividade também pode ser medida em Curie (Ci) que é equivalente a $3,7 \times 10^{10}$ dps ou $3,7 \times 10^{10}$ Bq (TURNER, 1995).

A dose de radiação gama recebida em um dado ponto (P) é diretamente proporcional à atividade da fonte e inversamente proporcional ao quadrado da distância entre a fonte e o ponto considerado:

$$P = \Gamma \cdot \frac{A}{d^2}$$

Onde:

Γ ou *gamão* = constante característica de cada fonte radioativa.

A = atividade da fonte.

d = distância da fonte ao ponto considerado.

A unidade usual de dose de radiação gama absorvida é o *Gray* (Gy). 1 Gy é a absorção de 1 Joule de energia por quilograma de tecido. No entanto, ela também pode ser medida em *rads* que é equivalente a 0,01Gy (1Gy = 100rads) (ANDREUCCI, 2005).

Os efeitos biológicos das radiações ionizantes podem ser diretos ou indiretos. Os efeitos diretos são provocados em consequência do choque da radiação com átomos ou moléculas-chaves no sistema biológico. Os efeitos indiretos também alteram moléculas-chave do sistema biológico, porém, são mediados pela produção de radicais livres decorrentes da radiólise da água. Mais de 80% dos efeitos biológicos causados pela radiação se devem aos efeitos indiretos da radiação (RAMALHO, 2000).

O DNA é o principal alvo das radiações ionizantes, isto porque, proteínas e outras biomoléculas lesadas podem ser sintetizadas novamente se a estrutura do DNA estiver mantida. Tanto os efeitos diretos quanto indiretos das radiações ionizantes podem promover: quebras duplas (DSB) ou simples (SSB) na fita do DNA; danos nas bases nitrogenadas; perda de bases nitrogenadas; ligações cruzadas intercadeia, intracadeia e ligações do DNA com proteínas. Ligações cruzadas prejudicam a replicação local da lesão levando a mutações. Sítios sem base impedem a especificação da base correta na fita complementar durante a replicação. Quebras simples podem originar duplas quebras durante a replicação do DNA e essas quebras duplas são críticas podendo ser letais para as células (OSIPOV et al., 1996).

Os danos induzidos pela radiação ionizante no DNA das células são percebidos molecularmente principalmente pela proteína ATM que ativa uma série de vias, dependendo da fase do ciclo em que a célula se encontra, com o objetivo de interromper a progressão do ciclo e tentar reparar os danos no DNA. Em células na fase G₁, a proteína ATM induz o aumento dos níveis de p53, que ativa p21 e Bax, que por sua vez induzem a parada no ciclo celular e a apoptose. Células na fase S são estimuladas a interromper o ciclo celular pela proteína nbs1. Em células na fase M, a ATM ativa chk1 e chk2 que fosforilam a fosfatase cdc25. Cdc25 fosforilada se liga à proteína 14.3.3 que previne a ativação do complexo ciclinaB/cdk1, induzindo a parada no ciclo celular (FIG. 14) (WILSON, 2004).

O grau e a velocidade de resposta dos tecidos à irradiação é o que vai determinar sua radiosensibilidade; diferentes tecidos possuem diferentes respostas à irradiação. Segundo a Lei de Bergonie e Tribondeau a radiosensibilidade de uma célula é diretamente proporcional à sua taxa de proliferação e inversamente proporcional ao seu grau de diferenciação. Esse princípio justifica o fato das células tumorais serem mais sensíveis à radiação do que células normais (BERGONIE et al., 1959). Entretanto, alguns tipos de tumores como gliomas e melanomas, dentre outros, fogem a essa regra (THAWLEY et al., 1999; BOOTZ et al., 1994).

Os fatores externos também são responsáveis pela resposta das células à radiação ionizante. A presença de oxigênio e água aumenta a produção de radicais livres e conseqüentemente aumenta a radiosensibilidade (KUFÉ et al., 2003).

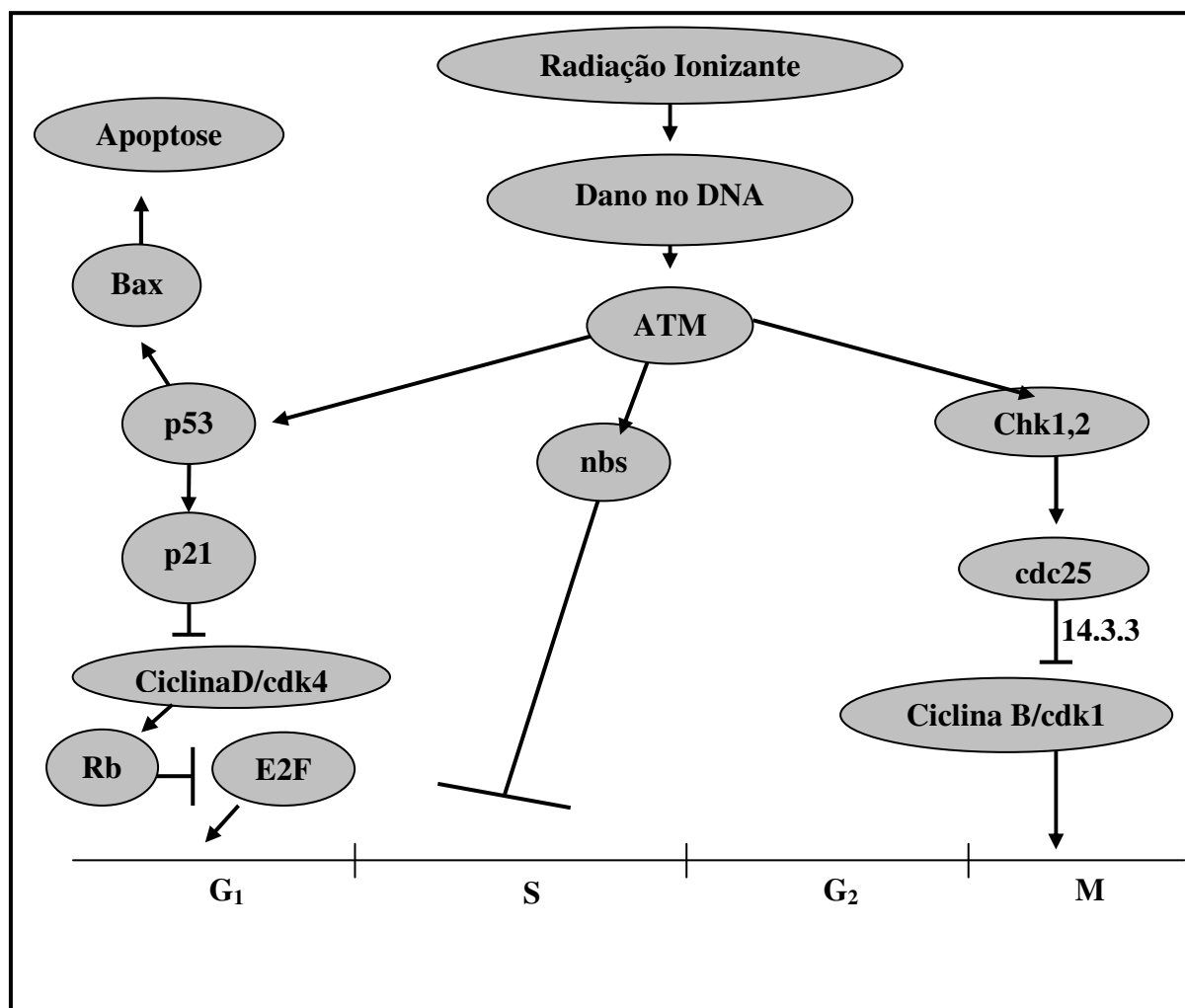


FIGURA 14: Sinalização da paralisação do ciclo celular após um dano causado pela radiação ionizante.

1.8 A busca de novas terapias...

Apesar do grande número de agentes antineoplásicos disponíveis, a resistência de alguns tumores e a toxicidade para as células normais têm sido apontadas como as principais causas da falha terapêutica e perda de vidas. Por este motivo, a busca por novos agentes antitumorais vem aumentando nos últimos anos.

A diversidade química dos produtos naturais tem despertado interesse da indústria farmacêutica. Atualmente, produtos naturais com atividade biológica lideram as estruturas que irão se tornar as principais fontes de novos agentes com potencial farmacológico. Muitos dos fármacos disponíveis no mercado ou em fase de testes clínicos são derivados de produtos naturais, como por exemplo, os derivados de plantas: morfina (analgésico), taxol, podofilotoxina, camptotecina e alcalóides da vinca

(antitumorais), artemisinina (antimalárico), aspirina (antiinflamatório, analgésico, antipirético e inibidor de agregação plaquetária) (DAVID et al., 2002); e os derivados de venenos animais: captopril (anti-hipertensivo, derivado da peçonha de *Bothrops jararaca*), crotalina (analgésico, derivado da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*) e TM-601 marcada com ^{131}I (antitumoral usado na terapia e diagnóstico de tumores, com especificidade para glioblastomas, derivado da chlorotoxina – peptídeo da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus*).

Alguns estudos experimentais usando peçonhas de várias espécies de serpentes para o tratamento de tumores têm sido feitos e resultados promissores têm sido encontrados: BRAGANÇA (1976), CALMETTE (1993) e colaboradores descreveram o efeito antitumoral da peçonha de *Naja naja* em adenocarcinoma, sarcoma de Yoshida, fibrosarcoma e Ehrlich ascítico. COTTE e colaboradores (1972) também demonstraram o efeito antitumoral das peçonhas de *Bothrops venezuelae* e *Bothrops atrox* em carcinomas mamário, epidermal, uterino cervical e de laringe. CORRÊA JR. e colaboradores (2002) descreveram o efeito antitumoral da jararagina, uma toxina da peçonha de *Bothrops Jararaca*, em células de melanoma e OMRAN e colaboradores (2003) descreveram o efeito antitumoral da peçonha de *Naja haje* em células de carcinoma mamário e de próstata.

Estes fatos mostram o enorme potencial terapêutico das peçonhas de serpentes e seus peptídeos e justifica a necessidade de estudos adicionais para identificar novas peçonhas com efeito antitumoral para os diferentes tipos de tumores.

Agentes antineoplásicos possuem propriedades que promovem a diminuição dos sintomas da doença, o aumento da sobrevida dos pacientes e ocasionalmente a cura. Para que uma droga seja eficiente no tratamento de tumores, ela deve matar ou incapacitar as células tumorais sem, no entanto, causar danos excessivos às células normais (VORHERR, 1984). Essa situação ideal pode ser alcançada através da indução da apoptose em células tumorais.

Drogas capazes de promover a parada no ciclo celular, inibir a capacidade proliferativa e estimular a apoptose em células neoplásicas, seja por via mitocondrial ou receptor de morte, podem ser bastante úteis na terapia antineoplásica (TARAPHADAR et al., 2001).

Muitos dos fármacos derivados de produtos naturais, utilizados na clínica para o tratamento de neoplasias, atuam em fases específicas do ciclo-celular. Os alcalóides da vinca, por exemplo, ligam-se às proteínas microtubulares, impedem a formação do fuso

mitótico e interrompem a divisão celular na mitose; a podofilotoxina (extraída da raiz de *Podophyllum peltatum*) bloqueia a progressão do ciclo celular das células tumorais nas fases S e G₂ e a enzima asparaginase (isolada de bactérias) inibe a síntese de proteínas nas células tumorais resultando no bloqueio da proliferação celular (ALMEIDA et al., 2005).

Estes fatos reforçam a importância de estudos elaborados sobre componentes capazes de atuar especificamente no ciclo celular, inibindo a proliferação e induzindo a apoptose de células tumorais, o que fornecerá informações valiosas a respeito das possíveis aplicações destes componentes para a terapia do câncer.

1.9 A peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*

As serpentes do gênero *Crotalus* são representadas no Brasil por uma única espécie, *Crotalus durissus*, distribuídas desde o cerrado do Brasil central e regiões áridas e semi-áridas do Nordeste, até os campos e áreas abertas do Sul, Sudeste e Norte. A subespécie *Crotalus durissus terrificus* (FIG. 15) representa o grupo de serpentes do gênero *Crotalus* mais comum no Brasil, sendo responsável por cerca de 10% dos acidentes ofídicos (BRASIL, 2005).

Em envenenamentos por serpentes *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*) não são observadas manifestações locais significativas e a dor é usualmente discreta. No entanto, picadas de *Cdt* induzem várias manifestações sistêmicas, principalmente neuroparalíticas, entre as quais se destacam ptose palpebral, flacidez da musculatura facial, diplopia e paralisia dos nervos cranianos (ROSENFELD, 1971 - citado por: SAMPAIO, 2004). Também são observadas algumas hemorragias discretas e progressivamente surgem mialgias generalizadas. A insuficiência renal aguda é a principal complicação e causa de óbito (BRASIL, 2005).



FIGURA 15: *Crotalus durissus terrificus* (Foto de Laura Watson – Disponível em: <http://www.serpentario.edu.uy/expolaura/2.html>).

A composição e a toxicidade da peçonha de *Cdt* sofrem variações de acordo com a idade, sexo, dieta, sazonalidade e distribuição geográfica da serpente (MAGRO et al., 2001). Em geral, a peçonha de *Cdt* é composta por polipeptídeos biologicamente ativos, aminoácidos, carboidratos, lipídios, aminas biogênicas e enzimas (BERCOVICI et al., 1987; RANGEL-SANTOS et al., 2004). Os principais polipeptídeos presentes na peçonha de *Cdt* são: Convulxina, Giroxina, Crotamina e Crotoxina.

A Convulxina é uma glicoproteína associada, experimentalmente, a crises convulsivas e representa cerca de 5% do peso total da peçonha (PRADO-FRANCESCHI et al., 1981 - citado por: SAMPAIO, 2004). É formada por um complexo de unidades globulares α e β (PM= 72kDa) capaz de agregar e lisar plaquetas através de mecanismos dependentes de cálcio, fibrinogênio e adenosina difosfato (SANO-MARTINS et al., 1992 - citado por: SAMPAIO, 2004).

A Giroxina é uma glicoproteína (PM=35kDa) com atividade esterásica, trombina-like e fibrinogenolítica (ALEXANDER et al., 1988). Também foi demonstrado que esta toxina age sobre o sistema nervoso central em camundongos, causando síndrome da lesão labiríntica (BARRIO, 1961 - citado por: ALVES DA SILVA et al., 2006).

A Crotamina é uma proteína básica e representa cerca de 17% do peso total da peçonha de *Cdt* (PM= 4,8kDa). É uma molécula relativamente compacta e estável, constituída por 42 resíduos de aminoácidos, sendo 6 cisteínas, que formam 3 pontes dissulfeto (LAURE, 1975 - citado por: FADEL et al., 2005). A Crotamina foi isolada

em serpentes brasileiras primeiramente por GONÇALVES e colaboradores (1950) (Citado por: OGUIURA et al., 2005) e mostrou ter atividade mionecrótica; a DL₅₀ da Crotamina em camundongos é aproximadamente 3,4mg/Kg (i.v.) (KARLSSON, 1979 - citado por: MANCIN et al., 1998). Alguns autores indicam que a fibra muscular é o principal alvo da Crotamina e também sugerem que ela ativa canais de sódio aumentando a permeabilidade aos íons Na⁺ (CHEYMOL et al., 1971; CHANG et al., 1978 - citados por: NICASTRO et al., 2003). MANCIN e colaboradores demonstraram que além de possuir efeito analgésico (1998), a Crotamina ativa proteases e fosfolipases A₂ presentes na peçonha (1997). Estudos recentes mostraram que a Crotamina é capaz de penetrar nas células e interagir com a cromatina tanto *in vitro* como *in vivo*, no entanto, a natureza desta interação ainda não está clara (KERKIS et al., 2004).

A Crotoxina (24-26kDa) é o principal componente tóxico da peçonha de *Cdt* (VITAL-BRAZIL, 1972 - citado por: SAMPAIO, 2004) e representa cerca de 68% da sua massa total (DA SILVA et al., 1981 - citado por: DOS SANTOS M.C. et al., 1992). Ela possui atividades fosfolipásica, neurotóxica e miotóxica (GOPALAKRISHNAKONE et al., 1984; KOUYOUMDJIAN et al., 1986 - citados por: DOS SANTOS M.C. et al., 1992) e sua DL₅₀ em camundongos é 0,13mg/Kg (NOVAIS et al., 2006). Ela é formada por um complexo não covalente de duas diferentes subunidades: uma ácida (subunidade A ~9,5kDa) e uma básica (subunidade B ~14,5kDa). A subunidade B possui atividade fosfolipásica A₂ (FLA₂) e é formada por uma cadeia simples de 122 resíduos de aminoácidos ligados por sete pontes dissulfeto (AIRD et al., 1986; BON et al., 1979). A subunidade A, formada por três cadeias de polipeptídeos ligadas por sete pontes dissulfeto (AIRD et al., 1985), é desprovida de atividade catalítica e não é tóxica (DL₅₀ i.v. em camundongo >20mg/mL). As duas subunidades formam espontaneamente um complexo 1:1 (HABERMANN et al., 1978). A formação do complexo inibe a atividade fosfolipásica, mas aumenta a toxicidade por no mínimo uma ordem de magnitude (HABERMANN et al., 1972; HAWGOOD et al., 1979); dois mecanismos podem explicar esse fenômeno: 1) a subunidade A atua como uma “chaperona” prevenindo a ligação não específica da subunidade B às membranas (CHANG et al., 1981) e 2) a subunidade A promove o reconhecimento do alvo. Então, a Crtx circula sem se dissociar (como um complexo) até que reconheça o sítio específico na membrana alvo (BON et al., 1979). Após a ligação, a Crtx se dissocia em suas subunidades: subunidade B permanece ligada, enquanto que a subunidade A é liberada no meio (FIG. 16) (RADVANYI et al., 1989). A atividade fosfolipásica A₂ da

Crotoxina, assim como outras fosfolipases A₂, é ativada por íons cálcio (BREITHAUPT, 1976 - citado por: MARLAS et al., 1982).

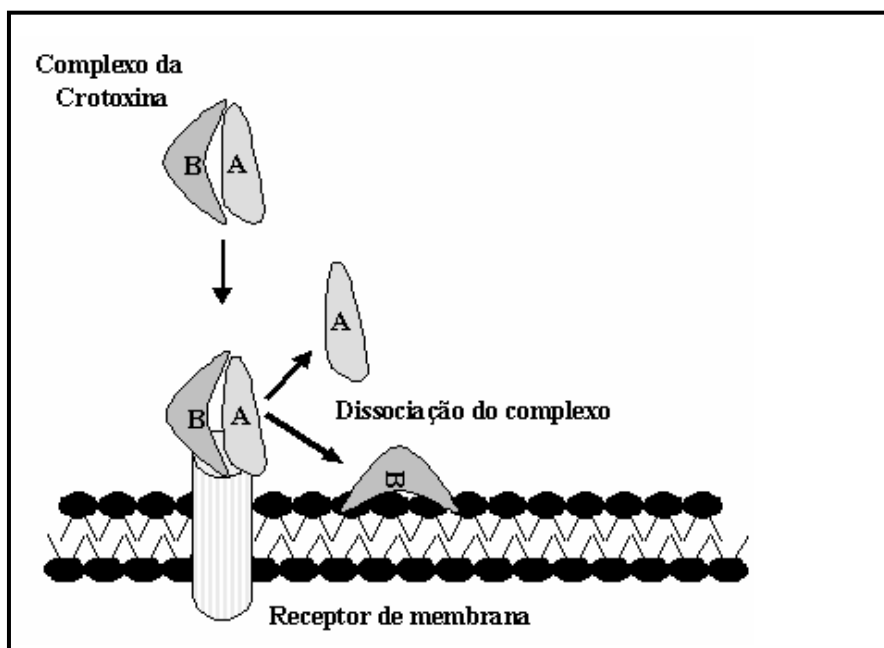


FIGURA 16: Interação da Crotoxina com a membrana plasmática (Adaptado de CELTIC BIOTECH, 2006. Disponível em: http://www.celticbiotech.com/bio_pharmaceuticals.php).

A Crotoxina exerce sua ação patofisiológica através do bloqueio da transmissão neuromuscular. Ela atua, primariamente, ao nível pré-sináptico através da alteração da liberação de neurotransmissores (HAWGOOD et al., 1977) e também pós-sinápticamente pela estabilização do receptor de acetilcolina em um estado inativo (BON et al., 1989) (Citados por: CURA et al., 2002).

1.9.1 Estudos experimentais sobre a atividade antitumoral da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* e da sua principal toxina

Pesquisas sobre os efeitos redutores de tumor por peçonhas de serpente já são desenvolvidas há alguns anos e a peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (PC) e suas toxinas que vêm sendo indicadas para o tratamento de alguns tipos de neoplasias.

A Crotoxina mostrou ter atividade citotóxica para uma variedade de linhagens de células tumorais murínicas (CORIN et al., 1993 - citado por: CURA et al., 2002.) e humanas (PLATA et al., 1992; RUDD et al., 1994 - citado por: CURA et al., 2002.) *in*

vitro e esta atividade têm sido atribuída à atividade fosfolipásica da subunidade B (CORIN et al., 1993) e à habilidade do complexo em se dissociar em suas subunidades (CORIN, et al., 1993; DONATO et al., 1996). Os efeitos citotóxicos da Crotoxina mostraram ser altamente seletivos para linhagens de células que expressam alta densidade de receptores de fator de crescimento (DONATO et al., 1996), sugerindo que receptores de fator de crescimento, ou a função do receptor, desempenham papel importante na busca do alvo. Na ligação e subsequente dissociação da Crtx, a subunidade B ligada inicia a rápida hidrólise ao redor do sítio aceptor, o que leva à morte celular (FLETCHER et al., 1997; OWNBY et al., 1999 - citados por: CURA et al., 2002).

Testes do efeito antitumoral da Crotoxina também foram feitos *in vivo*. Camundongos com tumores de cólon, melanoma e sarcoma osteogênico de Ridgeway foram tratados com Crotoxina (3-4µg/Kg de peso corporal) s.c, durante 90 dias consecutivos. Foi verificado que após o tratamento, os animais tiveram aumento na sobrevivência de até 200% (PLATA et al., 1992). BRIGATTE (2005) também demonstrou que a administração diária de Crotoxina (18µg), durante 5 dias consecutivos, inibiu o crescimento tumoral em animais com tumor de Walker 256 e diminuiu a quantidade de vasos neoformados.

Em 2002, CURA e colaboradores fizeram uma triagem clínica de fase I da Crotoxina, em pacientes com tumores de mama, gastrointestinal, pulmão, carcinoma cervical, próstata, tireóide, cabeça e pescoço, laringe, bexiga, adenocarcinoma do tubo de falópio, sarcoma de Ewing e lipossarcoma. A Crotoxina foi administrada diariamente (i.m.) por 30 dias consecutivos em doses que variaram de 0,03-0,22 mg/m². Este tratamento, além de ter reduzido o tamanho dos tumores, também reduziu significativamente a dor do câncer nos pacientes.

Em 1997, DA SILVA e colaboradores testaram a peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* (0,2-1,6µg/kg) em camundongos com tumor de Ehrlich e concluíram que o tratamento com a peçonha induziu crescimento mais lento das células tumorais, aumentando, assim, a sobrevivência dos animais.

A atividade antitumoral da PC em células de tumores cerebrais foi avaliada, pela primeira vez, neste trabalho.

2 JUSTIFICATIVA

As estatísticas mundiais mostram que mais de 11 milhões de casos novos de câncer são diagnosticados todos os anos e estima-se que em 2020 este número será equivalente a 16 milhões. No Brasil, as neoplasias representam a segunda maior causa de morte por doenças, atrás somente das doenças do aparelho circulatório. Apesar do grande número de agentes antineoplásicos disponíveis, a resistência de alguns tumores e a toxicidade para as células normais têm sido apontadas como as principais causas da falha terapêutica e perda de vidas. A falta de diagnósticos precoces e precisos também contribui bastante para este alto índice de mortalidade.

Os conhecimentos fundamentais sobre neoplasias estão aumentando rapidamente, no entanto, poucos avanços estão sendo obtidos na clínica para terapia e diagnóstico de tumores. O desenvolvimento de substâncias com potencial terapêutico e baixa toxicidade, para serem utilizadas como terapia isolada ou como adjuvante à outras formas de terapia, torna-se a principal ferramenta na tentativa de aumentar a sobrevida dos pacientes e garantir a segurança e eficácia do tratamento.

A diversidade química dos produtos naturais tem despertado interesse da indústria farmacêutica e, atualmente, produtos naturais com atividade biológica lideram as estruturas que irão se tornar moldes de novos agentes terapêuticos e diagnósticos. Peçonhas de serpentes são complexas misturas de muitas substâncias como: polipeptídeos, enzimas, aminoácidos, carboidratos, lipídios e aminas biogênicas, todas com variadas atividades biológicas. Alguns estudos experimentais usando peçonhas de várias espécies de serpentes para o tratamento de tumores têm sido feitos e resultados promissores têm sido encontrados. Serpentes do gênero *Crotalus* são amplamente distribuídas na região de Minas Gerais e apesar do perigo que representam do ponto de vista toxicológico, sua peçonha consiste em uma rica fonte de substâncias com potencial terapêutico. Pesquisas sobre os efeitos redutores de tumor da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (PC) e seus polipeptídeos foram feitas nos últimos anos, no entanto, até o momento, nenhum quimioterápico baseado em produtos derivados de PC obteve aprovação para aplicação na terapia clínica em humanos, demonstrando a necessidade de novos estudos aprofundados na fase pré-clínica.

A justificativa deste projeto consiste na importância da exploração dos produtos naturais locais, como a peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*, na busca de drogas alternativas para o diagnóstico e terapia do câncer.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Identificar e caracterizar o efeito antitumoral da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* e suas frações sobre linhagens de tumores cerebrais, bem como avaliar seu potencial radiosensibilizador e sua aplicabilidade para detecção de tumor *in vivo*.

Objetivos Específicos

- Identificar o efeito antitumoral da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (PC) sobre as linhagens de tumores cerebrais de adenoma de hipófise (GH3) e glioblastoma (RT2) murinos, avaliando citotoxicidade e inibição da capacidade proliferativa.
- Caracterizar os mecanismos de ação antitumoral da PC.
- Avaliar o efeito antitumoral da radiação gama sobre as linhagens de tumores cerebrais de adenoma de hipófise (GH3) e glioblastoma (RT2) murinos, através de estudos de citotoxicidade e proliferação.
- Avaliar o potencial radiosensibilizador da PC.
- Determinar dose antitumoral da PC *in vitro* e avaliar a sua toxicidade *in vivo*.
- Identificar a fração protéica da PC responsável pela atividade antitumoral observada.
- Sintetizar sondas radioativas da PC e seus polipeptídeos usando ^{99m}Tc e ^{125}I como radiotraçadores.
- Realizar o controle de qualidade radioquímico e biológico dos produtos radiomarcados.
- Avaliar a especificidade das frações radiomarcadas da PC para tumores *in vitro*.
- Estudar a biodistribuição da PC e seus polipeptídeos radiomarcados em animais com tumor de Ehrlich e avaliar sua potencial aplicação para estudos de imagem.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo celular

As linhagens de células de adenoma de hipófise (GH3) e de glioblastoma (RT2) murinos foram obtidas da ATCC (American Type Cell Collection) e cultivadas em uma estufa de CO₂ (5% CO₂ - Cole Parmer) com atmosfera úmida à 37°C, em meio *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (meio DMEM completo). Ao atingirem 80% de confluência, as células foram tripsinizadas e a viabilidade celular foi avaliada através da exclusão do azul de Tripán.

O azul de Tripán é um corante de alto peso molecular que só é capaz de entrar em células mortas ou que possuem a permeabilidade de membrana aumentada. A avaliação da viabilidade celular através da exclusão do azul de Tripán consiste em incubar as células por 1 minuto com este corante e quantificá-las com o auxílio de uma câmara de Neubauer (FIG. 17). Células vivas em perfeito estado (membrana impermeável) permanecem incolores e células mortas ou com a permeabilidade de membrana aumentada são visualizadas em azul. As células viáveis (incolores) foram utilizadas nos experimentos (Faixa de passagem: 5-20).

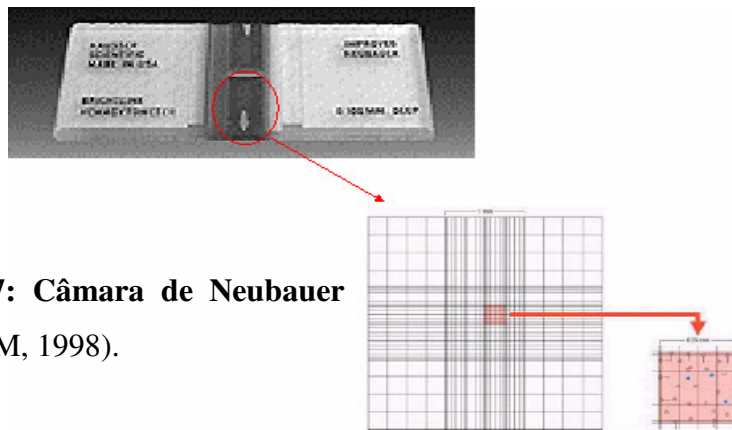


FIGURA 17: Câmara de Neubauer (MANNHEIM, 1998).

A manutenção das culturas foi garantida através do congelamento (-80 e -120°C) de alíquotas contendo 5×10^6 células em DMEM, acrescido de 50% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina e 10% de DMSO.

Os reagentes utilizados no cultivo celular foram obtidos da Gibco® e Cultilab®.

4.2 Peçonha de *Crotalus durissus terrificus* e seus polipeptídeos

As serpentes da espécie *Crotalus durissus terrificus* foram coletadas na região de Belo Horizonte e, após um período de quarentena, tiveram sua peçonha extraída por compressão da glândula. O fracionamento da peçonha foi realizado no laboratório de Bioquímica da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Devido a maior disponibilidade, somente a Crotoxina e a Crotamina foram utilizadas nos experimentos.

No momento da utilização, a peçonha e seus polipeptídeos foram previamente filtrados em filtro Millipore Millex 0.22 μ m, diluídos em meio DMEM e, em seguida, adicionados em diferentes concentrações (1×10^2 – 1×10^5 ng/mL) às culturas de células.

Para os testes *in vivo*, a PC, a Crotoxina e a Crotamina foram diluídas em solução salina (0,9%) estéril.

Após o uso, a peçonha de *Crotalus durissus terrificus* e seus polipeptídeos foram inativados em solução de hipoclorito 5%.

4.3 Radiação Gama

As culturas de células foram irradiadas no Laboratório de Radiação Gama do CDTN (Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear), com uma fonte uniforme de ^{60}Co (GAMMACELL - $E\gamma_1 = 1172,3$ keV; $E\gamma_2 = 1332,5$ keV) sob taxa de dose de 15Gy/h, à temperatura ambiente e na presença de oxigênio molecular. As doses variaram de 3-12Gy.

4.4 Cisplatina

A cisplatina é um agente antineoplásico utilizado na clínica para o tratamento de alguns tipos de tumores cerebrais. Alguns autores já demonstraram que a cisplatina induz a morte apoptótica (MI-RYEONG et al., 2004; FUKUTOMI et al., 2006) e, por este motivo, ela foi utilizada nos experimentos como controle positivo (CTL+) de apoptose.

A cisplatina, em pó (Sigma Chemical Co.) foi dissolvida, filtrada em filtro Millipore Millex 0.22 μ m e, em seguida, adicionada em diferentes concentrações (5×10^2

– 2×10^5 ng/mL) às culturas de células. Todas as manipulações da cisplatina foram feitas ao abrigo da luz.

4.5 Animais

Todos os experimentos com animais foram feitos de acordo com o Manual sobre os cuidados no uso de animais de laboratório (Institute of Laboratory Animal Resources – Commission on Life Sciences – National Research Council – Washington D.C.), como recomendado pelo COBEA.

Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas, pesando de 25-30g, obtidos no Centro de bioterismo (CEBIO) do ICB/UFMG.

Os camundongos foram acondicionados em gaiolas pequenas (30x20x15cm) com um número máximo de 5 animais, recebendo ração e água potável *ad libitum*, em ambiente com temperatura mantida à 25°C e com ciclos dia-noite (12/12 horas). Ao final dos experimentos os animais foram eutanasiados.

4.6 Avaliação do efeito antitumoral da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* e da radiação gama em células de tumores cerebrais

Para estudar o efeito antitumoral da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (PC) e da radiação gama sobre as células tumorais, as mesmas foram divididas em quatro grupos: **A** - controle, **B** - tratadas com PC, **C** - tratadas com radiação gama, **D** - tratadas com PC e radiação gama. O grupo **E** é referente às células tratadas com cisplatina (CTL+).

Todos os experimentos foram padronizados para que as condições experimentais ideais fossem estabelecidas.

Para avaliar o efeito dos diferentes tratamentos sobre a sobrevivência e proliferação das células de tumores cerebrais, os estudos abaixo foram realizados:

4.6.1 Estudo do efeito citotóxico da PC e da radiação gama: avaliação da taxa de sobrevivência das células tratadas

A avaliação do efeito citotóxico da PC e da radiação gama foi feita pela medida da taxa de sobrevivência das células tratadas, através do teste do MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) de acordo com descrição feita por PLUMB e colaboradores (1989).

O MTT é um sal de tetrazolium que, ao ser reduzido por enzimas desidrogenases de células metabolicamente viáveis, forma cristais de Formazan (FIG. 18). Esses cristais são insolúveis em água e apresentam pico de absorção em 570nm.

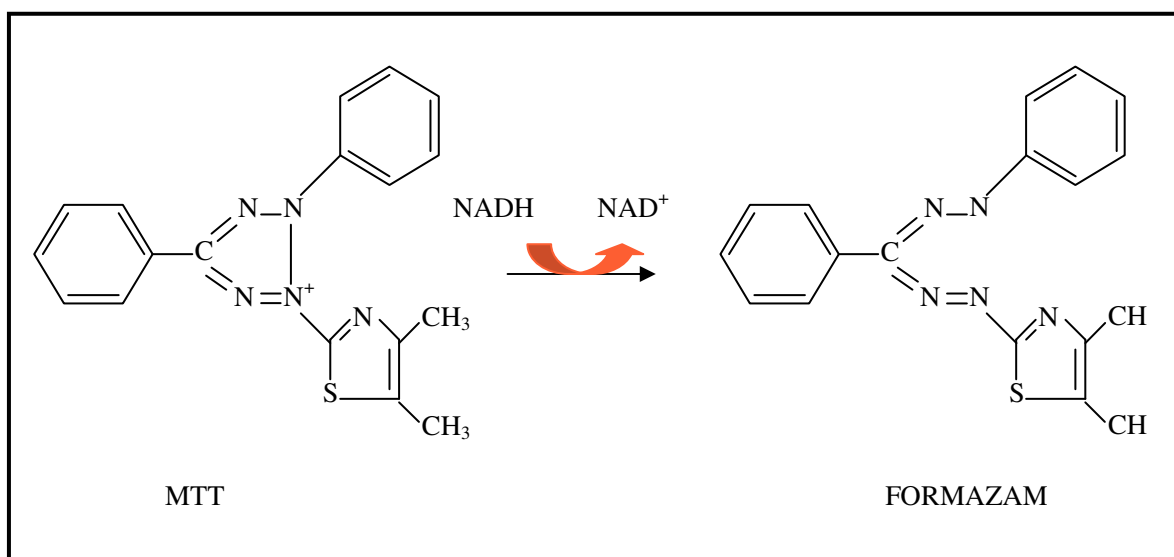


FIGURA 18: Desenho esquemático do MTT sendo reduzido pelas enzimas desidrogenases de células metabolicamente viáveis e dando origem ao Formazan.

Células de tumores cerebrais foram semeadas em placas de 96 poços e, após 24h, foram expostas a diferentes concentrações da PC (1×10^2 – 1×10^4 ng/mL), radiação gama (3-12 Gy) ou cisplatina (CTL+) (5×10^2 - 1×10^4 ng/mL). Em intervalos de 24h as células foram incubadas com o MTT (0,5mg/mL) durante 4 horas, ao abrigo da luz. Posteriormente, o sobrenadante contendo MTT foi retirado e 100µl de DMSO foram colocados em cada poço para solubilizar os cristais de Formazan. As amostras foram medidas por espectrofotometria em um leitor de microplaca UV-visível (Molecular

Devices) à 570nm. A fração de sobrevivência foi calculada como porcentagem do controle (Absorbância no controle =100% de sobrevivência).

4.6.2 Estudo do efeito da PC e da radiação gama sobre a proliferação celular

O efeito da PC e da radiação gama sobre a proliferação das células tumorais foi avaliado através do teste clonogênico. Para isto, células de tumores cerebrais foram semeadas em placas de Petri e após 24h foram expostas a diferentes concentrações de PC (2×10^2 – 1×10^4 ng/mL) ou radiação gama (3-12Gy). Posteriormente, as células foram incubadas por um período de tempo suficiente para que houvesse a formação de colônias isoladas.

Após o período de formação de colônias, as placas foram lavadas em tampão fosfato (PBS) e, só então, coradas pelo Giemsa. Este método de coloração consiste em incubar as placas primeiramente com metanol (100%) à temperatura ambiente por 15-30 minutos. Em seguida, o metanol é descartado e solução Giemsa (0,074%) é adicionada. A incubação com o Giemsa é feita à temperatura ambiente, durante 15-30 minutos. Após a incubação, as placas são lavadas para posterior contagem das colônias isoladas.

A capacidade proliferativa (clonogenicidade) foi calculada como % do número de colônias formadas em relação ao controle não tratado, dividindo-se o número de colônias nas placas tratadas pelo número de colônias nas placas controle. Foram consideradas, apenas, as colônias com mais de 50 células.

4.7 Avaliação do mecanismo de ação antitumoral da PC e da radiação gama

4.7.1 Análise morfológica

Para a análise das alterações morfológicas causadas pelos diferentes tipos de tratamentos, as células GH3 e RT2 foram semeadas em placas de 96 poços e, após 24h, foram expostas a diferentes concentrações da PC (3×10^3 – 1×10^4 ng/mL) e radiação gama (3-12 Gy). Após 48 horas de tratamento, as células foram visualizadas ao microscópio óptico (Nikon) e fotografadas (Nikon).

4.7.2 Análise eletroforética da fragmentação do DNA induzida pela PC e pela radiação gama

A fragmentação do DNA induzida pela PC e pela radiação gama foi avaliada por análise eletroforética em gel de agarose, de acordo com método descrito por KRAVTOV e colaboradores (1999).

Células GH3 e RT2 foram semeadas em placas de Petri e, após 24h foram expostas à PC (1×10^4 ng/mL) ou radiação gama (9Gy). Após diferentes intervalos de tempo (1h-24h), as células foram tripsinizadas para posterior extração do DNA.

A extração do DNA das células tratadas e controles foi realizada seguindo o protocolo para extração de DNA de células de mamíferos do Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega®). A pureza do DNA extraído foi determinada por espectrofotometria (Shimadzu), pela relação entre a absorvância medida a 260 e 280nm.

O DNA extraído foi submetido à eletroforese horizontal (Pharmacia Biotech) em gel de agarose 1,5%, no qual foi adicionado brometo de etídio ($5 \mu\text{g/mL}$). A migração foi feita utilizando o tampão TAE (0,4M de Tris/HCl; 50mM de acetato de sódio; 10mM de EDTA pH=8,0) a uma diferença de potencial constante de 80V, por 90 minutos.

As bandas de DNA foram visualizadas em um transiluminador com luz UV (Vilber Lourmat).

4.7.3 Análise das alterações do DNA cromossomal, induzidas pela PC e pela radiação gama, através da coloração com DAPI

O DAPI (4',6- diamidine- 2'- phenindole dihydrochloride) é um corante fluorescente, capaz de se ligar especificamente às fitas duplas do DNA cromossomal (KUBOTA et al., 2000).

Para análise das alterações do DNA cromossomal, células GH3 e RT2 foram semeadas em placas de 96 poços e, após 24h, foram tratadas com PC ($3 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ ng/mL), radiação gama (9Gy) ou cisplatina (CTL+) ($3 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ ng/mL). Após 48h de tratamento, as células foram lavadas 1x com PBS e fixadas em metanol (gelado) por 20 minutos. Após fixação, as células foram lavadas novamente 1x com PBS e incubadas por 30 minutos com DAPI (SIGMA – Chemical Co.) na concentração de

400ng/mL, diluído em PBS. Após o período de incubação, o sobrenadante contendo DAPI foi retirado e as células foram lavadas 5x com PBS. Núcleos das células corados com DAPI foram visualizados em microscópio de fluorescência (Nikon- 385-410nm).

4.7.4 Análise do ciclo celular das células tratadas com PC por citometria de fluxo

A análise do ciclo celular foi feita por citometria de fluxo; técnica que permite detectar o número de células presentes em cada fase do ciclo celular através da quantificação do DNA (GORCZYCA,1999). O iodeto de propídio (IP), que se liga ao DNA em intervalos de 4 pares de bases, foi o fluorocromo utilizado neste experimento.

Células GH3 e RT2 foram semeadas em placas de 24 poços e, após 24h, foram tratadas com PC ($3 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ ng/mL) ou cisplatina ($3 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ ng/mL). Neste experimento, a cisplatina foi utilizada como controle positivo (CTL+) de apoptose.

Após 48h de tratamento, as células foram lavadas 1x com PBS e tripsinizadas. Posteriormente, foram fixadas em etanol (75%) e incubadas por 1 hora à -20°C. Após a incubação, as células foram lavadas novamente 1x com PBS e incubadas por 30 minutos em solução contendo 100µg/mL de Rnase e 20µg/mL de IP (SIGMA – Chemical Co.) à 37°C, no escuro. Após o período de incubação, a solução contendo IP foi retirada e as células foram lavadas 5x com PBS. A análise do ciclo celular foi feita em citômetro de fluxo (FACScan – Beckton Dickson) em FL2 (585±42nm) e a fluorescência emitida foi mensurada e plotada. As análises dos resultados obtidos foram feitas no programa CellQuest – BD. A porcentagem de células em SubG₁ (apoptóticas), G₁/G₀, S, G₂/M e células polinucleadas foi determinada.

4.7.5 Análise do sobrenadante das células tratadas com PC por eletroforese (SDS-PAGE) e Zimografia

A análise do sobrenadante das células controles e tratadas com PC foi feita com o objetivo de identificar as possíveis proteínas excretadas pelas células após o tratamento e caracterizá-las quanto à atividade enzimática.

Para isso, células GH3 e RT2 foram semeadas em placas de 40mm² e, após 24h, foram tratadas com PC (1×10^4 ng/mL). Após 24 horas de tratamento, o meio de cultura contendo PC foi retirado, as células foram lavadas 5x em PBS e novo meio sem SFB foi

acrescentado às culturas, para permitir a excreção das proteínas. Após 48h, o meio sobrenadante foi coletado, dialisado contra PBS à 4°C, liofilizado (Liofilizador LABCONCO) e o total de proteínas foi quantificado pelo método de Lowry (1951) em um espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu).

A avaliação do perfil protéico do sobrenadante das células tratadas com PC foi feita em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS/PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS), de acordo com a descrição feita por LAEMMLI (1970). O gel de separação foi feito com 7% de acrilamida-bis acrilamida (30:1), 1,5M de Tris-HCl pH=8,8, 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,04% de persulfato de amônio, 0,02% de N,N,N',N'-tetrametil-1,2-diaminometano (TEMED) e água destilada. As amostras do sobrenadante (40µg) foram diluídas em tampão da amostra (125mM de Tris-HCl, 2,5% de SDS, 20% de glicerol e 0,05% de azul de bromofenol) e fervidas por 5 minutos. As amostras foram aplicadas no gel de empacotamento (4% de acrilamida-bis acrilamida) e submetidas à migração eletroforética (Hofer Scientific Instruments) em tampão de migração (1,5% de Glicina, 0,3% de Tris-HCl, 0,1% de SDS) a uma diferença de potencial de 100V, por 2 horas. Após a migração, as proteínas foram reveladas através da coloração com Comassie Blue. Os géis foram devidamente escaneados para documentação.

A caracterização da atividade gelatinolítica das proteínas presentes no sobrenadante das células tratadas com PC foi feita por zimografia, usando gelatina comercial sem sabor como substrato (SDS-PAGE-gelatina). Os géis foram feitos de acordo com a metodologia já descrita anteriormente e ao gel de separação foi acrescentado 0,1% de gelatina. As amostras do sobrenadante (40µg) foram diluídas em tampão da amostra (2,5% de SDS, 3% de sacarose, 0,05% de vermelho de fenol e água destilada), aplicadas ao gel de empacotamento e submetidas à eletroforese a uma diferença de potencial de 100V, por 4 horas. Após a migração, o gel foi lavado em solução contendo 2,5% de TRITON-X100, para remover o SDS, e incubado *overnight* à 37°C em tampão fosfato (PBS) com diferentes valores de pH (5,0-9,0), para determinar o efeito do pH na atividade proteolítica. Após a incubação, o gel foi corado com Comassie Blue e a atividade gelatinolítica foi detectada através das bandas não coradas.

4.7.6 Avaliação da influência do Ca⁺² e do SFB na atividade antitumoral da PC

A peçonha de *Crotalus durissus terrificus* possui proteínas com atividade fosfolipásica secretória (sFLA2), enzima que é ativada por concentrações de Ca⁺² na faixa de micromolar (AKIBA et al., 2004).

Com a finalidade de avaliar a influência das sFLA2 e dos fatores de crescimento na atividade antitumoral da PC, células GH3 e RT2 foram semeadas em placas de 24 poços e, após 24h, foram tratadas com PC (1x10⁴ng/mL) na ausência de Ca⁺² (PBS + SFB) ou na ausência de SFB (DMEM sem soro). Após 24 horas de tratamento, a taxa de sobrevivência das células foi medida pelo teste do MTT (descrito no item 4.6.1). Os resultados obtidos foram comparados com o efeito do tratamento com esta mesma concentração de PC em meio DMEM completo contendo Ca⁺² e SFB.

4.8 Avaliação da atividade gelatinolítica da PC

Algumas proteínas com atividade enzimática possuem a capacidade de degradar a matriz extracelular (MEC) e as principais enzimas que possuem essa capacidade são as metaloproteases. As metaloproteases podem ser classificadas de acordo com seu substrato específico de degradação: as colagenases I, II e III degradam o colágeno intersticial I, II e III, respectivamente; as gelatinases degradam principalmente colágeno desnaturado (gelatinas); as estromelinas degradam fibronectina e proteoglicanas e as matrilisinas degradam fibronectina e colágeno do tipo IV (PEREIRA et al., 2006).

As metaloproteases estão presentes em peçonhas de várias serpentes e podem inibir a adesão celular através da degradação das proteínas da matriz extracelular (CALVETE et al., 2003).

A avaliação da presença de metaloproteases na PC, com a capacidade degradar colágeno desnaturado, foi feita por zimografia conforme descrito no item 4.7.5, (com exceção da concentração de acrilamida-bis acrilamida contida no gel de separação que foi 12%).

4.9 Avaliação do potencial radiosensibilizador da PC

Para avaliar do potencial radiosensibilizador da PC, células GH3 e RT2 foram semeadas em placas de 96 poços e, após 24h, foram tratadas com PC (1×10^3 - 5×10^3 ng/mL). Após 24 horas de tratamento, o meio com PC foi substituído por meio DMEM completo e as células foram submetidas à radiação gama (3-12Gy). A avaliação do potencial radiosensibilizador da PC foi feita, após 48h do tratamento com radiação, através dos testes de citotoxicidade (MTT) e de análise morfológica do DNA cromossomal através da coloração com DAPI (descritos nos itens 4.6.1 e 4.7.3, respectivamente). Os resultados obtidos foram comparados com os tratamentos isolados com a peçonha e com a radiação gama.

4.10 Avaliação da toxicidade aguda produzida pela administração da dose antitumoral da PC estabelecida *in vitro*

A dose antitumoral da PC, estabelecida *in vitro*, foi calculada, em μg da PC por mm^2 de área tratada, a partir do IC_{50} do teste MTT após 24 horas de tratamento (FIG. 21). Depois de calculada, esta dose foi injetada nos animais em uma simulação de tratamento de um tumor de 18mm^2 (injeção intratumoral).

Dez camundongos Swiss, machos, pesando de 25-30g foram separados em dois grupos experimentais contendo 5 animais em cada um: grupo controle, injetados (s.c.) com solução salina estéril (0,9%) e grupo tratado, injetados (s.c.) com a dose antitumoral da PC estabelecida *in vitro*.

Após 24 horas do tratamento, uma alíquota do sangue dos animais foi coletada (via intravenosa, i.v., caudal) para posterior avaliação das alterações bioquímicas e hematológicas induzidas pelo tratamento. Os animais foram, então, eutanasiados e os órgãos foram retirados para análises histopatológicas.

Para avaliar nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e miotoxicidade induzida pelo tratamento com a dose antitumoral da PC, estabelecida *in vitro*, foram feitas análises bioquímicas toxicológicas através de medidas de fosfatase alcalina, albumina, proteínas totais, uréia e creatina quinase (CK) presentes no soro sanguíneo dos animais tratados. Para isso, o sangue dos animais foi centrifugado (Beckman) por 10 minutos a 3000rpm e o soro foi coletado. Os métodos utilizados para as análises bioquímicas toxicológicas estão descritos a seguir:

- A fosfatase alcalina compreende um grupo de enzimas fosfohidrolases que apresentam atividade máxima em pH alcalino. Estão presentes em vários tecidos, com maiores concentrações no fígado, epitélio do trato biliar e ossos. A determinação da fosfatase alcalina se aplica muito bem para o diagnóstico de doenças do fígado, que são caracterizadas pelo aumento da concentração da enzima no sangue. A medida da fosfatase alcalina presente no soro dos animais controles e tratados com PC foi feita seguindo as instruções do Kit para determinação da fosfatase alcalina, por metodologia cinética colorimétrica (405nm), da Gold Analisa Diagnóstica (Cat. 440 - MS80022230081).

- A albumina constitui a principal proteína do soro e é sintetizada principalmente no fígado. Valores diminuídos de albumina no soro caracterizam insuficiência hepática, síndrome nefrótica e glomerulonefrite. A medida da albumina presente no soro dos animais controles e tratados com PC foi feita seguindo as instruções do Kit para determinação da albumina, por metodologia colorimétrica (630nm), da Bioclin (MS10269360114).

- A diminuição da quantidade de proteínas no soro pode ser um indício de insuficiência renal aguda. A medida das proteínas totais presentes no soro dos animais controles e tratados com PC foi feita seguindo as instruções do Kit para determinação das proteínas totais pelo método biureto colorimétrico (550nm) da In vitro diagnóstica (Cat. 013 - MS80002670014).

- A uréia é o principal produto do catabolismo das proteínas e aminoácidos e constitui uma indicação grosseira do estado da função renal. Valores aumentados da uréia plasmática são classificados como resultantes de defeitos da excreção como a diminuição da filtração glomerular. A diminuição da uréia sérica ocorre em casos de insuficiência hepática aguda. A medida da uréia presente no soro dos animais controles e tratados com PC foi feita seguindo as instruções do Kit para determinação da uréia, pelo método enzimático colorimétrico (600nm), da Bioclin (MS10269360101).

- A enzima Creatina Quinase (CK) é um indicador altamente sensível e específico de lesão muscular. A creatina quinase é formada por moléculas diméricas compostas de subunidades M e B e existem na forma de isoenzimas MM, MB e BB. As subunidades M e B são imunologicamente distintas, sendo a CK-MM e CK-MB distribuídas principalmente nos músculos esquelético e cardíaco, respectivamente, enquanto que a CK-BB está presente principalmente no cérebro e tecidos compostos de músculo liso. A medida de CK total permite a dosagem das três isoenzimas. Há uma grande variação

individual na atividade sérica normal da enzima CK, onde as concentrações séricas aumentam ligeiramente após exercícios físicos. A medida da CK total presente no soro dos animais controles e tratados com PC foi feita seguindo as instruções do Kit para determinação de CK, pelo método cinético colorimétrico (340nm), da Doles Ltda (MS10231810072).

Para avaliar as alterações hematológicas causadas pelo tratamento com a dose antitumoral da PC, estabelecida *in vitro*, as amostras de sangue foram coletadas em EDTA e enviadas para o laboratório de Patologia Clínica da escola de Veterinária da UFMG, para quantificação dos leucócitos (Contador automático de células – Abacos). Para quantificação das hemácias as amostras de sangue foram centrifugadas à 3000rpm por 10 minutos e as células vermelhas foram transferidas para um tubo contendo líquido diluidor (Líquido de Dacie- Citrato de sódio 3,1%, Formol 0,4% e água destilada). Posteriormente, as hemácias foram contadas (M.O) com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

4.11 Avaliação do papel da Crotoxina e da Crotamina no efeito antitumoral da PC

A Crotoxina e a Crotamina são as duas proteínas mais abundantes na peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (DA SILVA et al., 1981; LAURE, 1975).

A avaliação do papel da Crotoxina e da Crotamina sobre o efeito antitumoral da PC foi feita através do teste de citotoxicidade (MTT), da análise morfológica do DNA cromossomal através da coloração com DAPI (descritos nos itens 4.6.1 e 4.7.3, respectivamente) e pela análise morfológica (descrita no item 5.9.1). Os resultados obtidos foram comparados com o efeito antitumoral da peçonha bruta.

4.12 Síntese de sonda radioativa da Crotoxina e da Crotamina, utilizando ^{125}I como radiotraçador, para estudos de interação com células tumorais *in vitro* e biodistribuição em animais com tumor de Ehrlich

4.12.1 Síntese de sonda radioativa da Crotoxina e da Crotamina utilizando ^{125}I como radiotraçador

Todos os experimentos utilizando material radioativo foram feitos tomando-se os devidos cuidados de radioproteção, de acordo com a norma CNEN 3.01. As bancadas foram devidamente forradas, os EPI (jaleco, luvas, dosímetro e óculos de proteção) foram utilizados, os descartes de rejeitos foram etiquetados com as informações pertinentes (identificação do radioisótopo, tipo de emissão, o tipo de rejeito), a blindagem adequada foi utilizada e o monitoramento das possíveis contaminações de superfície foi feito com o detector Geiger-Müller.

Com o objetivo de avaliar a interação dos polipeptídeos presentes na PC com as células tumorais, sondas radioativas de Crotoxina e a Crotamina foram sintetizadas, utilizando o radioisótopo ^{125}I como radiotraçador, para posteriores estudos de interação *in vitro* e *in vivo*.

A síntese da sonda radioativa foi feita por uma reação de substituição eletrofílica, misturando-se 5-25 μg de cada polipeptídeo com 0,5mCi de Na^{125}I e quantidade adequada de lactoperoxidase. A reação foi iniciada pela adição de 10 μL de solução de peróxido de hidrogênio e, após dois minutos, a reação foi interrompida através da diluição da mistura de reagentes em uma solução contendo 0,05M de PBS e 0,1% de BSA. A separação do iodo livre (^{125}I) foi feita em resina de troca aniônica (DOWEX[®] 1X), previamente saturada com solução de 0,05M de PBS (pH= 7,4) e 0,1% de BSA. O controle de qualidade da síntese da sonda radioativa foi feito por cromatografia ascendente em papel Whattman N°1 (2x20cm) usando metanol saturado com iodeto de potássio como fase móvel. Após a corrida cromatográfica, as fitas foram cortadas em tiras de 1cm e a radioatividade foi medida em um aparelho de espectrometria gama (Wallac - Janela:35keV - Eficiência do aparelho: 80%). Após o cálculo da eficiência da radiomarcção, foi possível calcular a atividade específica dos polipeptídeos radiomarcados.

A Crotoxina e a Crotamina possuem a capacidade de se ligarem em membranas excitáveis (KRIZAJ et al., 1996; MATAVEL et al., 1998), como sinaptossomas cerebrais. Por este motivo, a preservação da atividade biológica das proteínas radiomarcadas foi confirmada pela interação com sinaptossomas cerebrais de rato.

4.12.2 Estudo da interação da Crotoxina e da Crotamina radiomarcadas com alvos presentes na membrana das células tumorais

O estudo de interação dos polipeptídeos radiomarcados com os receptores de membrana das células de glioblastoma murino foi feito incubando-se as células íntegras ($0,5 \times 10^6$ céls/ ponto - $10 \mu\text{g}$) com 10^{-10} M de ^{125}I -Ctx ou ^{125}I -Crota na ausência (ligação total) ou presença (ligação não específica) de um excesso de 1000 vezes dos polipeptídeos nativos. A incubação foi feita em tampão TBSA (50mM de Tris, 150mM de NaCl, 0,1% de BSA), durante 1h, à 25°C. Após o período de incubação, o polipeptídeo ligado às células foi separado do polipeptídeo livre por centrifugação (Beckman) a 12500rpm, durante 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado foi lavado 4 vezes em tampão de lavagem TBSA (50mM de Tris, 150mM de NaCl, 1% de BSA). A radioatividade incorporada às células foi medida no aparelho de espectrometria gama. A ligação específica dos polipeptídeos radiomarcados aos tumores foi calculada pela subtração da ligação não específica da ligação total. O estudo de interação também foi feito em sinaptossomas de cérebro de rato (P2) (controle de células cerebrais não tumorais- $10 \mu\text{g}$) e em células de tumor de Ehrlich (modelo tumoral animal já padronizado, feito em colaboração com o laboratório de Patologia Comparada do ICB/UFMG).

4.13 Síntese de sonda radioativa da PC, utilizando o radioisótopo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ como radiotraçador, para estudos de biodistribuição em animais com tumor de Ehrlich

O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é obtido a partir de um gerador de molibdênio sob a forma oxidada $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (pertechnetato), que é quimicamente estável. No entanto, por ser um metal de transição, ele pode existir em 9 estados de oxidação (-1 a +7) o que lhe dá a possibilidade de formar complexos de coordenação com numerosos quelantes. A

coordenação de agentes quelantes ao ^{99m}Tc é feita quando o metal se encontra em estados de oxidação inferiores ao VII. Ao ser reduzido, o ^{99m}Tc pode se complexar com ligantes que contém grupos doadores de elétrons, marcando-os radioativamente. Na ausência de ligantes, $^{99m}\text{TcO}_2^-$ (colóide) é obtido a partir da redução de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (JURISSON et al., 1999).

Com o objetivo de avaliar a interação da PC com as células tumorais, uma sonda radioativa da peçonha foi sintetizada, utilizando o ^{99m}Tc radiotraçador, para posteriores estudos de biodistribuição em animais com tumor de Ehrlich.

A síntese da sonda radioativa da PC foi feita incubando-se 100 μg da PC, $3,7 \times 10^6 \text{Bq}$ (100 μCi) de ^{99m}Tc e os agentes redutores cloreto estano (SnCl₂- 2mg/mL em HCl) e borohidreto de sódio (NaBH₄- 10mg/mL em NaOH) por 30 minutos em pH=7,0. Após o tempo de incubação, a peçonha foi filtrada (Millipore - 0.22 μm) e o controle de qualidade da radiomarcção foi feito por cromatografia ascendente em SILICA GEL 60 (Merck), utilizando acetona como fase móvel, e descendente em papel Whatman N^o1, utilizando salina 0,9% como fase móvel (FIG. 19). Após a corrida cromatográfica, as fitas foram cortadas em tiras de 1cm e a radioatividade foi medida em um contador gama (Wallac - Janela:140keV - Eficiência do aparelho: 80%). O rendimento da radiomarcção foi calculado da seguinte forma:

$$\text{RENDIMENTO} = 100 - (X+Y)$$

Onde:

$$X = ^{99m}\text{TcO}_4^-$$

$$Y = ^{99m}\text{TcO}_2$$

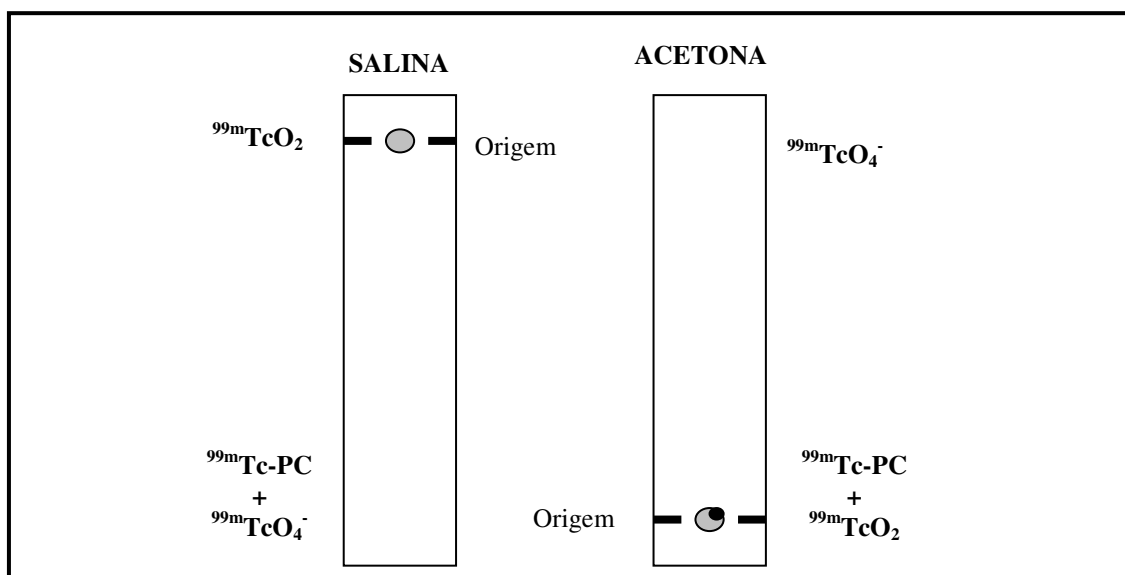


FIGURA 19: Desenho esquemático do controle de qualidade da radiomarcagem com ^{99m}Tc por cromatografia ascendente em SILICA GEL 60 descendente em papel WHATTMAN N°1.

A atividade biológica da $^{99m}\text{Tc-PC}$ foi confirmada através da análise da atividade hemolítica indireta, de acordo com método descrito por CADILLO et al., 1998. Para isso, hemácias humanas foram ressuspensas em tampão Glicina-NaCl (0,1M de glicina em NaCl 0,6% - pH=5,8) (10%v/v) e incubadas durante 1 hora a 37°C com uma emulsão de gema de ovo (6,4% em Tris-HCl 50mM - pH 7,5) e uma solução de peçonha nativa ou marcada com ^{99m}Tc (1-150 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após o tempo de incubação, a mistura foi centrifugada (Beckman) por 10 minutos a 3000rpm e a hemoglobina presente no sobrenadante foi quantificada espectrofotometricamente (Shimadzu) a 540nm.

4.14 Avaliação da interação, *in vivo*, da $^{99m}\text{Tc-PC}$, $^{125}\text{I-Crtx}$ e $^{125}\text{I-Crota}$ com células tumorais – Biodistribuição em animais com tumor de Ehrlich

A interação da $^{99m}\text{Tc-PC}$, $^{125}\text{I-Crtx}$ e $^{125}\text{I-Crota}$ com células tumorais, *in vivo*, foi avaliada através do estudo de biodistribuição em animais com tumor de Ehrlich, com o objetivo de avaliar o potencial uso dessas moléculas radiomarcadas como radiofármacos para detecção de tumores sólidos.

Camundongos Swiss, fêmeas, pesando de 25-30g, foram implantados com as células de tumor de Ehrlich e mantidos no laboratório de Patologia Comparada do departamento de Patologia Geral- ICB/UFMG. O preparo das células tumorais inclui a

lavagem, contagem e teste de viabilidade das mesmas. Com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis estéreis, foram retirados 3mL do fluido ascítico de camundongos pré-inoculados há 10 dias com tumor de Ehrlich na cavidade peritoneal. Esse fluido foi lavado 3x em salina fisiológica para a obtenção de um líquido denso e claro, correspondendo a uma suspensão celular com o mínimo de fibrina e hemáceas. A viabilidade celular foi avaliada através da exclusão do azul de Tripán e as células de tumor de Ehrlich ($2,5 \times 10^6$) foram inoculadas entre os coxins plantares do membro posterior esquerdo dos animais, para obtenção do tumor na forma sólida. Após seis dias do implante do tumor, os animais foram divididos em 10 grupos, contendo 3 animais cada, e utilizados nos experimentos.

A biodistribuição foi feita injetando $^{99m}\text{Tc-PC}$ ou $^{125}\text{I-Crtx}$ ou $^{125}\text{I-Crota}$ ($20,8 \times 10^3 \text{Bq}$) diluídas em salina nos animais, por via intravenosa (i.v.) caudal. O $^{99m}\text{TcO}_2$, o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e o Na^{125}I também foram injetados nas mesmas condições, para avaliar a biodistribuição das possíveis impurezas presentes nos radiofármacos. Após diferentes tempos de injeção (10 minutos – 24 horas), os animais foram eutanasiados e tiveram seus órgãos vitais e patas removidos para avaliação do perfil de biodistribuição e da interação com o tumor. A radioatividade em cada órgão foi determinada em um aparelho de espectrometria gama (Wallac - Janela:35-140keV - Eficiência do aparelho: 80%). Os resultados foram expressos como fração percentual da dose injetada por grama do órgão (%DI/g).

4.15 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, inclusive os respectivos grupos controles. Os resultados foram expressos como a média \pm DP de pelo menos três experimentos. Os dados foram analisados pelo teste t de Student não pareado; foram considerados significativos aqueles dados com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito antitumoral da PC e da radiação gama em células de tumores cerebrais

5.1.1 Estudo do efeito de citotóxico da PC e da radiação gama: avaliação da taxa de sobrevivência das células tratadas

A avaliação do efeito citotóxico da PC e da radiação gama foi feita pela medida da taxa de sobrevivência das células tratadas, através do teste do MTT.

Os resultados obtidos mostraram que a PC foi citotóxica de maneira dose e tempo dependente para as duas linhagens de tumores cerebrais. No entanto, as células GH3 foram mais sensíveis ao efeito citotóxico da PC do que as células RT2, como indicado pelos valores da concentração que inibe 50% das células vivas (IC_{50}): após 48 horas de tratamento, o IC_{50} foi $961,2 \pm 110 \text{ ng/mL}$ para as células GH3 e $2152 \pm 200 \text{ ng/mL}$ para células RT2.

As maiores concentrações utilizadas (5×10^3 - $3 \times 10^4 \text{ ng/mL}$) reduziram significativamente o número de células GH3 vivas, já nas primeiras seis horas de tratamento (± 60 - 75% de redução, $p < 0,01$). O maior efeito citotóxico da PC, para essa linhagem de células, ocorreu após 144h de tratamento com $1 \times 10^3 \text{ ng/mL}$ ($1 \mu\text{g/mL}$), que foi letal para cerca de 95% das células (FIG. 20).

A concentração $3 \times 10^4 \text{ ng/mL}$ ($30 \mu\text{g/mL}$) reduziu cerca de 35% do número de células RT2 vivas já nas primeiras seis horas de tratamento. O efeito citotóxico máximo da PC, para essa linhagem de células, ocorreu 144h após o tratamento com $5 \times 10^3 \text{ ng/mL}$ ($5 \mu\text{g/mL}$), onde não foram encontradas células vivas (FIG. 21).

O tratamento com radiação gama também foi citotóxico para as células GH3 e RT2 de maneira dose e tempo dependente (FIG. 22 e 23, respectivamente). Assim como no tratamento com PC, as células GH3 se mostraram mais sensíveis ao tratamento com radiação gama do que as células RT2. A menor dose testada (3Gy) foi suficiente para reduzir $\pm 30\%$ do número de células GH3 vivas já nas primeiras 24 horas, chegando a $\pm 70\%$ de redução após 144h do tratamento. Diferente do efeito nas células GH3, a dose 3Gy não alterou a sobrevivência das células RT2 nas primeiras 24 horas após o tratamento. No entanto, após 144h este número já havia sido reduzido cerca de 27%. O

maior efeito citotóxico da radiação gama, tanto para células GH3 quanto para RT2, foi alcançado após 144h do tratamento com a dose 12Gy, que foi letal para cerca de 95% das células.

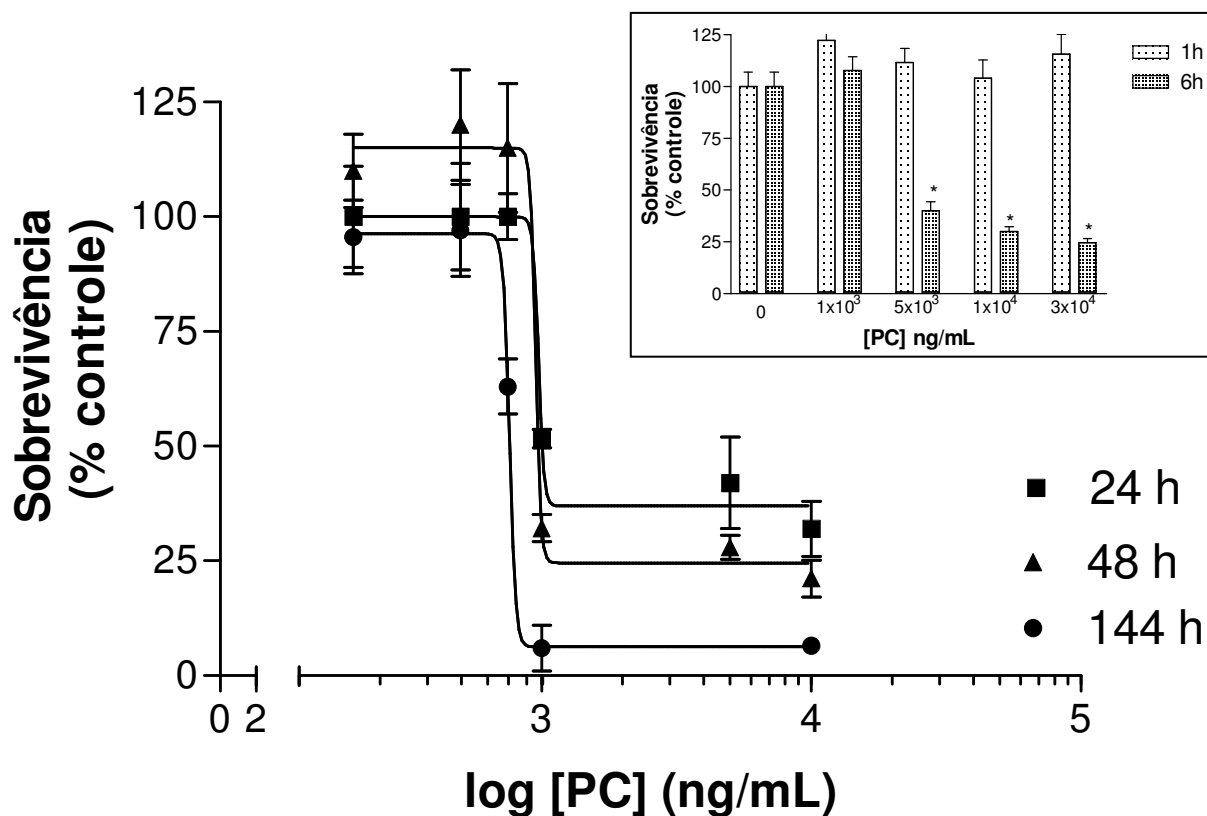


FIGURA 20: Efeito citotóxico da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* para as células GH3. Células GH3 foram tratadas com diferentes concentrações da PC (como indicado). A citotoxicidade foi avaliada, após diferentes tempos de tratamento, pela medida da taxa de sobrevivência das células tratadas, através do teste do MTT. As maiores concentrações utilizadas (5×10^3 - 3×10^4 ng/mL) reduziram significativamente o número de células vivas, já nas primeiras seis horas de tratamento (60-75% de redução). O maior efeito citotóxico da PC ocorreu após 144 horas de tratamento com a concentração 1×10^3 ng/mL ($1 \mu\text{g/mL}$), que reduziu o número de células GH3 vivas cerca de 95%. (n=3), (*p<0,01 em relação ao controle).

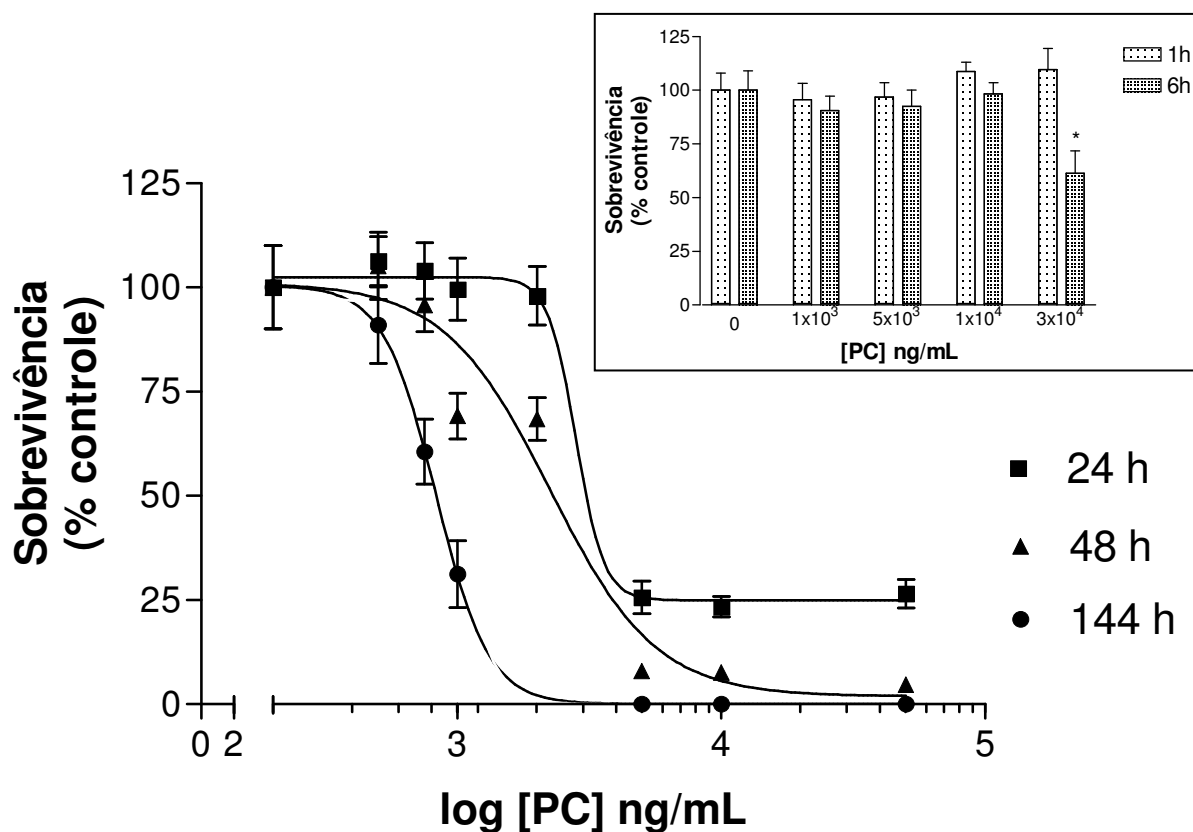


FIGURA 21: Efeito citotóxico da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* para as células RT2. Células RT2 foram tratadas com diferentes concentrações da PC (como indicado). A citotoxicidade foi avaliada, após diferentes tempos de tratamento, pela medida da taxa de sobrevivência das células tratadas, através do teste do MTT. A concentração 3×10^4 ng/mL ($30 \mu\text{g/mL}$) reduziu cerca de $\pm 35\%$ do número de células vivas, já nas primeiras seis horas de tratamento. O efeito citotóxico máximo da PC ocorreu 144h após o tratamento com 5×10^3 ng/mL ($5 \mu\text{g/mL}$), onde não foram encontradas células vivas. (n=3), (*p<0,01 em relação ao controle).

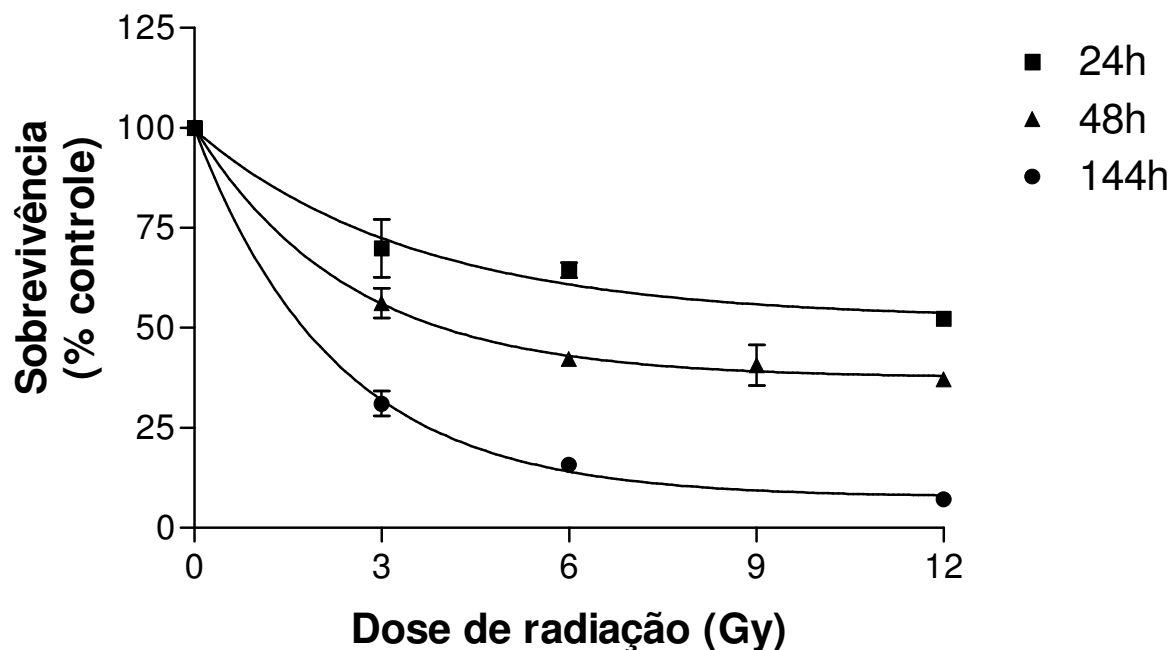


FIGURA 22: Efeito citotóxico da radiação gama para as células GH3. Células GH3 foram tratadas com diferentes doses de radiação gama (como indicado). A citotoxicidade foi avaliada, após diferentes tempos do tratamento, pela medida da taxa de sobrevivência das células tratadas, através do teste do MTT. O efeito citotóxico máximo da radiação gama foi alcançado após 144h do tratamento com a dose 12Gy, que foi letal para cerca de 95% das células. (n=3), $p < 0,01$.

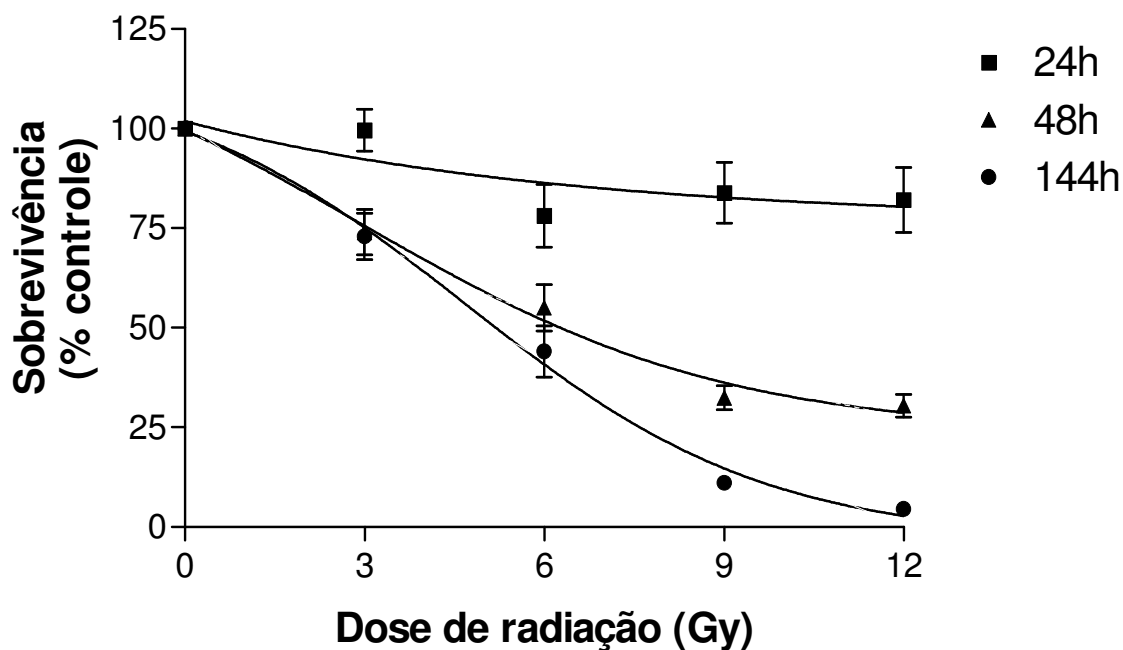


FIGURA 23: Efeito citotóxico da radiação gama para as células RT2. Células RT2 foram tratadas com diferentes doses de radiação gama (como indicado). A citotoxicidade foi avaliada, após diferentes tempos do tratamento, pela medida da taxa de sobrevivência das células tratadas, através do teste do MTT. A radiação gama foi citotóxica para as células RT2 de maneira dose e tempo dependente. (n=3), p<0,01.

A tabela a seguir apresenta a análise comparativa do efeito citotóxico dos diferentes tratamentos estudados (valores referentes ao tratamento de 48h). A cisplatina é um agente antineoplásico utilizado na clínica para o tratamento de alguns tipos de tumores cerebrais. Alguns autores já demonstraram que a cisplatina induz a morte apoptótica (MI-RYEONG et al., 2004; FUKUTOMI et al., 2006) e, por este motivo, ela foi utilizada nos experimentos como controle positivo de apoptose.

TABELA 3: Análise comparativa do efeito citotóxico dos diferentes tratamentos estudados

	GH3	RT2
IC₅₀ da PC	961,2±110ng/mL	2152±200ng/mL**
IC₅₀ da Cisplatina	5011±500ng/mL	4961±400 ng/mL
*IC₅₀ Radiação gama	4,1±0,4Gy	6,3±0,6Gy**

**p<0,01 em relação às células GH3.

5.1.2 Estudo do efeito da PC e da radiação gama sobre a proliferação celular

O efeito da PC e da radiação gama sobre a proliferação das células tumorais foi avaliado através do teste clonogênico, no qual as células, após receberem o tratamento, são incubadas por um tempo suficiente para a formação de colônias isoladas.

A FIG. 24 mostra o efeito da peçonha de cascavel sobre a proliferação das células de adenoma de pituitária e glioblastoma murinos. Ambas as linhagens tiveram sua capacidade proliferativa significativamente reduzida pelo tratamento com PC. O efeito inibitório máximo para as células GH3 e RT2 foi alcançado pelo tratamento com a concentração 2×10^3 ng/mL ($2 \mu\text{g/mL}$).

A FIG. 26 mostra o efeito da radiação gama sobre a proliferação das células de tumores cerebrais. Ambas as linhagens tiveram a clonogenicidade reduzida de forma dose dependente. A linhagem de células GH3 foi significativamente mais sensível ao efeito inibitório da clonogenicidade, provocado pela radiação gama, do que a linhagem de células RT2. O efeito inibitório máximo para as células GH3 e RT2 foi alcançado pelo tratamento com as doses 6 e 12Gy, respectivamente.

As colônias formadas pelas células GH3 e RT2 controles e tratadas podem ser visualizadas nas FIG. 25 e 27.

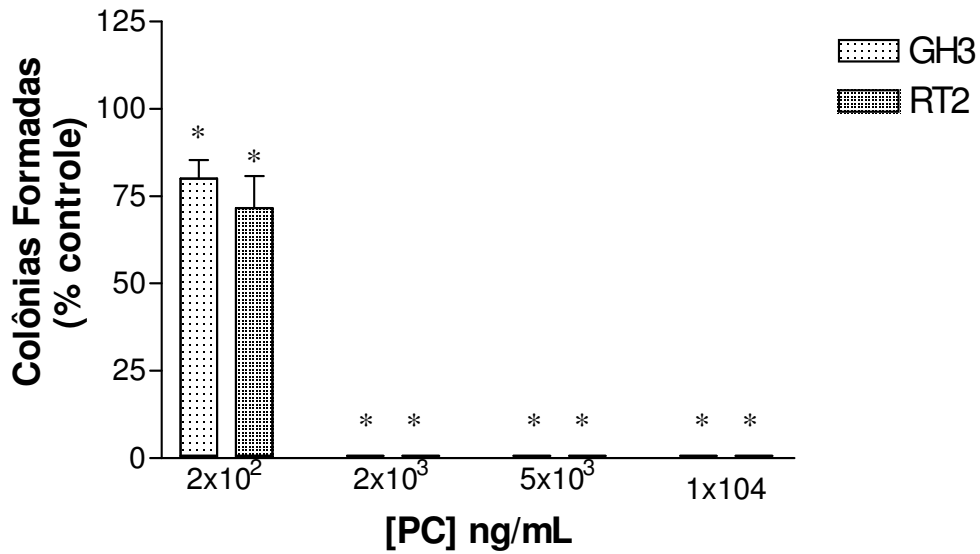
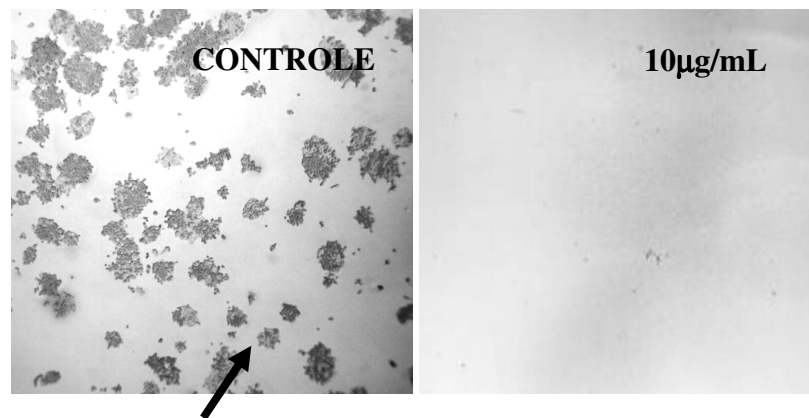


FIGURA 24: Efeito da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* sobre a proliferação de linhagens de tumores cerebrais. Células RT2 e GH3 foram tratadas com diferentes concentrações da PC (como indicado) e incubadas por um período de tempo suficiente para formação de colônias isoladas. Após o período de incubação, as colônias foram coradas pelo Giemsa e aquelas com mais de 50 células foram contadas. Ambas as linhagens tiveram sua capacidade proliferativa significativamente reduzida pelo tratamento com PC. O efeito inibitório máximo para as células GH3 e RT2 foi alcançado pelo tratamento com a concentração 2×10^3 ng/mL ($2 \mu\text{g/mL}$). ($n=3$), ($*p < 0,01$ em relação ao controle).

A – GH3



B – RT2

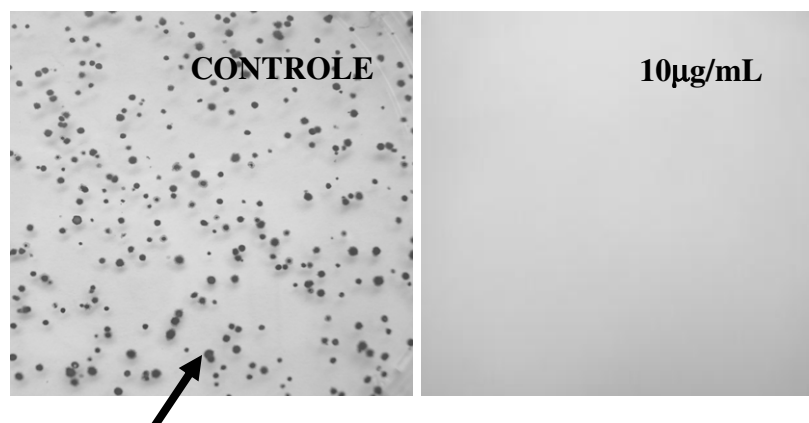


FIGURA 25: Colônias formadas após tratamento com PC. A- Fotomicrografia das células GH3 controles e tratadas com PC (10µg/mL) (M.O - Nikon – Aumento 40x). **B-** Fotomicrografia das células RT2 controles e tratadas com PC (10µg/mL) (Nikon). Setas indicam uma colônia com mais de 50 células.

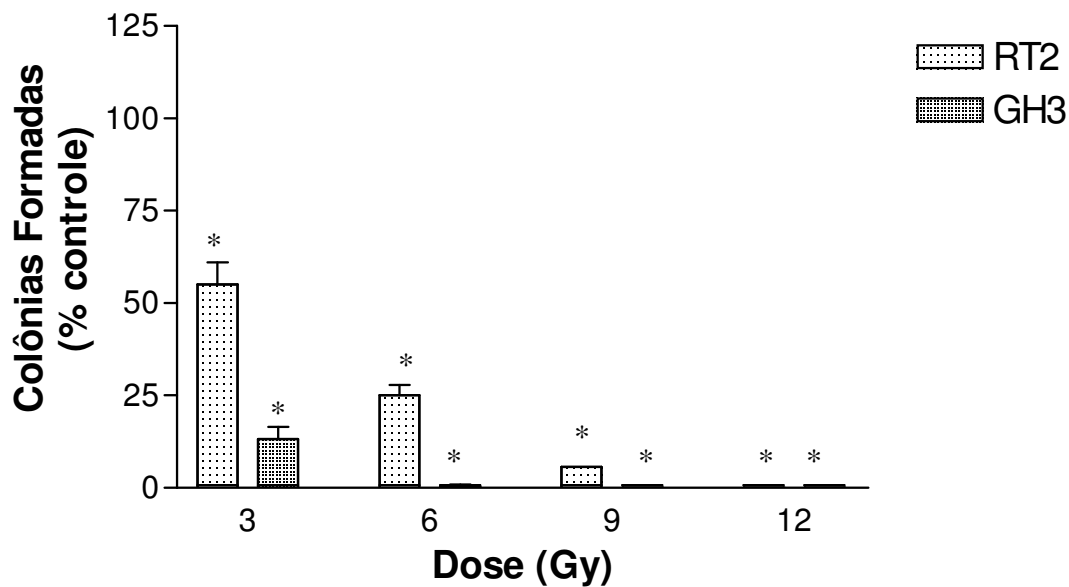


FIGURA 26: Efeito da radiação gama sobre a proliferação das linhagens de tumores cerebrais. Células RT2 e GH3 foram tratadas com diferentes doses de radiação gama (3-12Gy) e incubadas por um período de tempo suficiente para a formação de colônias isoladas. Após o período de incubação, as colônias foram coradas pelo Giemsa e aquelas com mais de 50 células foram contadas. O efeito inibitório da clonogenicidade, causado pela radiação gama, foi dose dependente para as duas linhagens estudadas. O efeito inibitório máximo para as células GH3 e RT2 foi alcançado pelo tratamento com as doses 6 e 12Gy, respectivamente. (n=3), (*p<0,01 em relação ao controle).

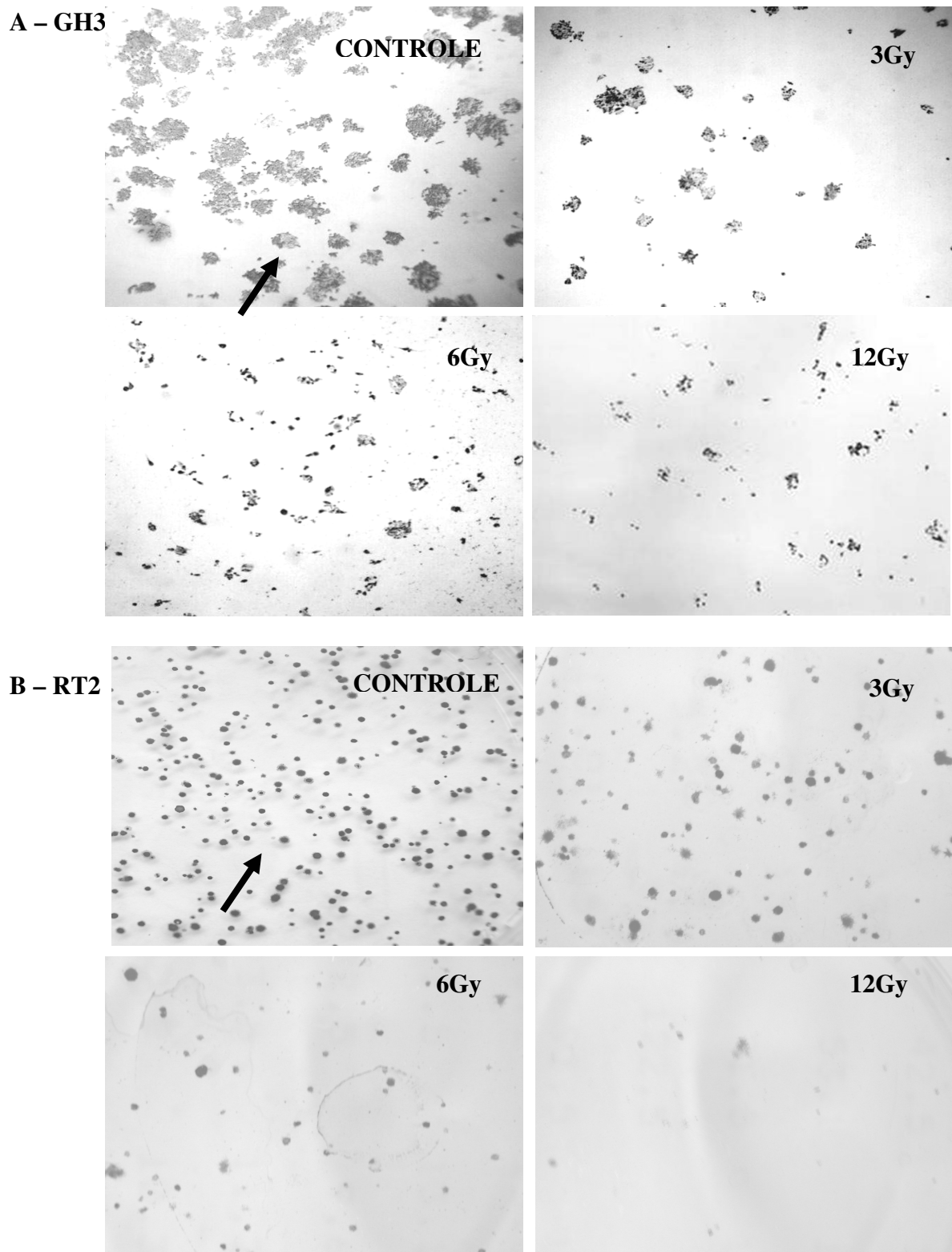


FIGURA 27: Colônias formadas após tratamento com radiação gama. **A-** Fotomicrografia das células GH3 controles e tratadas com radiação gama (3-12Gy) (M.O –Aumento 40x). **B-** Fotomicrografia das células RT2 controles e tratadas com radiação gama (3-12Gy) (Nikon). Setas indicam uma colônia com mais de 50 células.

5.2 Avaliação do mecanismo de ação antitumoral da PC e da radiação gama

5.2.1 Análise morfológica

Para as análises morfológicas, células GH3 e RT2 controles e tratadas com PC ou radiação gama foram fotografadas ao M.O.

As FIG. 28 e 29 mostram que as células GH3 e RT2 tratadas com PC e radiação gama apresentaram alterações morfológicas bastante visíveis tais como: irregularidades na membrana plasmática, redução do volume citoplasmático e formação dos *blebs*, todas características de apoptose. Este resultado é indicativo de que a redução do número de células vivas após o tratamento com PC e radiação gama, observado nas FIG. 20-23, ocorreu através da indução da morte programada, que poderá ser confirmada pelas análises de fragmentação do DNA e do ciclo celular.

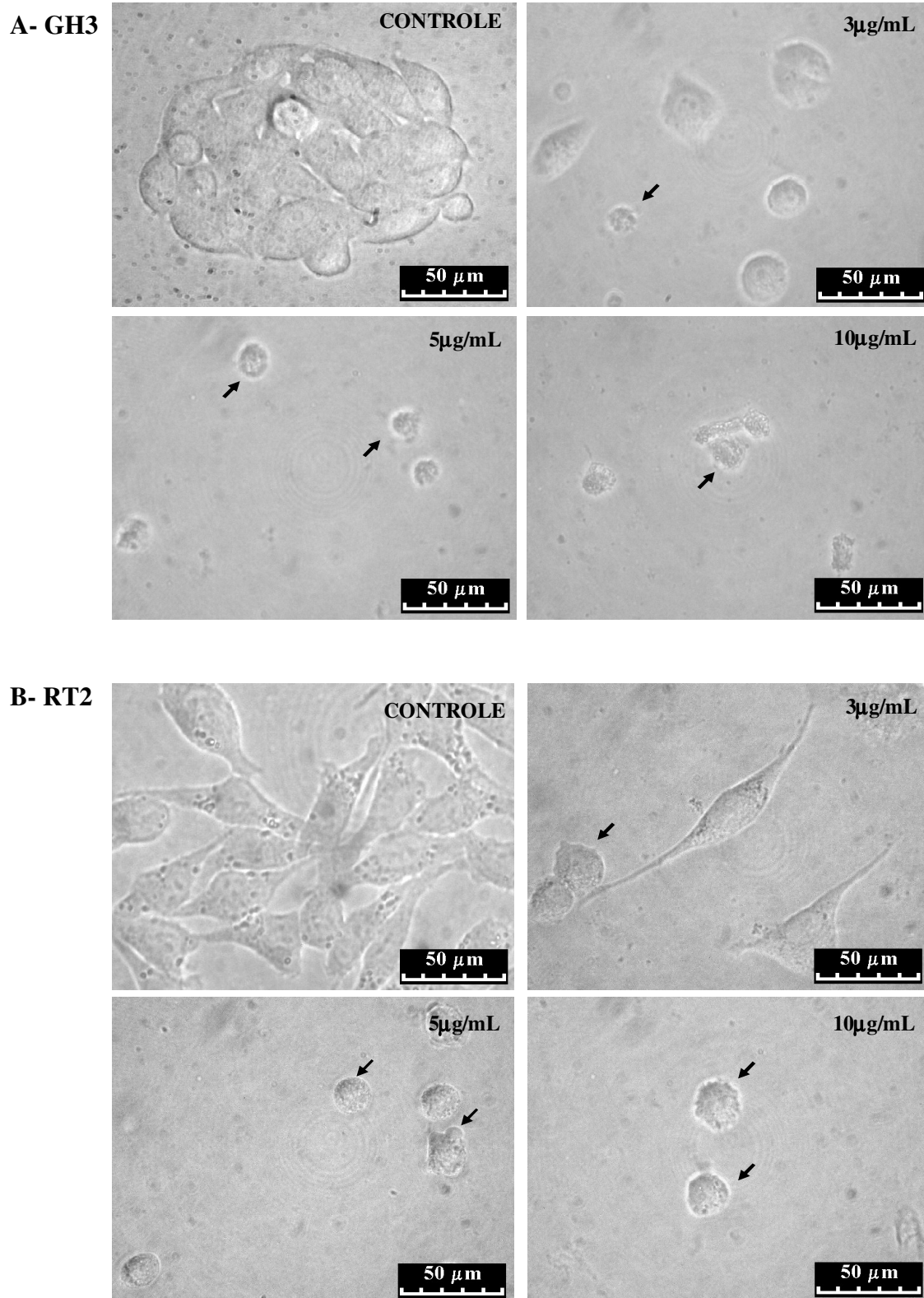


FIGURA 28: Fotomicrografia das células GH3 e RT2 tratadas com PC. Células GH3 (A) e RT2 (B) controles e tratadas por 48h com PC (3-10 μ g/mL). Imagens adquiridas em câmera fotográfica (Nikon) acoplada ao M.O (Aumento 400x). Setas indicam irregularidades na membrana plasmática, redução do volume citoplasmático e formação dos *blebs*.

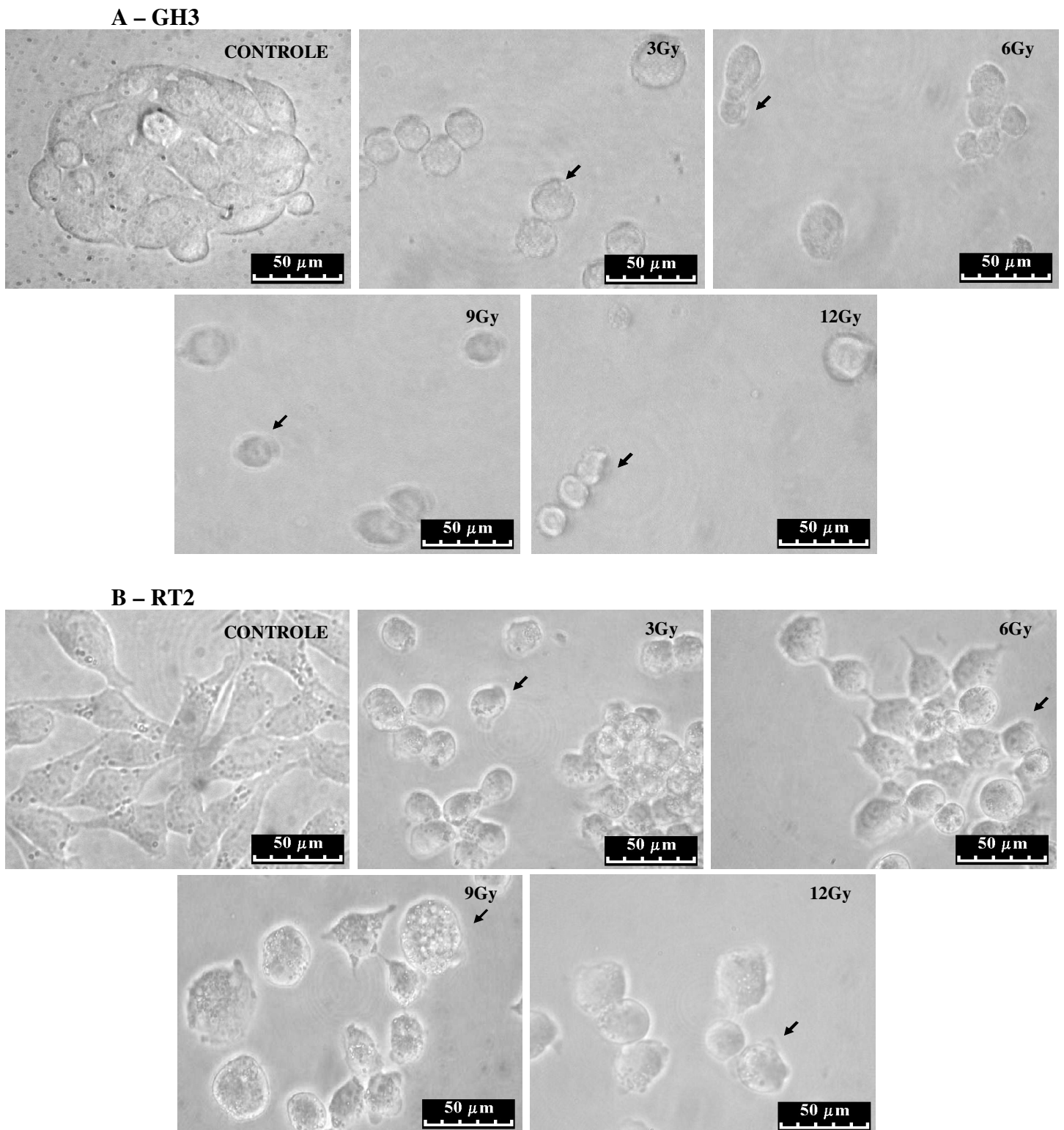


FIGURA 29: Fotomicrografia das células GH3 e RT2 tratadas com radiação gama. Células GH3 (A) e RT2 (B) controles e tratadas com diferentes doses de radiação gama (48h após tratamento). Imagens adquiridas em câmera fotográfica (Nikon) acoplada ao M.O (Aumento 400x). Setas indicam irregularidades na membrana plasmática, redução do volume citoplasmático e formação dos *blebs*.

5.2.2 Análise eletroforética da fragmentação do DNA induzida pela PC e pela radiação gama

São várias as metodologias que permitem a detecção da apoptose e algumas delas consistem na análise de fragmentação do DNA, avaliação das alterações na membrana plasmática como a translocação de fosfatidilserina e avaliação de caspases ativadas (MANNHEIM, 1998). Algumas das técnicas que permitem a análise de fragmentação do DNA são a eletroforese em gel de agarose e a coloração com o DAPI. Estas técnicas fornecem informações complementares e, se utilizadas paralelamente, podem identificar e caracterizar, com segurança, a ocorrência de apoptose.

Através da análise eletroforética em gel de agarose foi possível perceber que o tratamento com PC (10µg/mL) induziu a degradação do DNA das células GH3 e RT2 de maneira progressiva no período de tempo observado (FIG. 30-A).

A radiação ionizante (9Gy) também provocou degradação do DNA das células GH3 de maneira progressiva. Entretanto, em células RT2, a degradação do DNA radioinduzida pôde ser visualizada apenas após a primeira hora do tratamento. Nos tempos subsequentes (6 e 24h) o dano no DNA destas células parece ter sido parcialmente reparado (FIG. 30-B). Este resultado confirma os dados fornecidos pelo teste MTT, onde praticamente todas as células RT2 continuaram vivas após 24 horas da irradiação (FIG. 23).

Sabe-se que a radiação gama promove a morte celular por apoptose (WILSON, 2004) que pode ser detectada pela degradação do DNA. Algumas células apoptóticas apresentam um padrão de fragmentação de DNA característico, detectado em gel de agarose, denominado *ladder*. No entanto, em algumas linhagens de células a formação do *ladder* não é facilmente visualizada (BIOCOMPARE, 2006) como foi observado em nossos experimentos.

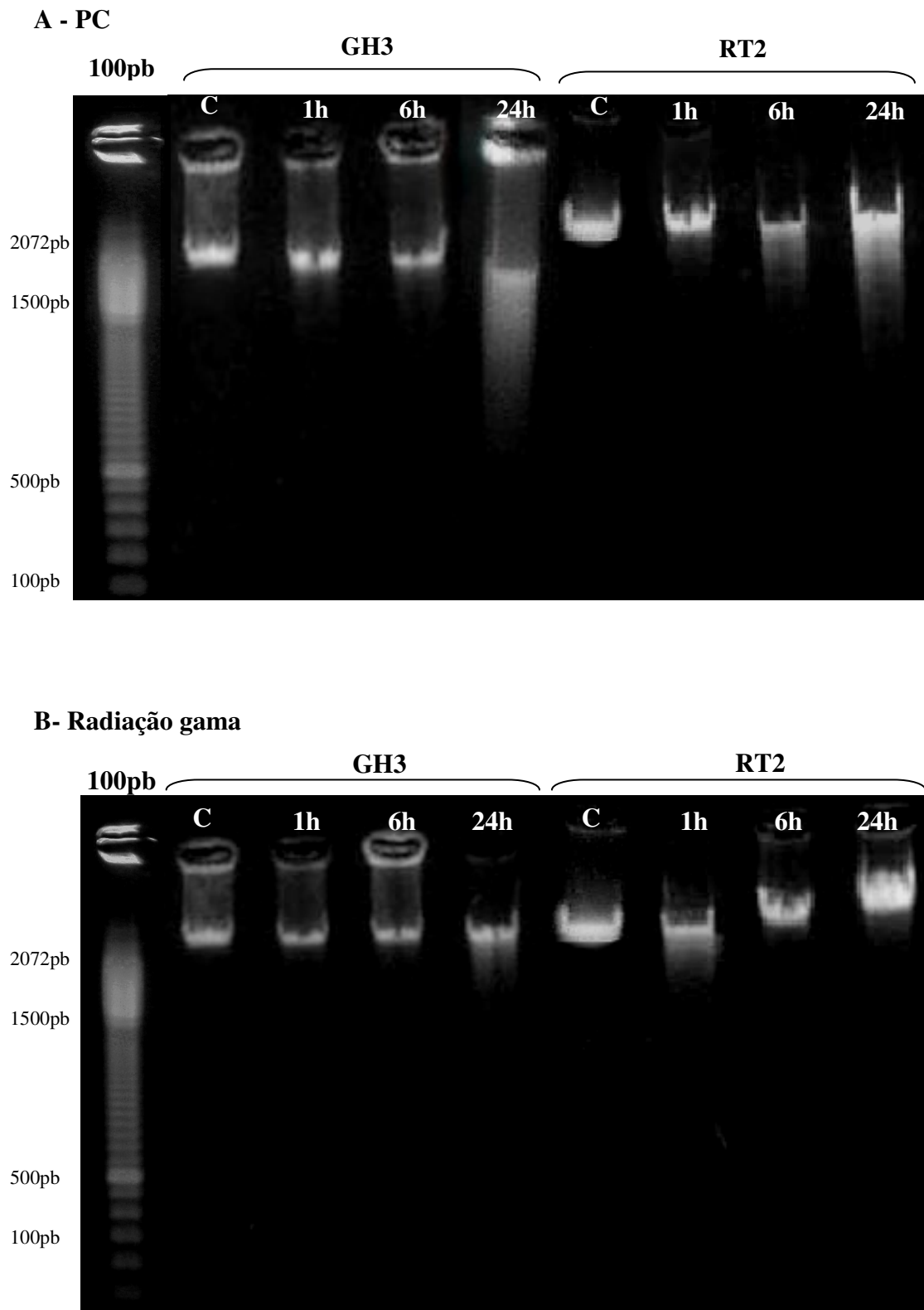


FIGURA 30: Avaliação da degradação do DNA induzida pela PC e pela radiação gama. DNA de células GH3 e RT2 controles e tratadas com (A) PC (10 μ g/mL) e (B) radiação gama (9Gy). As bandas de DNA, coradas com brometo de etídio, foram visualizadas em um transiluminador com luz ultravioleta.

5.2.3 Análise das alterações do DNA cromossomal, induzidas pela PC e pela radiação gama, através da coloração com DAPI

Para complementar as informações obtidas pela análise da fragmentação do DNA por eletroforese em gel de agarose, a morfologia do DNA cromossomal das células GH3 e RT2, controles e tratadas com PC e radiação gama, foi analisada através da coloração com o DAPI, um corante específico de DNA. Esta técnica permite avaliar não só a fragmentação do DNA, mas também outras características de apoptose como a condensação da cromatina e formação dos corpos apoptóticos.

Células GH3 e RT2 tratadas com PC e radiação gama apresentaram, 48 horas após o tratamento, alterações morfológicas no DNA cromossomal semelhantes àquelas provocadas pelo tratamento com cisplatina (CTL+ de apoptose): fragmentação do DNA, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (FIG. 31 e 32), todas características de apoptose.

Estes resultados comprovam que a degradação no DNA das células GH3 e RT2 tratadas com PC, visualizadas pela eletroforese em gel de agarose, é, de fato, característica de apoptose.

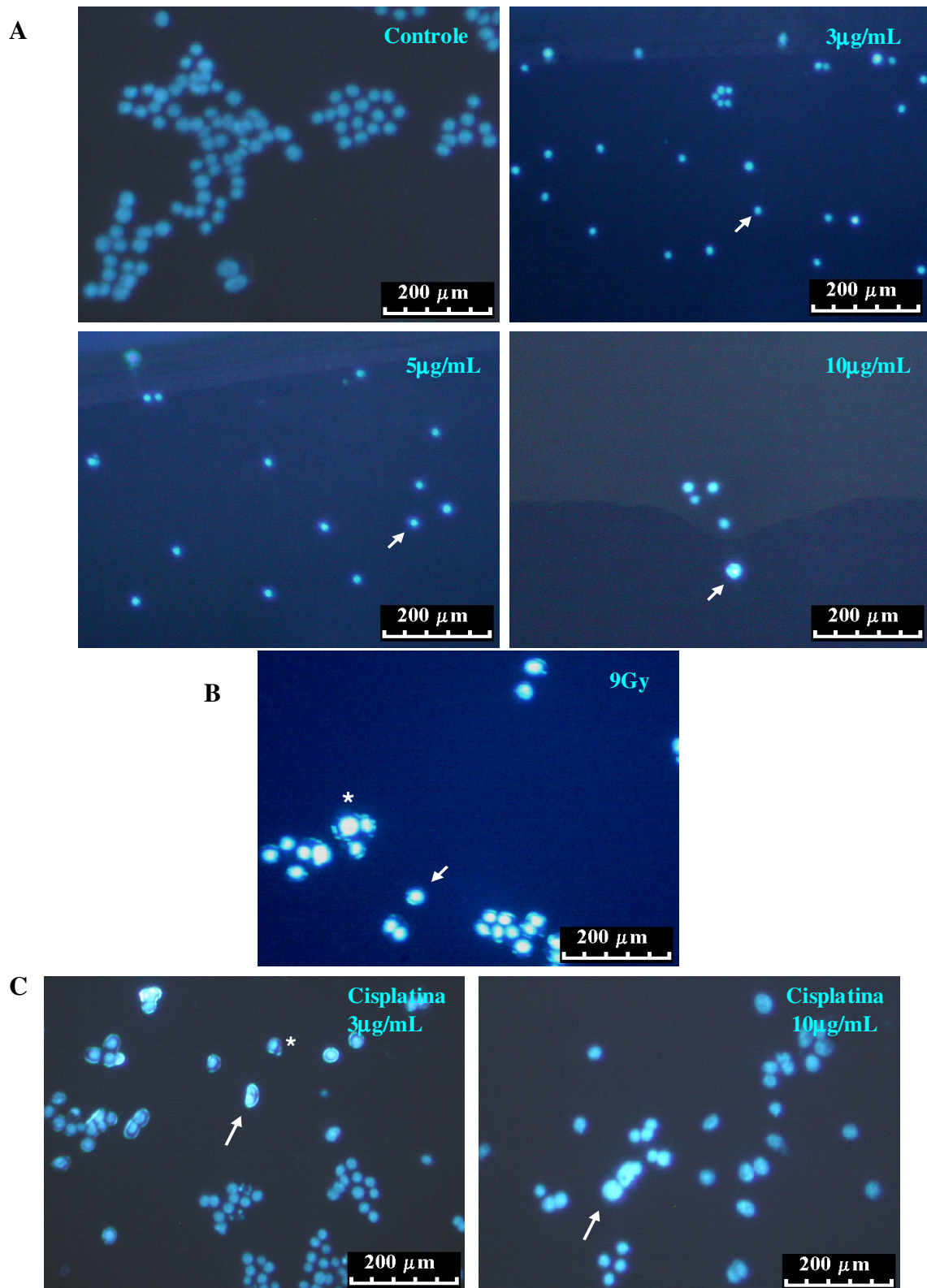


FIGURA 31: Apoptose induzida por PC, radiação gama e cisplatina (CTL+) em células GH3, visualizada através da coloração com DAPI. Células GH3 controles e tratadas por 48h com (A) PC (3-10µg/mL), (B) radiação gama (9Gy) e (C) cisplatina (3-10µg/mL). Setas indicam condensação da cromatina e asteriscos indicam corpos apoptóticos (Aumento100x).

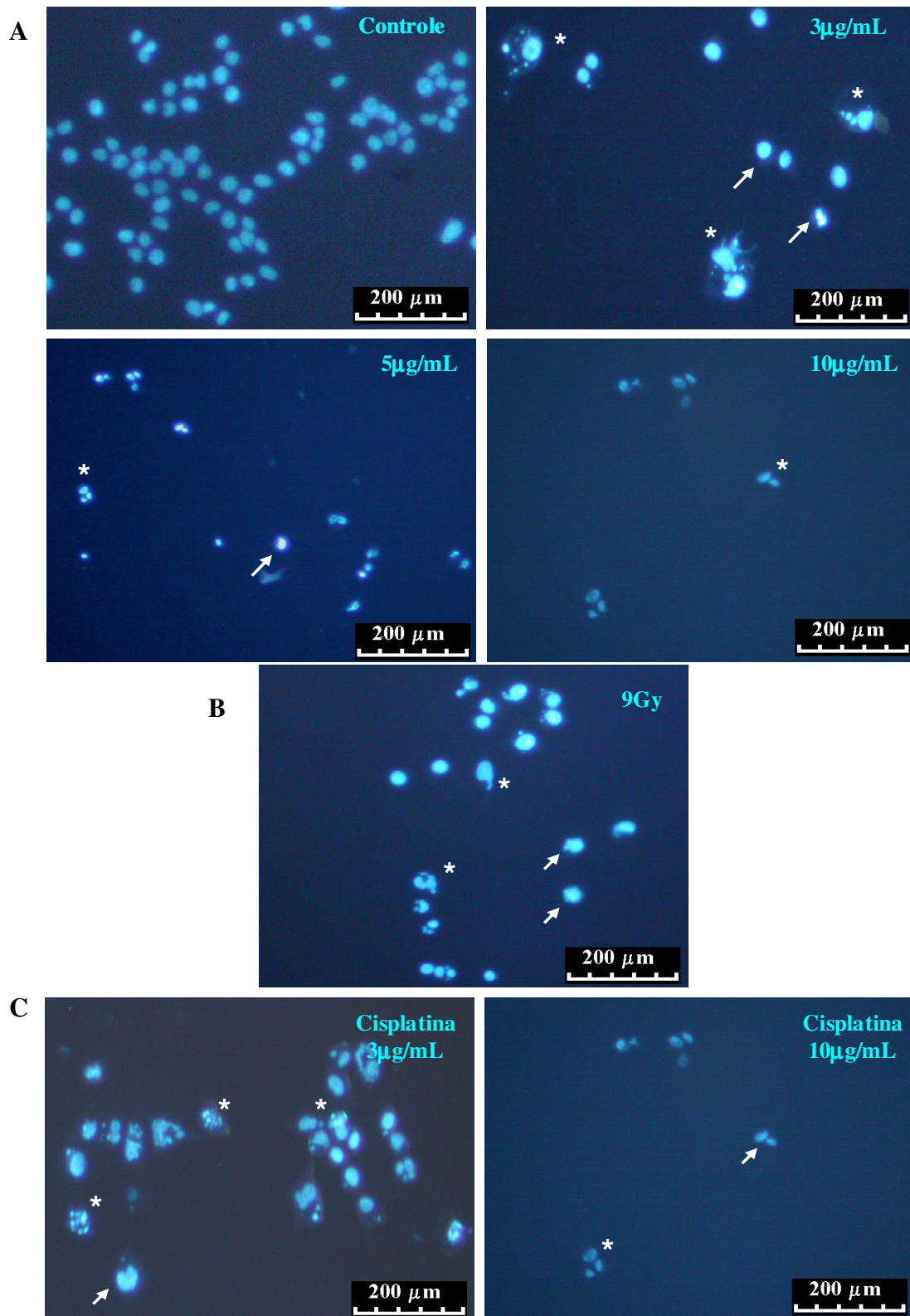


FIGURA 32: Apoptose induzida por PC, radiação gama e cisplatina (CTL+) em células RT2 visualizada através da coloração com DAPI. Células RT2 controles e tratadas com (A) PC (3-10µg/mL), (B) radiação gama (9Gy) e (C) cisplatina (3-10µg/mL). Setas indicam condensação da cromatina e asteriscos indicam corpos apoptóticos (Aumento100x).

5.2.4 Análise do ciclo celular das células tratadas com PC por citometria de fluxo

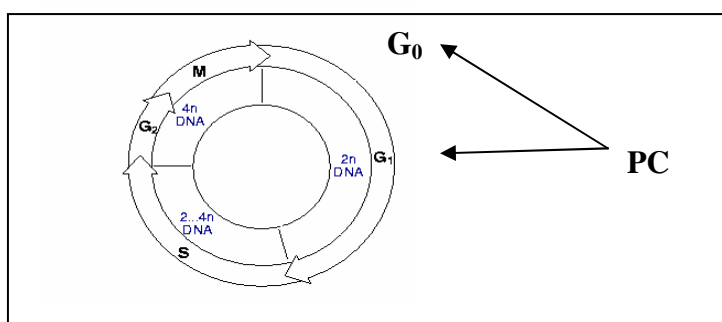
A análise do ciclo celular foi feita por citometria de fluxo, técnica que permite detectar o número de células presentes em cada fase do ciclo celular através da quantificação do DNA.

Células $2n$ são características das fases G_0 e G_1 do ciclo celular; células $4n$ são características das fases G_2 e M e aquelas células na fase de síntese apresentam o conteúdo de DNA maior que $2n$ e menor que $4n$. Células apoptóticas, com o DNA degradado, apresentam conteúdo de DNA inferior a $2n$, podendo ser classificadas como pertencentes ao grupo $subG_1$ e aquelas com o conteúdo de DNA superior a $4n$ são consideradas células polinucleadas.

Os tratamentos com as concentrações 5 e $10\mu\text{g/mL}$ de PC (48h) provocaram aumento significativo do número de células GH3 (tumor benigno) apoptóticas ($subG_1$) (± 17 vezes maior do que as células controles, $p < 0,01$) (FIG. 33-A).

Em células RT2, tumor maligno, o tratamento com PC ($10\mu\text{g/mL}$) também provocou o aumento do número de células apoptóticas ($\pm 3,5$ vezes maior do que as células controles, $p < 0,01$). As células que não sofreram apoptose após o tratamento com PC se acumularam em G_1/G_0 , indicando uma parada no ciclo celular, a qual impediu a progressão das células no ciclo para as fases S, G_2 e M. A parada na fase G_1 do ciclo celular ocorreu, provavelmente, devido a uma tentativa de reparo dos danos causados pelo tratamento com PC. No entanto, esta tentativa de reparo parece não ser bem sucedida em tratamentos prolongados com PC, pois, como demonstrado pelo teste de citotoxicidade, todas as células RT2 morreram após 144h de tratamento com as concentrações 3- $10\mu\text{g/mL}$ de PC (FIG. 21).

As células RT2 tratadas com cisplatina (CTL+) acumularam em G_2/M ($3\mu\text{g/mL}$) e G_1/G_0 ($5\mu\text{g/mL}$). Em ambas as linhagens o número de células apoptóticas, tratadas com cisplatina, aumentou de maneira dose-dependente (FIG. 33 C e D).



Desenho esquemático identificando as fases do ciclo onde as células RT2 se acumulam, após o tratamento com PC.

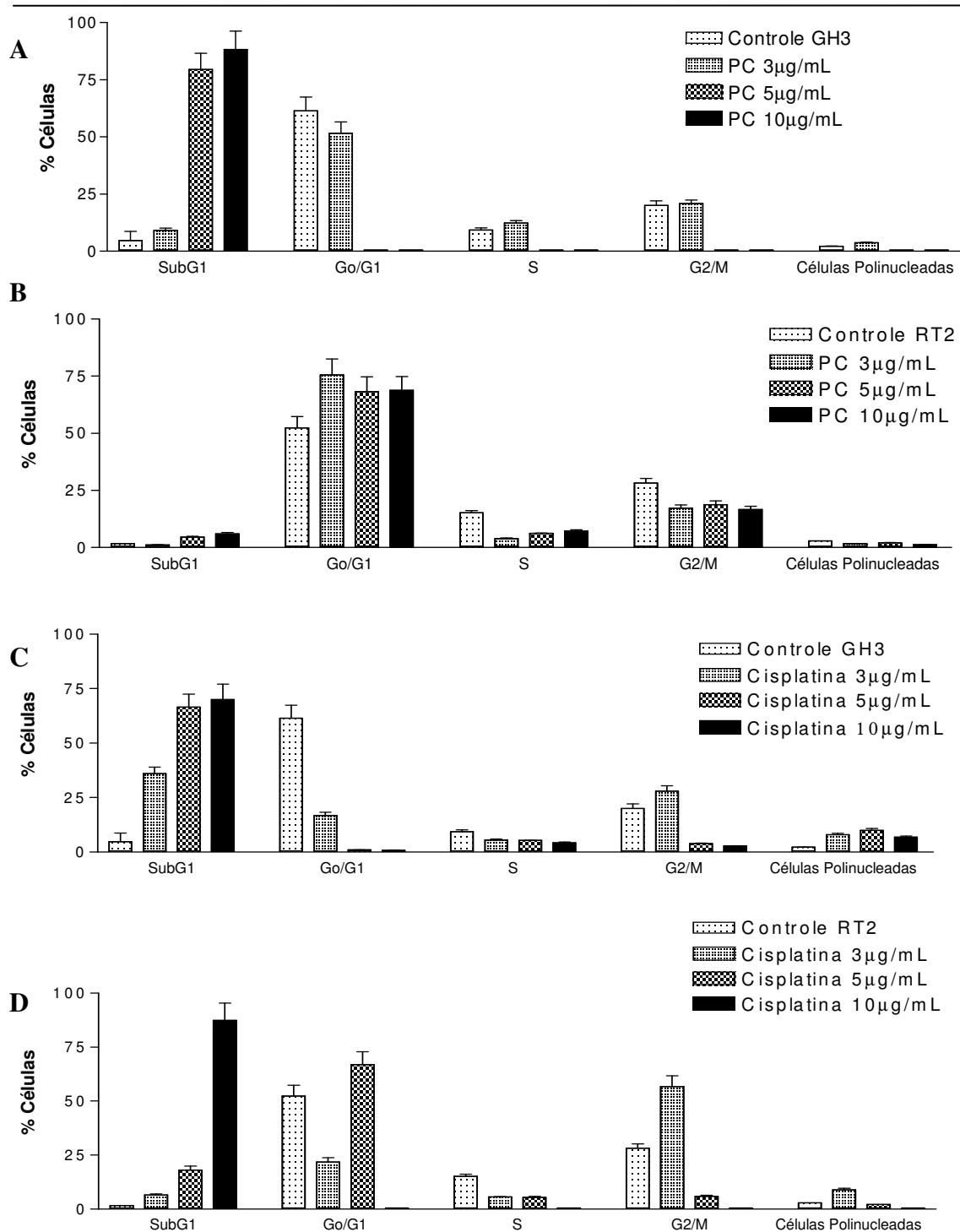


FIGURA 33: Análise do ciclo celular de células tratadas com PC e cisplatina (CTL+). **A-** Células GH3 controles e tratadas com PC (3-10µg/mL) **B-** Células RT2 controles e tratadas com PC (3-10µg/mL) **C-** Células GH3 controles e tratadas com cisplatina (3-10µg/mL) **D-** Células RT2 controles e tratadas com cisplatina (3-10µg/mL). As fases do ciclo celular foram determinadas pela quantificação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo (FACScan – Beckton Dickson – Fluorocromo: Iodeto de propídio) (n=3).

5.2.5 Análise do sobrenadante das células tratadas com PC por eletroforese (SDS-PAGE) e Zimografia

A análise do sobrenadante das células controles e tratadas com PC foi feita com o objetivo de identificar as proteínas excretadas pelas células após o tratamento e caracterizá-las quanto à atividade enzimática.

Após tratamento de 24h com PC, o sobrenadante das células GH3 e RT2 foi analisado quanto ao conteúdo protéico, por eletroforese em gel de poliacrilamida, e quanto à presença de atividade gelatinolítica, por zimografia (FIG. 34).

Aparentemente, o tratamento com PC não induziu liberação de nenhuma proteína adicional em relação ao controle. Nas condições utilizadas, apenas uma proteína de ~116kDa foi identificada no sobrenadante de células controles e tratadas com PC. Essa proteína, no entanto, não apresentou atividade gelatinolítica em nenhum dos pH's testados.

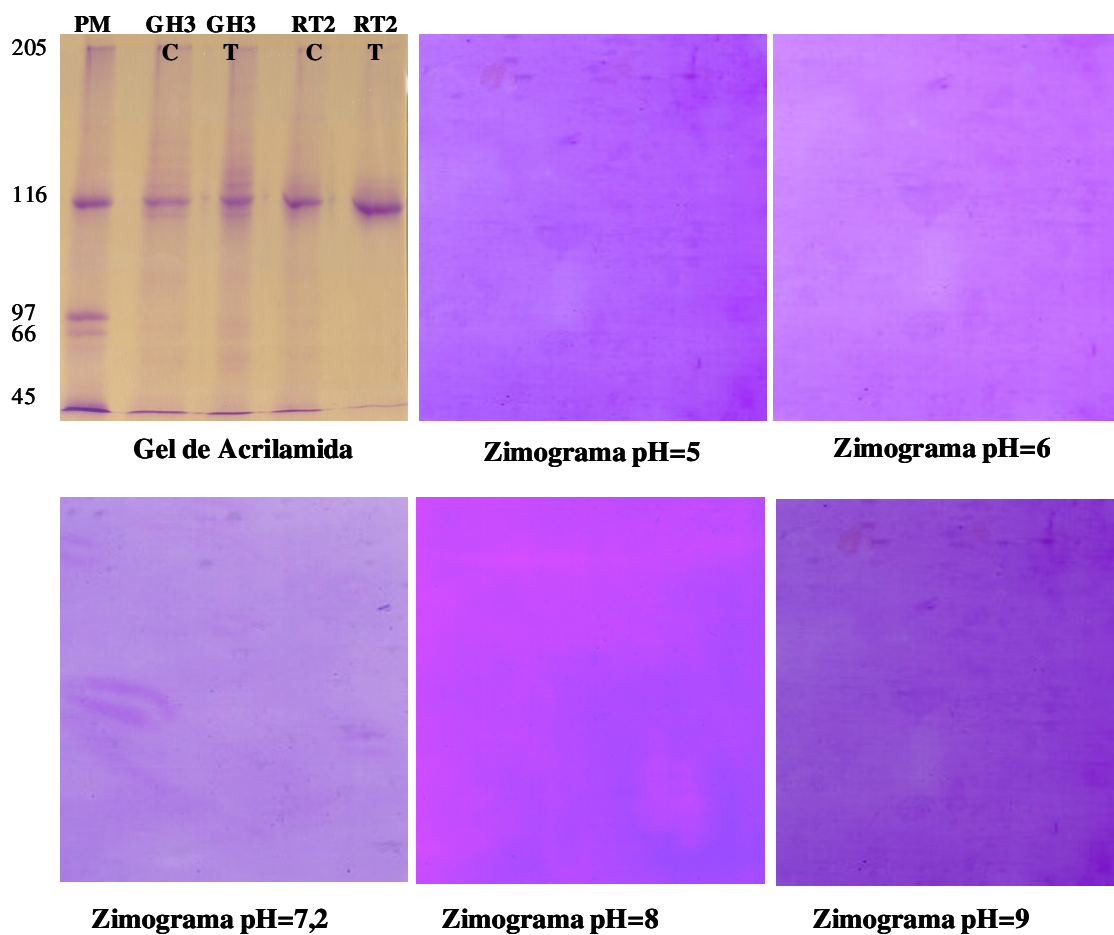


FIGURA 34: Análise do sobrenadante das células GH3 e RT2 tratadas com PC, em gel de acrilamida (SDS/PAGE) e Zimografia (SDS/PAGE-Gelatina). Células GH3 e RT2 foram tratadas com 10 μ g/mL de PC durante 24h e, após tratamento, foram lavadas e incubadas durante 48h em meio sem soro. Posteriormente o meio sobrenadante foi coletado, dialisado, liofilizado e as proteínas presentes foram analisadas em gel de acrilamida (SDS/PAGE) e Zimografia (SDS/PAGE-Gelatina). O tratamento com PC não induziu a produção e liberação de nenhuma proteína adicional. Apenas uma proteína de ~116kDa foi identificada no sobrenadante de células controles e tratadas com PC. Essa proteína, no entanto, não apresentou atividade gelatinolítica em nenhum dos pH's testados.

5.2.6 Avaliação da influência do SFB e do Ca^{+2} na atividade antitumoral da PC

Como observado na FIG. 33, as células GH3 e RT2 controles se apresentam principalmente nas fases G_1 , S e G_2 do ciclo celular, indicando que elas estão proliferando ativamente. Na ausência de estímulo do crescimento (ausência de soro), células em G_1 saem do ciclo celular e ficam estacionadas em G_0 (fase de quiescência), podendo voltar ao ciclo desde que haja estímulo de crescimento. Para avaliar se o efeito antitumoral da PC é ciclo específico, células GH3 e RT2 foram incubadas, durante 24 horas, com PC (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na ausência de SFB (DMEM sem soro). Após o tratamento, a taxa de sobrevivência das células foi avaliada através teste do MTT.

O efeito antitumoral da PC sobre as células GH3 e RT2 foi dependente da presença de fatores de crescimento (SFB). Na ausência de soro, o efeito da PC foi cerca de 45% menor ($p < 0,05$) (FIG. 35). Este resultado sugere que a PC age de maneira ciclo específica (mais eficaz em células que estão proliferando ativamente). No entanto, a possibilidade da PC atuar na fase G_0 não pode ser descartada, uma vez que apesar de menos potente, PC não perdeu sua atividade antitumoral.

A peçonha de *Crotalus durissus terrificus* possui proteínas com atividade fosfolipásica secretória (sFLA2), enzima que requer concentrações de Ca^{+2} na faixa de micromolar para sua atividade (AKIBA et al., 2004). Com a finalidade de avaliar a influência das sFLA2 na atividade antitumoral da PC, células GH3 e RT2 foram incubadas, durante 24 horas, com PC (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na ausência de Ca^{+2} (PBS + SFB). Após o tratamento, a taxa de sobrevivência das células foi avaliada através teste do MTT.

O efeito antitumoral da PC foi parcialmente dependente de cálcio apenas sobre as células RT2. Na ausência de cálcio, o efeito da PC sobre essas células foi cerca de 135% menor ($p < 0,01$) (FIG. 35).

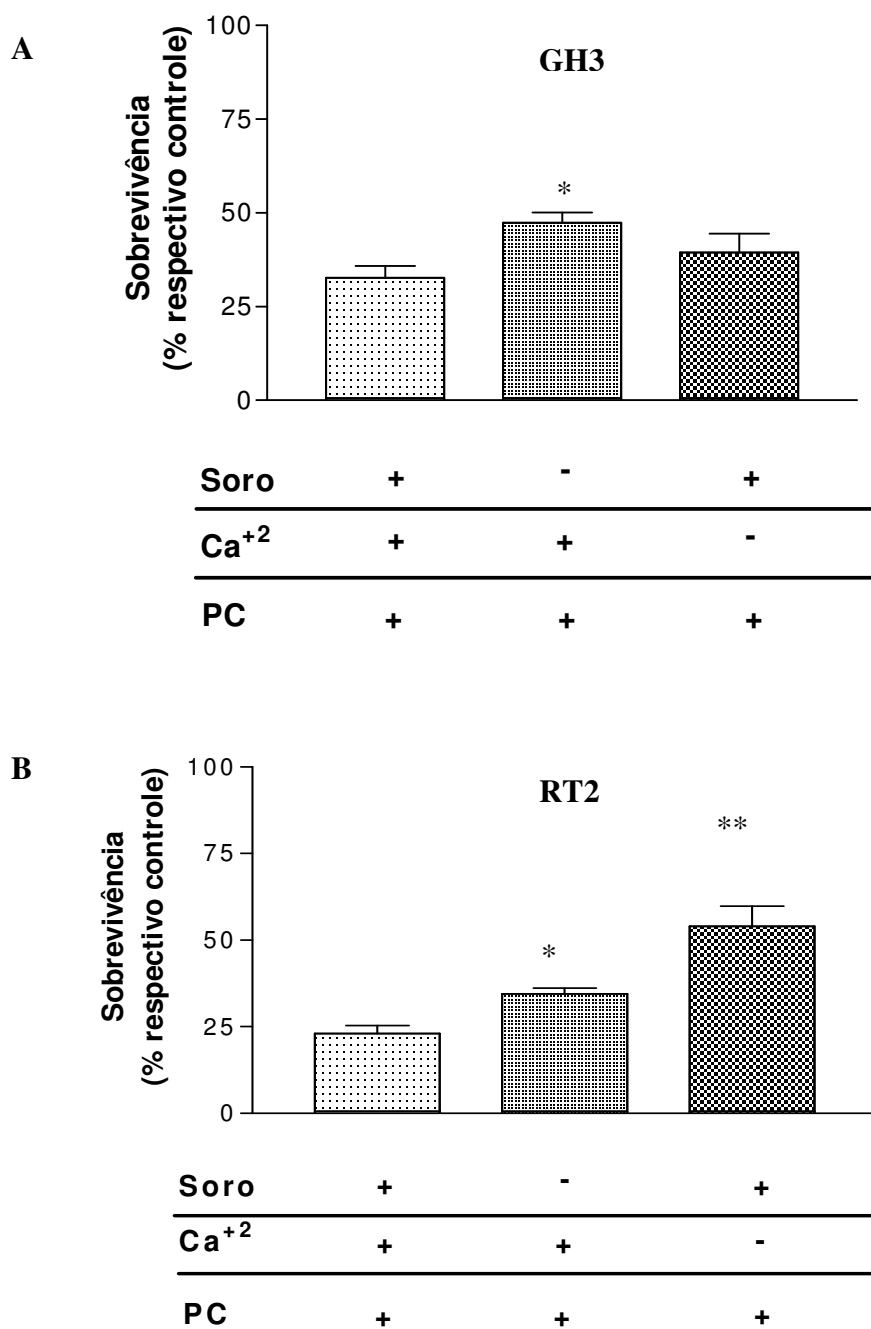


FIGURA 35: Avaliação da influência do Ca⁺² e SFB na atividade da PC. Células GH3 e RT2 foram tratadas com 10µg/mL de PC na presença e ausência de Ca⁺² e SFB. Após o tratamento, a taxa de sobrevivência das células GH3 (A) e RT2 (B) foi avaliada através do teste do MTT. Em células GH3 a atividade da PC foi reduzida apenas na ausência de soro. Em células RT2, atividade da PC foi reduzida tanto na ausência de Ca⁺² como na ausência de SFB. (n=3) (* p<0,05 ** p<0,01, em relação ao controle).

5.3 Avaliação da atividade gelatinolítica da PC

As metaloproteases estão presentes em peçonhas de várias serpentes e podem inibir a adesão celular através da degradação das proteínas da matriz extracelular (CALVETE, 2003).

A avaliação da presença de metaloproteases na PC, com capacidade de degradar colágeno desnaturado (gelatina), foi feita por zimografia em gel SDS-PAGE-Gelatina. O perfil protéico da PC foi observado paralelamente em gel SDS-PAGE para avaliar o peso molecular das proteínas com atividade enzimática.

Duas bandas protéicas com atividade gelatinolítica foram identificadas e o pH ótimo para a atividade enzimática dessas proteínas foi maior ou igual a 7,2 (FIG. 36).

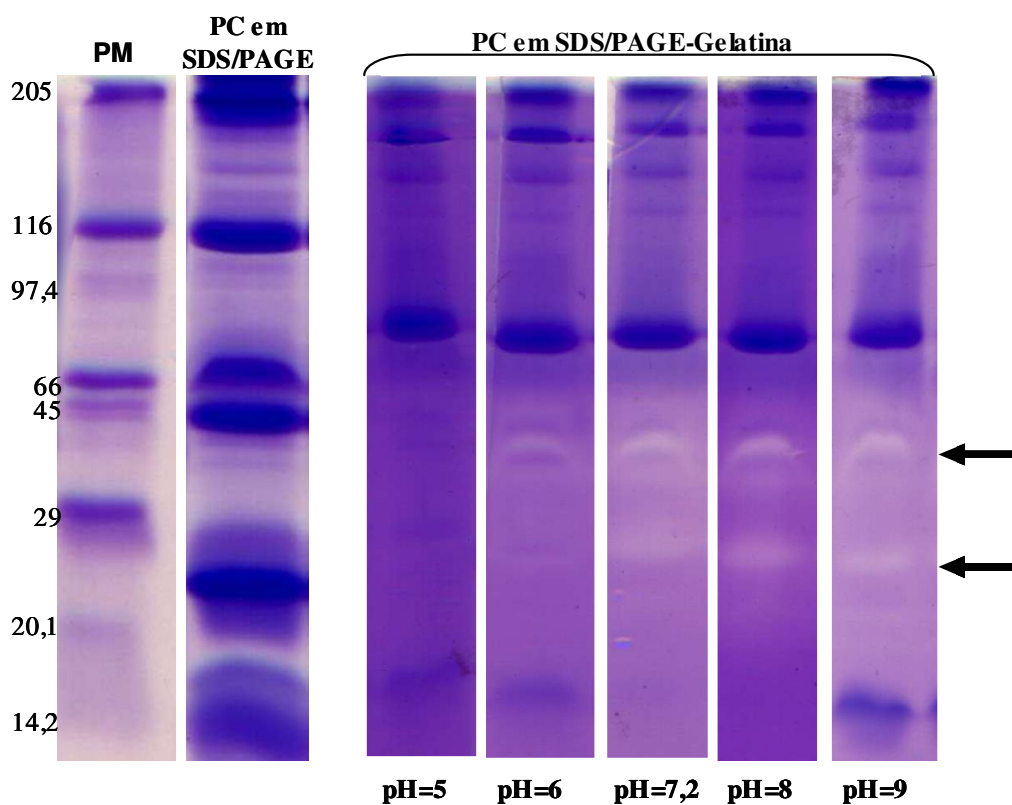


FIGURA 36: Perfil protéico da PC e avaliação da sua atividade gelatinolítica. As amostras de PC (40 μ g) foram aplicadas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), para avaliação do seu perfil eletroforético, e em gel SDS-PAGE-Gelatina para identificação da sua atividade gelatinolítica. Foram identificadas duas bandas protéicas com atividade gelatinolítica (pH ótimo \geq 7,2).

5.4 Avaliação do potencial radiosensibilizador da PC

Uma das estratégias terapêuticas para tumores é a utilização de radiosensibilizadores, agentes químicos que aumentam a sensibilidade das células à radiação, tornando o tratamento radioterápico mais eficaz (SALVAJOLI et al., 1999).

Para avaliar do potencial radiosensibilizador da PC, células GH3 e RT2 foram tratadas com PC, durante 24h e submetidas à radiação gama (3-12Gy). Após 48h do tratamento com radiação, os testes de citotoxicidade (MTT) e de análise das alterações morfológicas do DNA cromossomal foram realizados.

A concentração 2µg/mL foi bastante eficiente como neo-adjuvante na radioterapia de células GH3. O tratamento com 2µg/mL e 6Gy de radiação gama foi cerca de 57% mais eficiente na redução do número de células vivas, do que os tratamentos individuais com PC ou radiação gama (FIG. 37).

Uma concentração maior de PC foi necessária para radiosensibilizar as células RT2. O tratamento com 5µg/mL e 3Gy de radiação gama foi 26% mais eficiente na redução do número de células vivas, do que o tratamento individual com PC e cerca de 66% mais eficiente do que o tratamento individual com radiação gama (FIG. 38).

Células GH3 e RT2, submetidas ao tratamento combinado com PC e radiação gama, apresentaram alterações morfológicas nucleares semelhantes àsquelas induzidas pelo tratamento individual com PC ou radiação gama: condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos (FIG. 39).

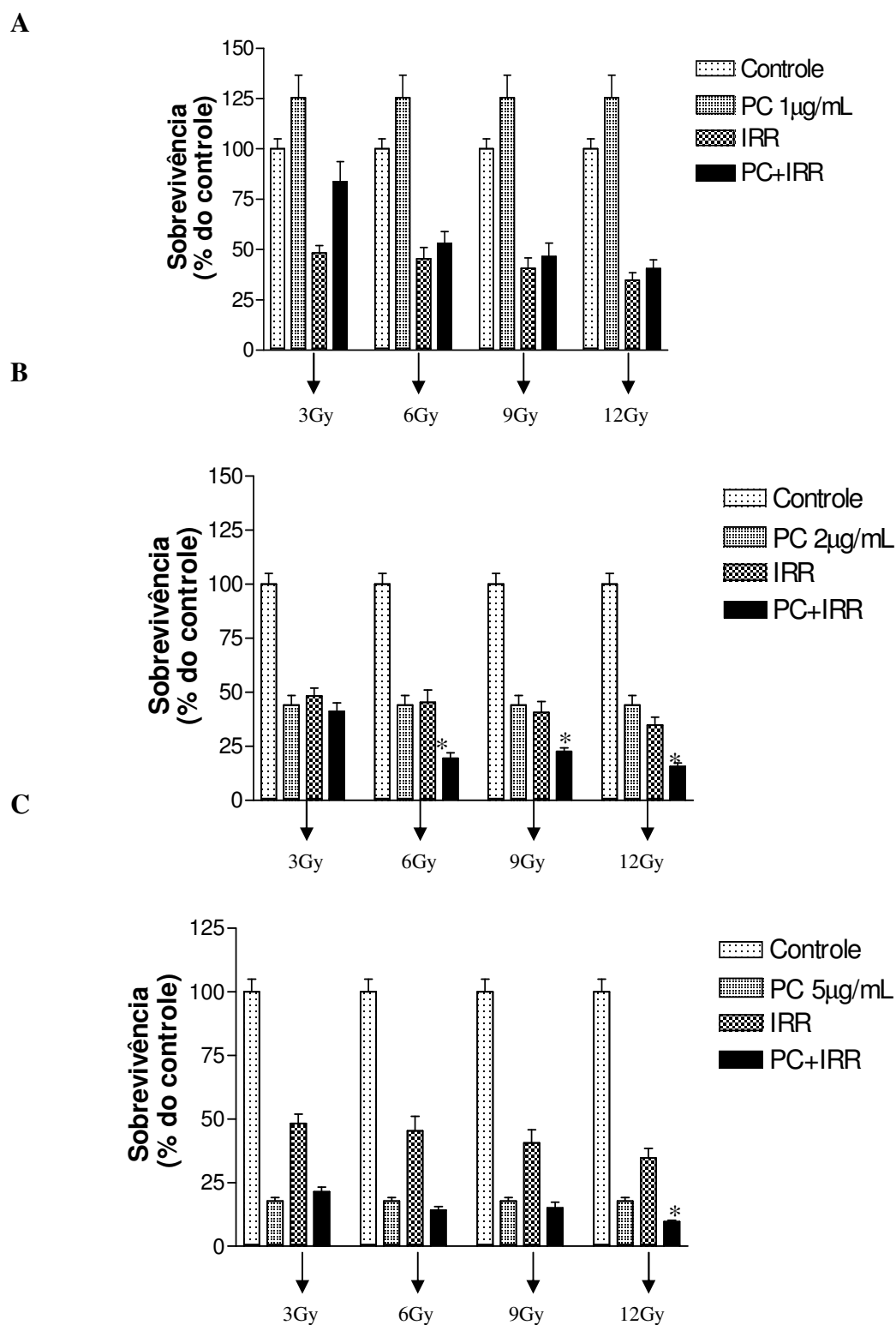


FIGURA 37: Avaliação do potencial radiosensibilizador da PC em células GH3. Sobrevivência das células GH3 pré-tratadas por 24h com PC **A-**(1µg/mL) **B-** (2µg/mL) **C-** (5µg/mL). (n=3), (*p<0,01 em relação ao tratamento isolado com PC ou IR).

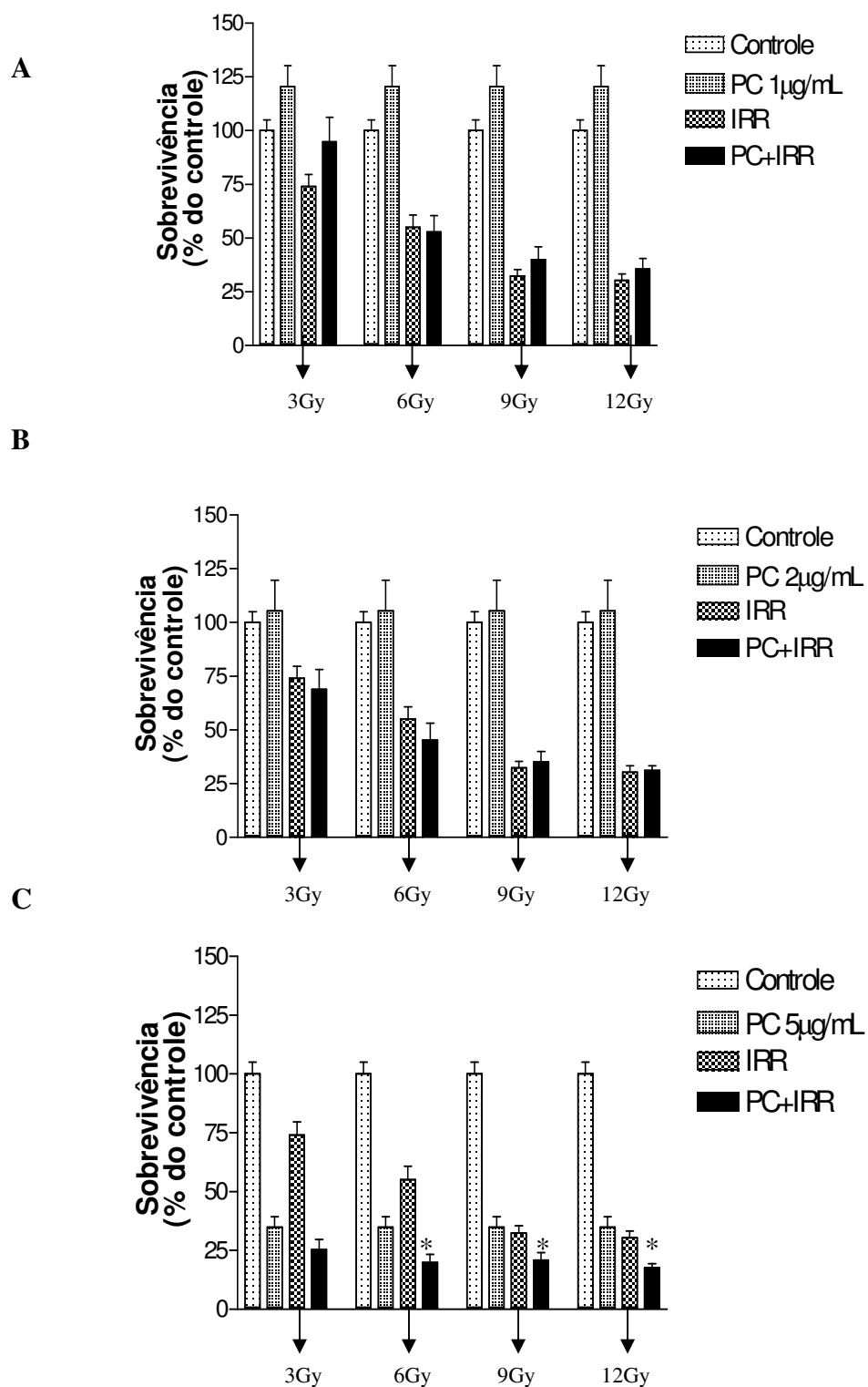
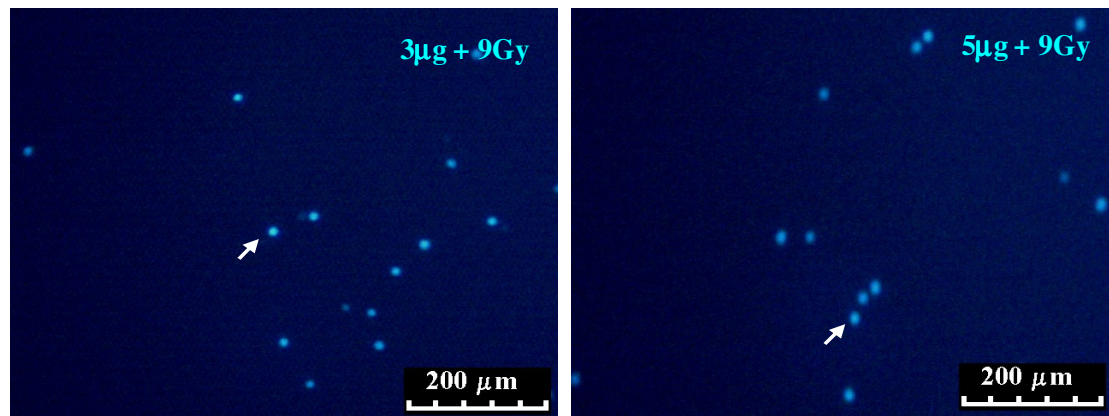


FIGURA 38: Avaliação do potencial radiosensibilizador da PC em células RT2. Sobrevivência das células RT2 pré-tratadas por 24h com PC **A-**(1µg/mL) **B-** (2µg/mL) **C-**(5µg/mL). (n=3), (*p<0,01 em relação ao tratamento isolado com PC ou IR).

A – GH3



B – RT2

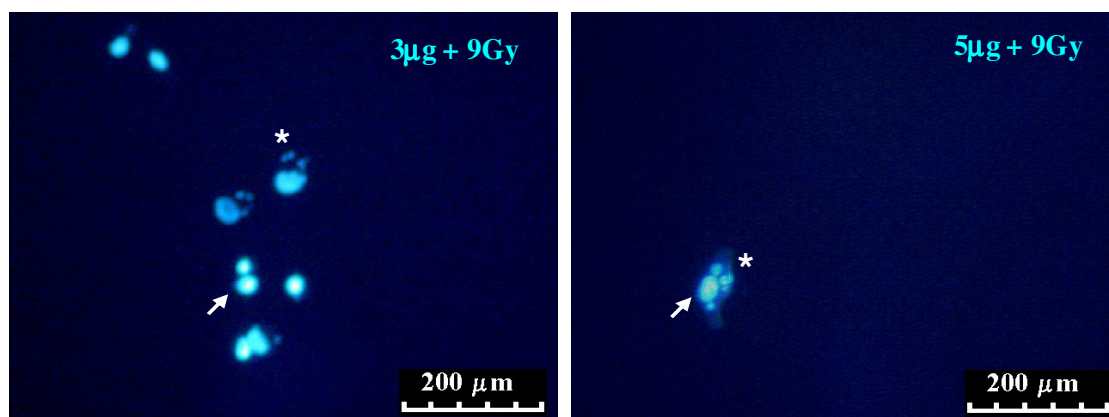


FIGURA 39: Apoptose induzida pelo tratamento combinado de PC e radiação gama, visualizada através da coloração com DAPI. Células GH3 (A) e RT2 (B) pré-tratadas por 24h com PC (3 e 5µg/mL) e submetidas à radiação gama (9Gy). Setas indicam condensação da cromatina e asteriscos indicam corpos apoptóticos (Aumento:100x).

5.5 Avaliação da toxicidade aguda produzida pela administração da dose antitumoral da PC estabelecida *in vitro*

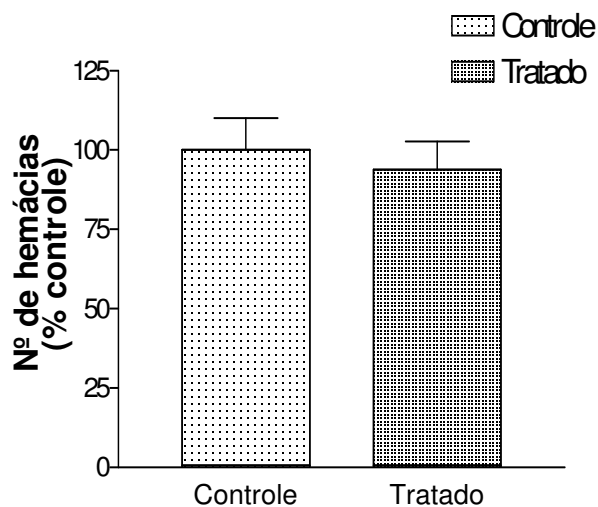
A dose antitumoral da PC, estabelecida *in vitro*, foi calculada, em μg da PC por mm^2 de área tratada, a partir do IC_{50} do teste MTT, após 24 horas de tratamento ($3\mu\text{g}/\text{mL}$) (FIG. 21).

Considerando que cada poço de uma placa de 96 poços (utilizada para o teste MTT) comporta um volume de $200\mu\text{L}$ e possui uma área de $38,48\text{mm}^2$, a concentração $3\mu\text{g}/\text{mL}$, nesta placa, representa uma dose de $0,6\mu\text{g}$ da PC por poço, o que equivale à uma concentração final de $0,016\mu\text{g}/\text{mm}^2$. Baseado nestes cálculos, a dose antitumoral da PC *in vitro* foi estabelecida como sendo $0,016\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de massa tumoral.

Depois de calculada, a dose antitumoral da PC, estabelecida *in vitro*, foi injetada em camundongos em uma simulação de tratamento intratumoral de um tumor de 18mm^2 . Após 24 horas da injeção, os animais tiveram seu sangue extraído para posterior avaliação das alterações bioquímicas e hematológicas induzidas pelo tratamento. As análises histopatológicas dos órgãos (fígado, rim, pulmão, coração e cérebro) dos animais tratados também foram feitas.

Os resultados obtidos mostraram que o número de células sanguíneas dos animais tratados permaneceu equivalente ao dos animais do grupo controle (FIG. 40). Além disso, as concentrações plasmáticas de fosfatase alcalina, albumina, proteínas totais, uréia e creatina quinase não foram significativamente alteradas pelo tratamento com PC (FIG. 41) e nenhuma alteração histopatológica aparente foi observada nos órgãos dos animais tratados (FIG. 42).

A



B

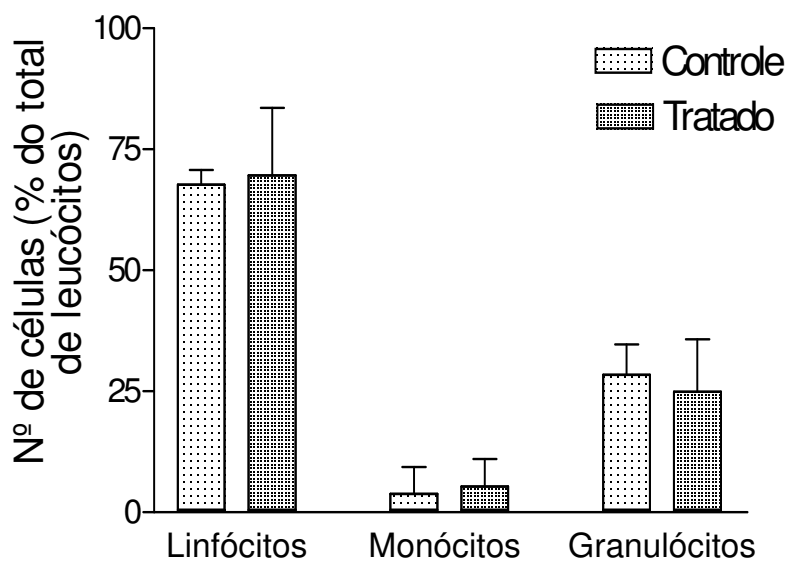


FIGURA 40: Análise das alterações hematológica induzidas pelo tratamento agudo com a dose antitumoral da PC, estabelecida *in vitro*. A- Contagem de hemácias dos animais controles e tratados com PC. **B-** Contagem de leucócitos dos animais controles e tratados com PC. O número de células sanguíneas dos animais tratados permaneceu equivalente ao dos animais do grupo controle (n=3) (p=0,27).

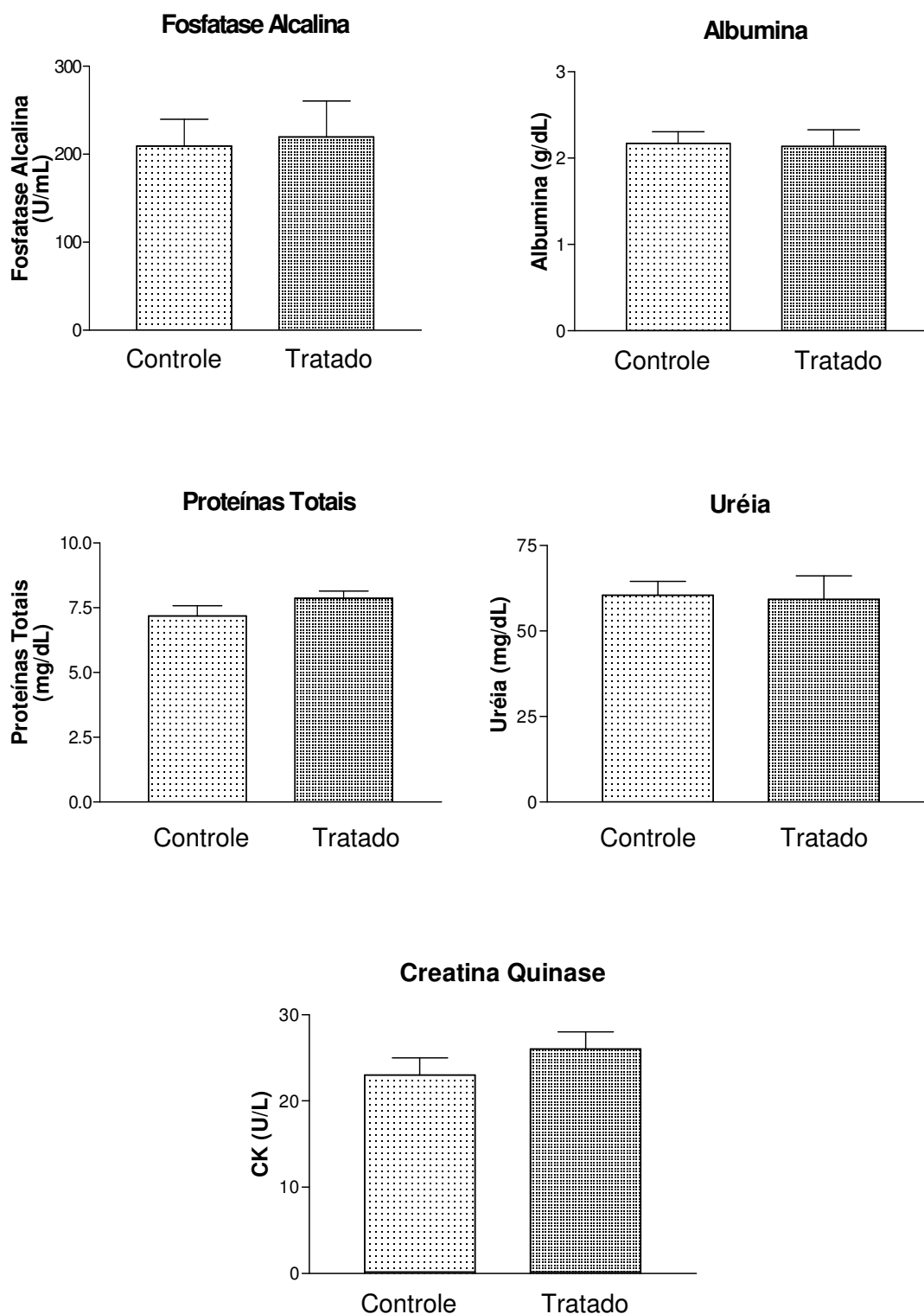


FIGURA 41: Análise das alterações bioquímicas induzidas pelo tratamento agudo com a dose antitumoral da PC, estabelecida *in vitro*. As concentrações plasmáticas de fosfatase alcalina, albumina, proteínas totais, uréia e creatina quinase não foram significativamente alteradas pelo tratamento com PC (n=3) (p=0,37).

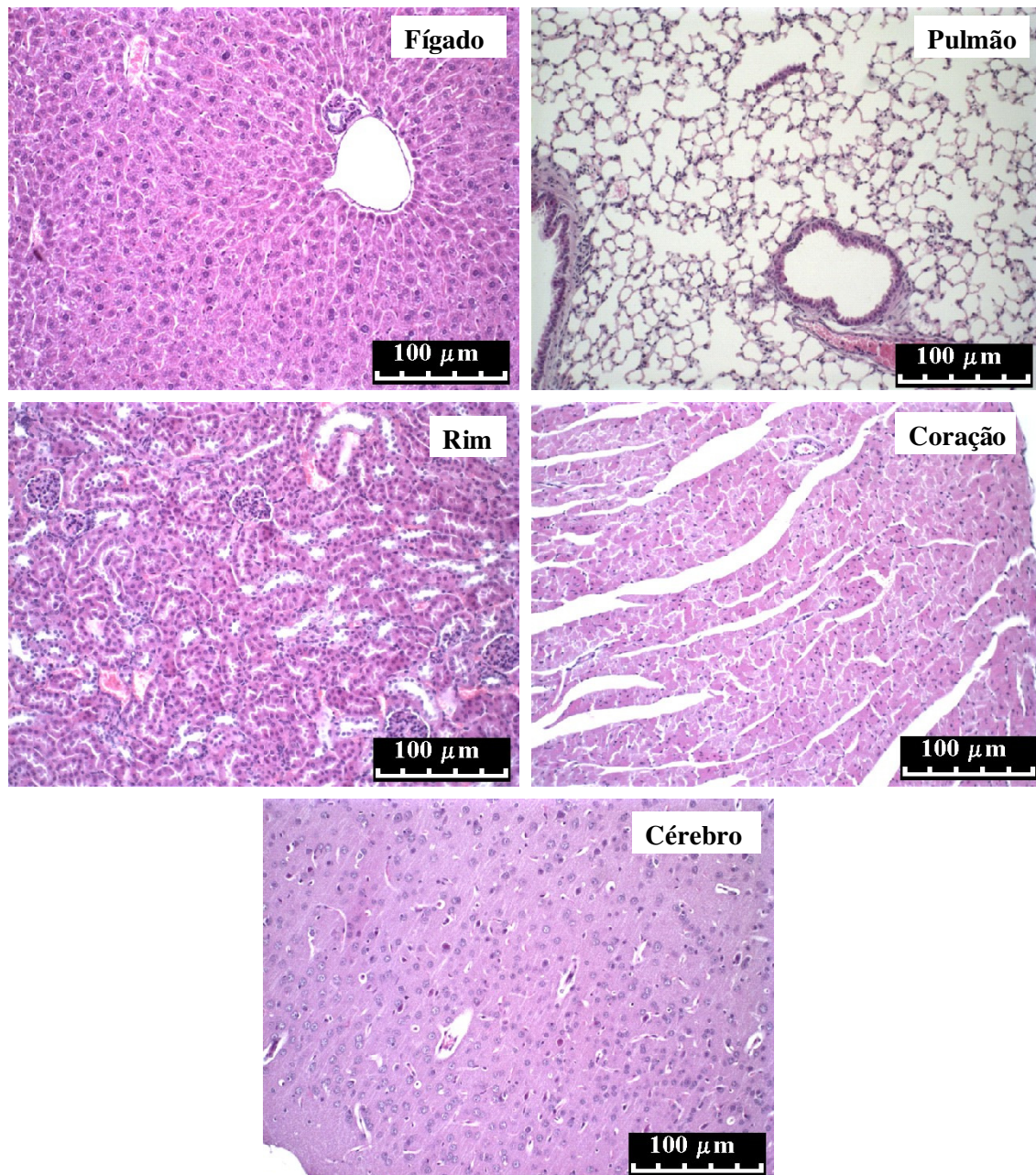


FIGURA 42: Fotomicrografia do fígado, pulmão, rim, coração e cérebro de um animal representativo do grupo tratado com a dose antitumoral da PC, estabelecida *in vitro* ($0,016\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de massa tumoral). Não foi observada nenhuma alteração morfológica aparente nos órgãos dos animais tratados com PC (Coloração H.E – Foto ao M.O – Aumento -200x).

5.6 Avaliação do papel da Crotoxina e da Crotamina no efeito antitumoral da PC

A Crotoxina (24kDa) e a Crotamina (4,8kDa) são os dois polipeptídeos mais abundantes na peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (68 e 17% do peso seco da PC, respectivamente). Para avaliar o papel desses dois polipeptídeos no efeito antitumoral da PC, testes de citotoxicidade (MTT) e análise morfológica celular e do DNA cromossomal foram feitos em células GH3 e RT2 tratadas com Crotoxina e Crotamina.

O tratamento de 144h com as concentrações 5×10^4 - 1×10^5 ng/mL (2 - 4 μ M) de Crotoxina, foi citotóxico para cerca de 14% das células GH3 ($p < 0,01$ em relação ao controle) (FIG. 43-A). Diferente das células GH3, as células RT2 foram resistentes à concentração 2 μ M de Crotoxina, no entanto, a citotoxicidade promovida pela concentração 4 μ M pôde ser verificada já após 48h de tratamento, onde cerca de 23% das células RT2 haviam morrido. Após 144h de tratamento com esta mesma concentração de Crotoxina, o efeito citotóxico para as células RT2 não foi diferente daquele observado após 48h de tratamento (FIG. 43-B).

A Crotamina foi mais eficiente na redução da sobrevivência das células de tumores cerebrais do que a Crotoxina. O tratamento de 48h com a concentração 2 μ M foi citotóxico para $\pm 12\%$ das células GH3 e $\pm 20\%$ das células RT2. O maior efeito citotóxico da Crotamina foi alcançado pelo tratamento de 144h com a concentração 1×10^5 ng/mL (20 μ M) que foi citotóxico para $\pm 80\%$ das células GH3 e $\pm 90\%$ das células RT2. (FIG. 44). Além de ter sido mais citotóxica para as células de tumores cerebrais, a Crotamina apresenta maior eficiência do ponto de vista terapêutico, uma vez que é cerca de 26 vezes menos tóxica do que a Crotoxina (DL_{50} *in vivo* da Crotamina e Crotoxina= 3,4 e 0,13mg/Kg, respectivamente - KARLSSON, 1979 - citado por: MANCIN et al., 1998; NOVAIS et al., 2006).

O tratamento com Crotamina (50 μ g/mL) induziu alterações morfológicas bastante visíveis nas duas linhagens de células estudadas. As células que ainda estavam vivas após 48 horas de tratamento, apresentaram alterações na membrana plasmática e redução do volume citoplasmático, todas características indicativas de apoptose. Células RT2 tratadas com Crotoxina (50 μ g/mL) também apresentaram protusões na membrana plasmática (FIG. 45).

Alterações morfológicas no DNA cromossomal (condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação dos *blebs*) das células tratadas com Crotoxina e Crotamina indicam que, assim como a PC, estas proteínas também induziram a morte apoptótica das células GH3 e RT2 (FIG. 46).

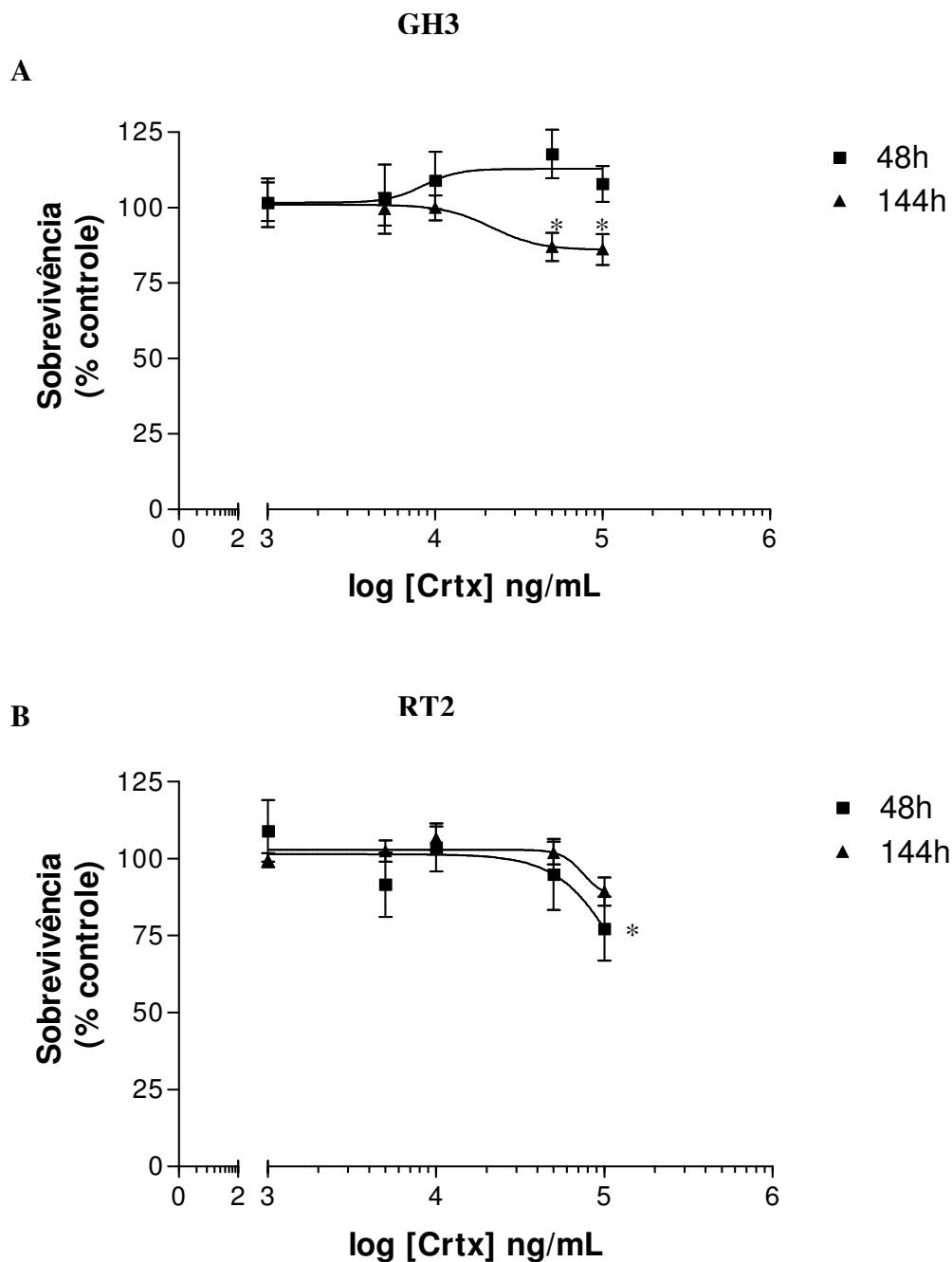


FIGURA 43: Avaliação do efeito citotóxico da Crotoxina para as células GH3 e RT2. Células GH3 e RT2 foram tratadas com diferentes concentrações de Crotoxina (1×10^3 - 1×10^5 ng/mL \sim 1-100 μ g/mL). A citotoxicidade da Crotoxina, após 48 e 144h de tratamento, foi avaliada através do teste MTT. Sobrevivência das células GH3 (A) e RT2 (B) tratadas com Crotoxina. Apenas as concentrações mais altas, 5×10^4 - 1×10^5 ng/mL (50 e 100 μ g/mL), foram citotóxicas para as células GH3 e RT2. (n=3) (* $p < 0,01$ em relação ao controle).

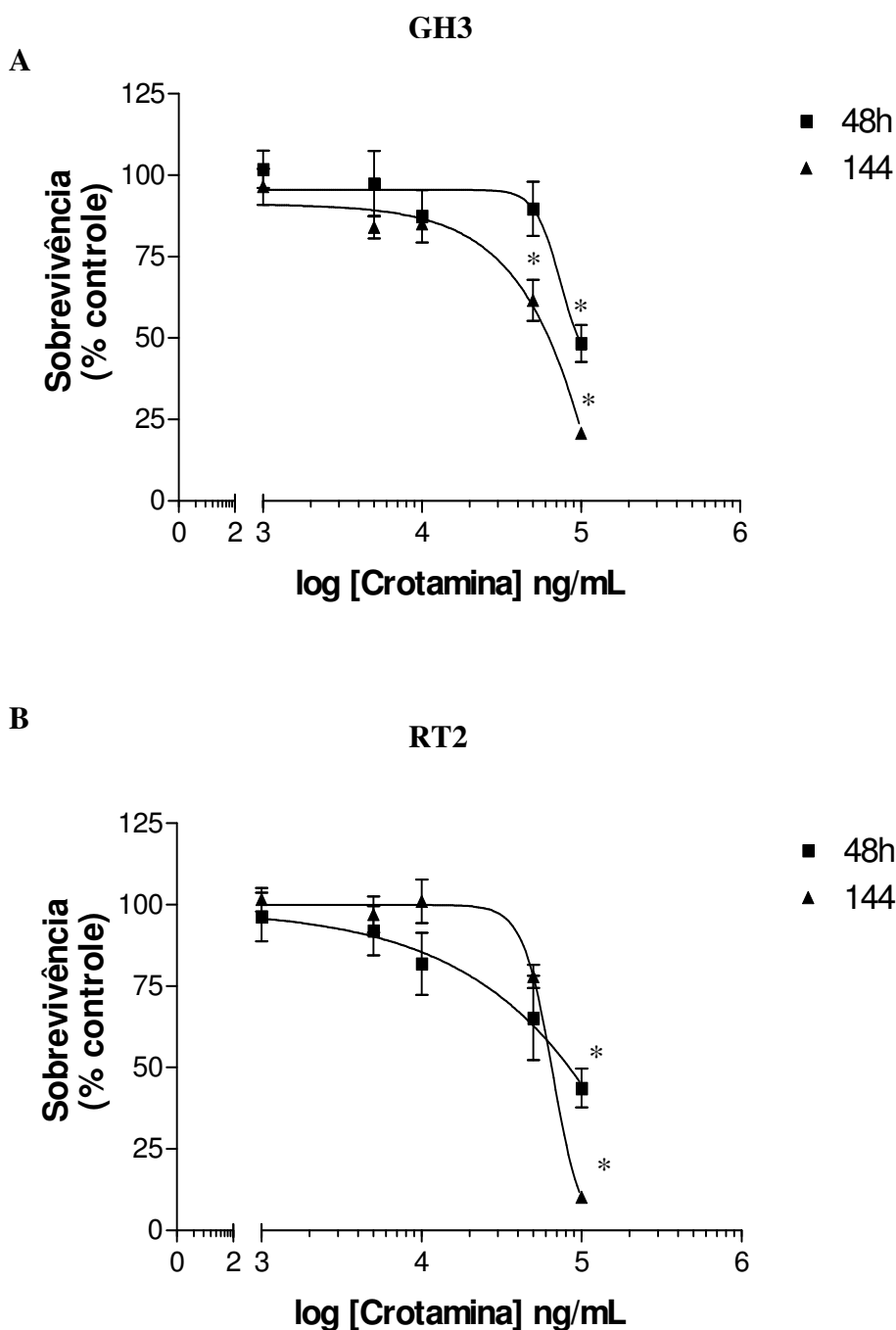
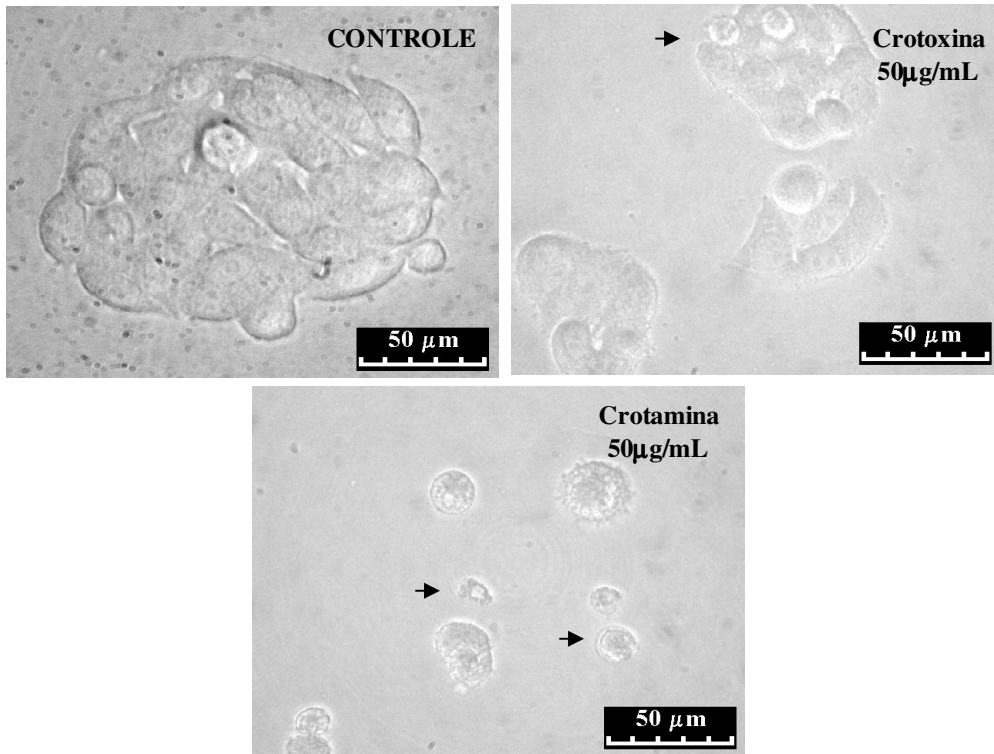


FIGURA 44: Avaliação do efeito citotóxico da Crotamina sobre as células GH3 e RT2. Células GH3 e RT2 foram tratadas com diferentes concentrações de Crotamina (1×10^3 - 1×10^5 ng/mL \sim 1-100 μ M). A citotoxicidade da Crotamina, após 48 e 144h de tratamento, foi avaliada através do teste MTT. Sobrevivência das células GH3 (**A**) e RT2 (**B**) tratadas com Crotamina. O maior efeito citotóxico da Crotamina foi alcançado pelo tratamento de 144h com a concentração 1×10^5 ng/mL (20 μ M) que foi citotóxico para $\pm 80\%$ das células GH3 e $\pm 90\%$ das células RT2. (n=3) (* $p < 0,01$ em relação ao controle).

A - GH3



B - RT2

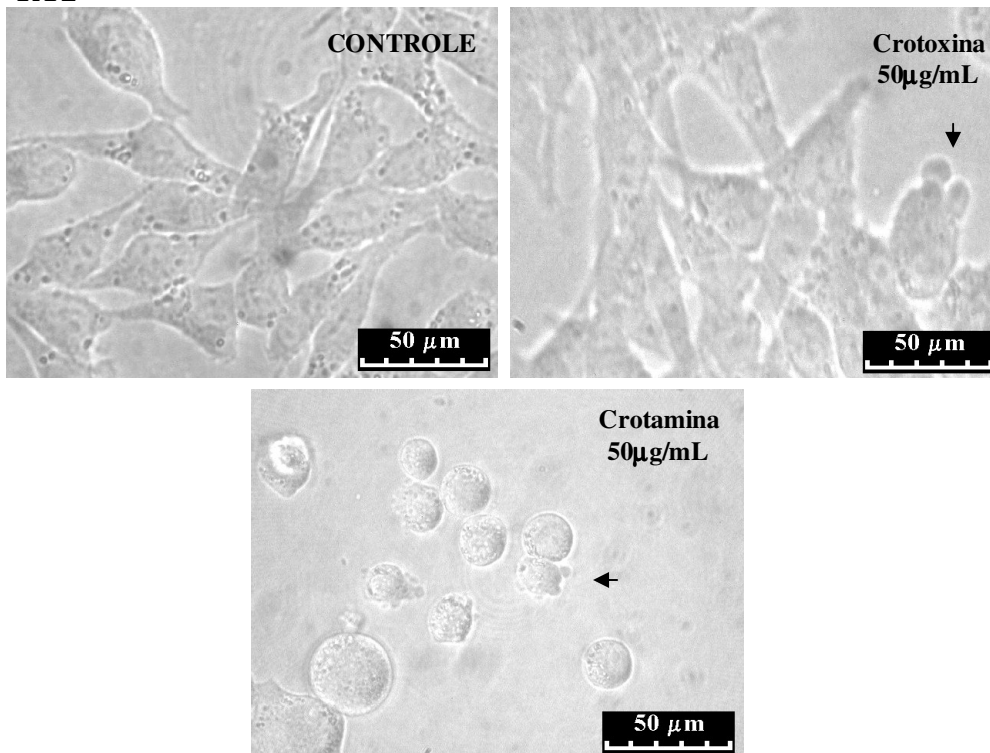
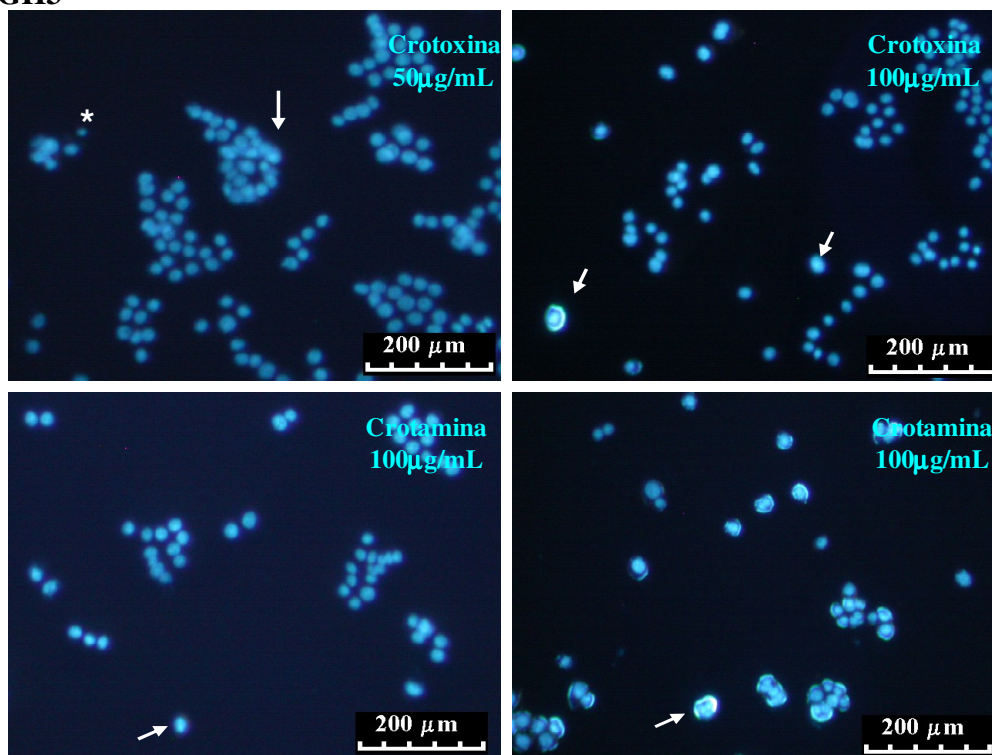


FIGURA 45: Fotomicrografia das células GH3 e RT2 tratadas com Crotoxina e Crotamina. Células GH3 (A) e RT2 (B) controles e tratadas com Crotoxina e Crotamina (50 $\mu\text{g/mL}$) - (M.O –Aumento 400x - Nikon).

A – GH3



B – RT2

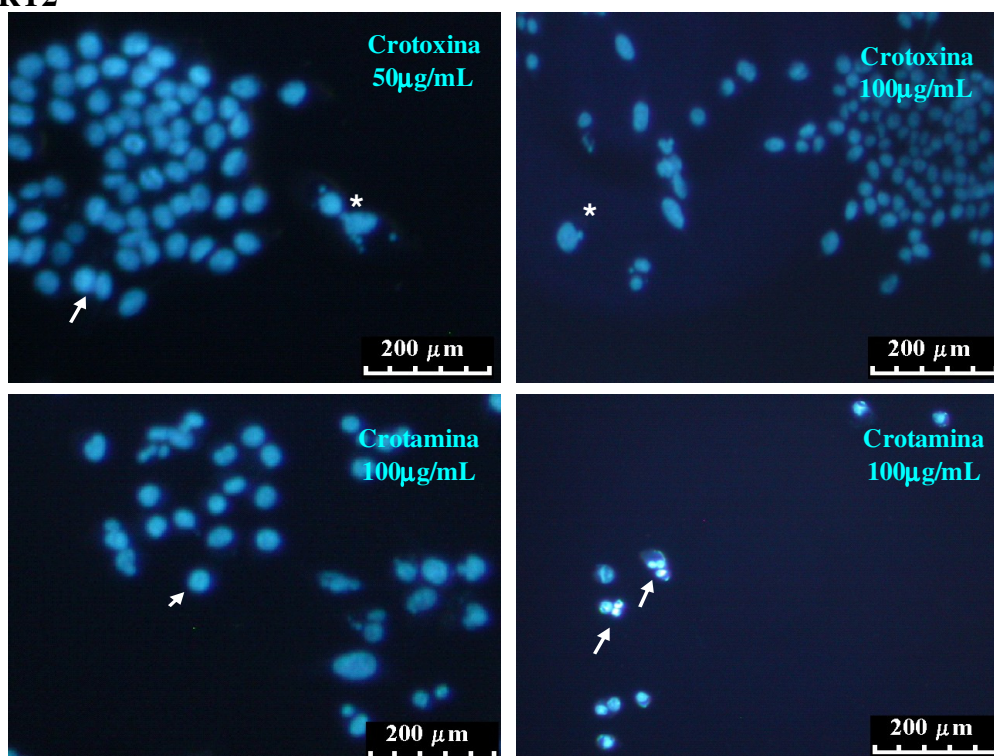


FIGURA 46: Apoptose induzida pela Crotoxina e Crotamina em células GH3 e RT2, visualizada pela coloração com DAPI. Células GH3 (A) e RT2 (B) tratadas com Crotoxina e Crotamina (50-100µg/mL). Setas indicam condensação da cromatina e asteriscos indicam corpos apoptóticos (Aumento 100x).

5.7 Síntese de sonda radioativa da Crotoxina e da Crotamina, utilizando ^{125}I como radiotraçador, para estudos de interação com células tumorais *in vitro* e biodistribuição em animais com tumor de Ehrlich

5.7.1 Síntese de sonda radioativa da Crotoxina e da Crotamina utilizando ^{125}I como radiotraçador

Com o objetivo de avaliar a interação dos polipeptídeos presentes na PC com as células tumorais, sondas radioativas de Crotoxina e Crotamina foram sintetizadas utilizando o radioisótopo ^{125}I como radiotraçador. Estas sondas foram utilizadas em estudos de interação *in vitro* e biodistribuição em animais com tumor de Ehrlich.

A reação de radioiodação, ao contrário da tritiação, consiste em um processo de marcação não isotópica, onde ocorre a introdução de um elemento “estranho” na molécula, podendo causar a ruptura da mesma e/ou perda da sua função. Por este motivo, a síntese da sonda radioativa foi realizada de maneira a permitir a incorporação do radioisótopo apenas em concentração traço, preservando, assim, a atividade biológica dos polipeptídeos radiomarcados. Dessa maneira, foi possível a obtenção de sondas radioativas com altas atividades específicas (TAB. 4) na ordem de compostos radioativos disponíveis comercialmente.

A preservação da atividade biológica das proteínas radiomarcadas foi confirmada pela interação com sinaptossomas cerebrais de rato (Item 5.7.2).

TABELA 4: Síntese de sondas radioativas da Crotoxina e Crotamina utilizando ^{125}I como radiotraçador

Molécula	Eficiência da síntese das sondas radioativas	Atividade específica
^{125}I -Crotoxina	90%	163,3Ci/mmol – 6×10^{12} Bq/mmol ($6,8 \times 10^{-6}$ Ci/ μg – $2,5 \times 10^5$ Bq/ μg)
^{125}I -Crotamina	97%	616,12Ci/mmol – $2,3 \times 10^{13}$ Bq/mmol ($1,27 \times 10^{-4}$ Ci/ μg – $4,7 \times 10^6$ Bq/ μg)

5.7.2 Estudo da interação, *in vitro*, da Crotoxina e da Crotamina radiomarcadas com alvos presentes na membrana das células tumorais

O estudo da interação dos polipeptídeos radiomarcados com os receptores de membrana das células de glioblastoma murino foi feito incubando-se as células íntegras com 10^{-10} M de ^{125}I -Ctx ou ^{125}I -Crotamina na ausência (ligação total) ou presença (ligação não específica) de um excesso dos polipeptídeos não radiomarcados. O estudo de interação também foi feito em sinaptossomas de cérebro de rato (P2) (controle de células cerebrais não tumorais) e em células de tumor de Ehrlich (modelo tumoral animal já padronizado, feito em colaboração com o laboratório de Patologia Comparada do ICB/UFMG).

Os resultados obtidos mostram que tanto a Crotoxina quanto a Crotamina apresentaram maior ligação em sítios específicos das células de glioblastoma do que em sinaptossomas de cérebro de rato. Além disso, a Crotoxina apresentou maior ligação específica em células tumorais do que a Crotamina: Ctx apresentou $\pm 90\%$ ligação específica em células RT2 e Ehrlich e Crota apresentou $\pm 50\%$ ligação específica em RT2 e $\pm 23\%$ ligação específica em Ehrlich (FIG. 47).

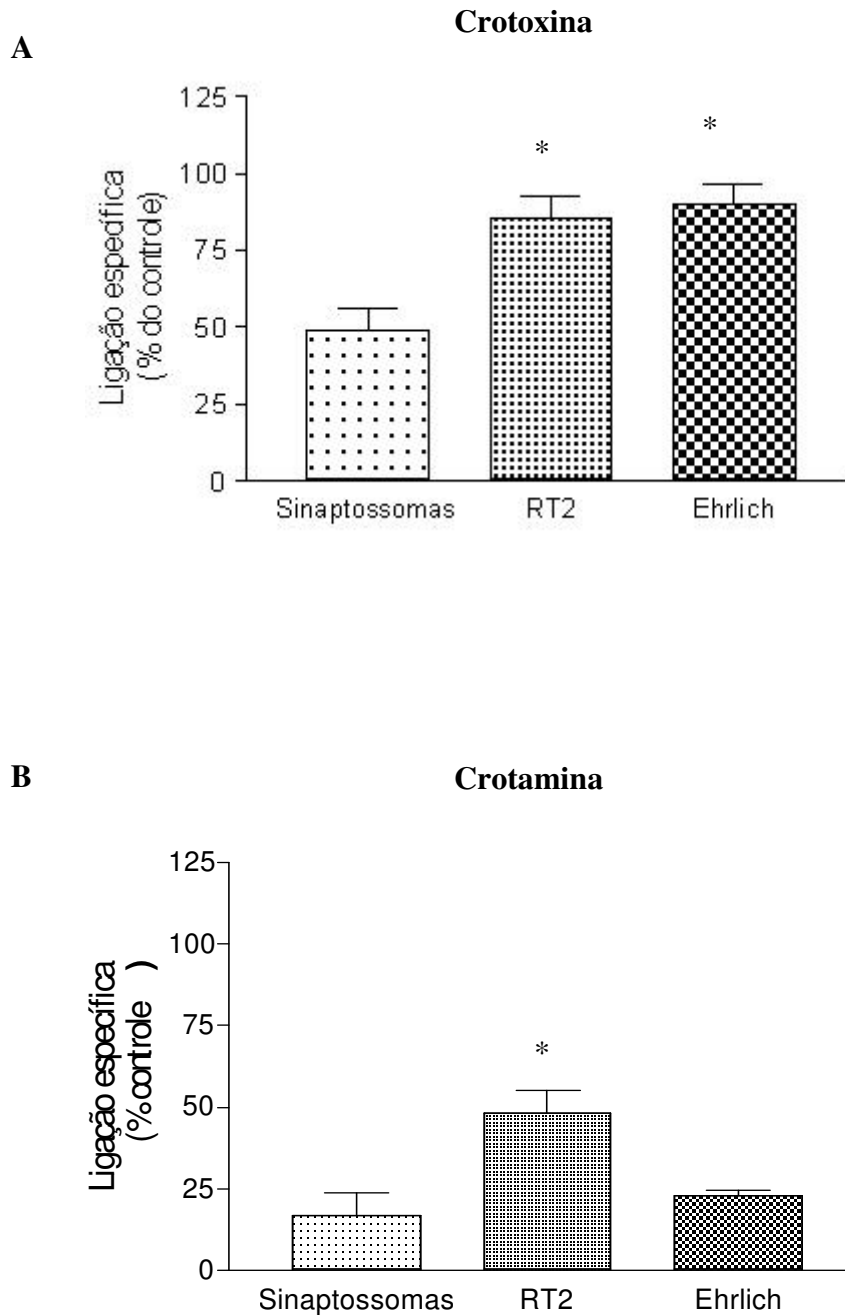


FIGURA 47: Estudo da interação dos polipeptídeos da PC radiomarcados com os receptores de membrana das células RT2, Ehrlich e P2. A- Ligação específica da ^{125}I -Crotoxina **B-** Ligação específica da ^{125}I -Crotamina. Tanto a Crotoxina quanto a Crotamina apresentaram maior ligação em sítios específicos das células de glioblastoma do que em sinaptossomas de cérebro de rato. Além disso, a Crotoxina apresentou maior ligação específica em células tumorais do que a Crotamina. (n=3) (*p<0,01 em relação ao controle).

5.8 Síntese de sonda radioativa da PC, utilizando o radioisótopo ^{99m}Tc como radiotraçador, para estudos de biodistribuição em animais com tumor de Ehrlich

Com o objetivo de avaliar a interação da PC com as células tumorais, uma sonda radioativa da peçonha foi sintetizada, utilizando o ^{99m}Tc como radiotraçador. Esta sonda foi utilizada em estudos de biodistribuição em animais com tumor de Ehrlich.

A síntese da sonda radioativa da PC com ^{99m}Tc foi realizada com sucesso e a atividade específica da PC radiomarcada foi bastante satisfatória (TAB. 5).

TABELA 5: Síntese da sonda radioativa da PC utilizando ^{99m}Tc como radiotraçador

Molécula	Eficiência da síntese da sonda radioativa	Atividade específica
$^{99m}\text{Tc-PC}$	80%	$0,8 \times 10^{-6} \text{Ci}/\mu\text{g} - 2,96 \times 10^4 \text{Bq}/\mu\text{g}$

A avaliação da atividade biológica da $^{99m}\text{Tc-PC}$ foi feita através da análise da sua atividade hemolítica indireta. Os resultados obtidos mostram que PC não perdeu sua atividade biológica após a radiomarcagem com ^{99m}Tc (IC_{50} PC nativa: $30,15 \pm 7,3 \mu\text{g/mL}$ - IC_{50} $^{99m}\text{Tc-PC}$: $24,7 \pm 4,9 \mu\text{g/mL}$) (FIG. 48), confirmando os dados obtidos por PUJATTI e colaboradores (2005).

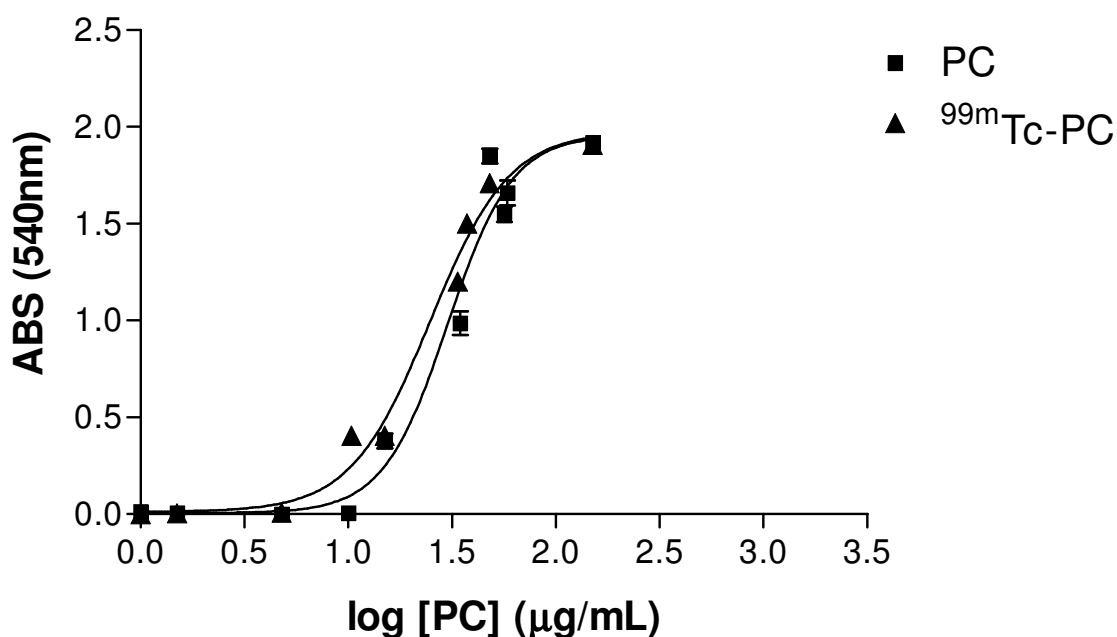


FIGURA 48: Atividade hemolítica indireta de PC nativa e ^{99m}Tc-PC. Hemácias humanas foram incubadas durante 1 hora a 37°C com uma emulsão de gema de ovo e uma solução de peçonha nativa ou marcada com ^{99m}Tc (1-150µg/mL). Após o tempo de incubação, a mistura foi centrifugada e a hemoglobina presente no sobrenadante foi quantificada espectrofotometricamente a 540nm. PC não perdeu sua atividade biológica após a radiomarcagem com ^{99m}Tc (IC₅₀ PC nativa: 30,15±7,3µg/mL - IC₅₀ ^{99m}Tc-PC: 24,7±4,9µg/mL) (n=3).

5.9 Avaliação da interação, *in vivo*, da $^{99m}\text{Tc-PC}$, $^{125}\text{I-Crtx}$ e $^{125}\text{I-Crota}$ com células tumorais – Biodistribuição em animais com tumor de Ehrlich

A interação da $^{99m}\text{Tc-PC}$, $^{125}\text{I-Crtx}$ e $^{125}\text{I-Crota}$ com as células tumorais foi estudada, *in vivo*, com o objetivo de avaliar o potencial uso dessas moléculas radiomarcadas como moldes de radiofármacos para diagnóstico de tumores. Para isso, as moléculas radiomarcadas foram administradas i.v. em animais com tumor de Ehrlich para avaliação dos perfis de biodistribuição e capacidade de interação com o tumor. $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e Na^{125}I também foram injetados nos animais, para avaliar a biodistribuição das possíveis impurezas presentes nos radiofármacos.

A cinética da biodistribuição de $^{99m}\text{Tc-PC}$ em animais com tumor de Ehrlich está representada na TAB. 6 e seguiu o mesmo perfil de biodistribuição de $^{99m}\text{Tc-PC}$ em animais normais (PUJATTI et al., 2005).

TABELA 6: Cinética da biodistribuição da $^{99m}\text{Tc-PC}$ (%DI/g) em animais com tumor de Ehrlich

Órgão	10min.	30min.	60min.	180min.	1440min.
Sangue	1,19±0,18%	0,7673±0,019%	0,364±0,10%	0,2858±0,09%	0,09±0,12%
Coração	0,25±0,005%	0,22±0,008%	0,15±0,02%	0,09±0,012%	0,007±0,01%
Pulmões	6,88±0,32%	5,6±0,34%	5,92±2,09%	3,42±0,78%	0,77±0,49%
Estômago	0,56±0,44%	0,617±0,04%	1,42±0,83%	0,38±0,038%	0,23±0,008%
Fígado	2,65±0,24%	4,0±0,59%	3,35±0,079%	1,78±0,42%	0,69±0,16%
Baço	2,04±0,76%	1,89±0,63%	1,85±0,11%	1,63±0,32%	0,93±0,4%
Rins	20,4±4,34%	35,16±3,99%	34,16±0,87%	22,02±0,98%	9,14±0,29%
Cérebro	0,016±0,005%	0,012±0,009%	0,0075±0,009%	0,0074±0,003%	0
Cerebelo	0,037±0,02%	0,013±0,005%	0,010±0,005%	0,008±0,004%	0

Os resultados mostraram que a concentração de $^{99m}\text{Tc-PC}$ no sangue diminuiu significativamente nos primeiros 60min. após a injeção e, após 24h, apenas uma quantidade muito pequena foi detectada (0,09±0,02%DI/g) (FIG. 49). A quantidade de $^{99m}\text{Tc-PC}$ no coração, pulmões e baço seguiu a cinética do sangue sendo reduzida ao longo do tempo e as concentrações desprezíveis de $^{99m}\text{Tc-PC}$ encontradas no cérebro e cerebelo, indicam que a peçonha não atravessa a barreira hematoencefálica. O acúmulo

de $^{99m}\text{Tc-PC}$ no fígado e rins indica que são estes os órgãos responsáveis por sua metabolização e eliminação. Além disso, a alta concentração da peçonha que persiste nos rins por 24h também está de acordo com o seu potencial nefrotóxico.

A concentração de $^{99m}\text{Tc-PC}$ no tumor aumentou no decorrer do tempo e atingiu o pico após 30 minutos da injeção. Nos tempos subseqüentes, a concentração da peçonha foi reduzindo de maneira gradativa, seguindo a cinética sanguínea (FIG. 50). A meia-vida ($T_{1/2}$), na fase rápida de eliminação, da $^{99m}\text{Tc-PC}$ no tumor foi ± 3 vezes maior do que a $T_{1/2}$ no sangue. Além disso, concentração de $^{99m}\text{Tc-PC}$ no tumor foi significativamente maior do que na pata contralateral, após 10, 30 e 60 minutos da injeção da peçonha radiomarcada (FIG. 51).

A FIG. 52 representa a análise comparativa entre a biodistribuição de $^{99m}\text{Tc-PC}$, $^{125}\text{I-Crtx}$ e $^{125}\text{I-Crota}$ e os possíveis contaminantes presentes nos radiofármacos ($^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e Na^{125}I), após 30min. da injeção. Esses resultados mostram que a biodistribuição dos possíveis contaminantes não segue o mesmo perfil de biodistribuição das moléculas radiomarcadas e confirmam a boa qualidade dos radiofármacos.

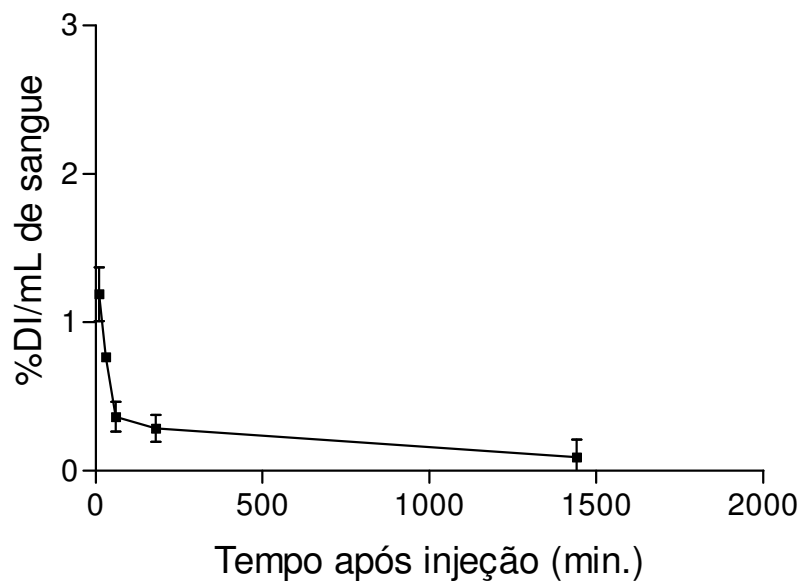


FIGURA 49: Cinética da concentração da $^{99m}\text{Tc-PC}$ no sangue de animais com tumor de Ehrlich. A concentração de $^{99m}\text{Tc-PC}$ no sangue diminuiu significativamente nos primeiros 60min. após a injeção e, após 24h, apenas uma quantidade muito pequena foi detectada ($T_{1/2}$: $36,1 \pm 2,4$ minutos)

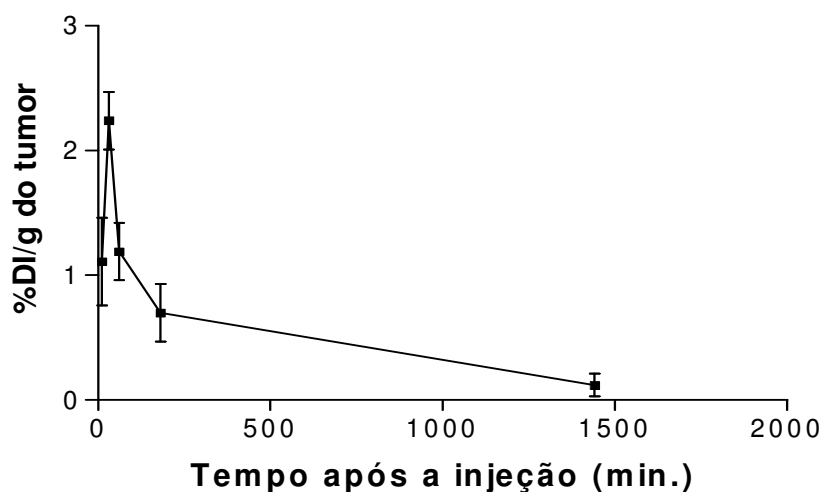


FIGURA 50: Cinética da concentração da $^{99m}\text{Tc-PC}$ no tumor de Ehrlich. A concentração de $^{99m}\text{Tc-PC}$ no tumor aumentou com o decorrer do tempo e atingiu o pico após 30 minutos da injeção de $22 \times 10^3 \text{Bq}$ da peçonha radiomarcada. Nos tempos subsequentes, a concentração da peçonha foi reduzindo, seguindo a cinética sanguínea ($T_{1/2}$: $108,31 \pm 19,5$ minutos).

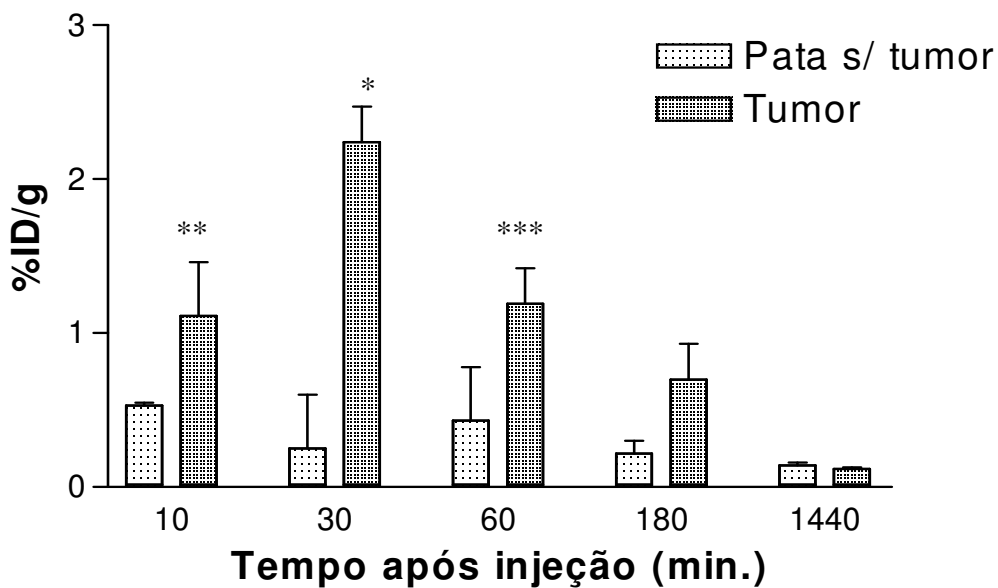


FIGURA 51: Análise comparativa da concentração da $^{99m}\text{Tc-PC}$ no tumor de Ehrlich e na pata sem tumor. A concentração de $^{99m}\text{Tc-PC}$ no tumor foi significativamente maior do que na pata sem tumor, após 30 minutos da injeção de $22 \times 10^3 \text{Bq}$ da peçonha radiomarcada (* $p < 0,05$; ** $p = 0,07$; *** $p = 0,06$).

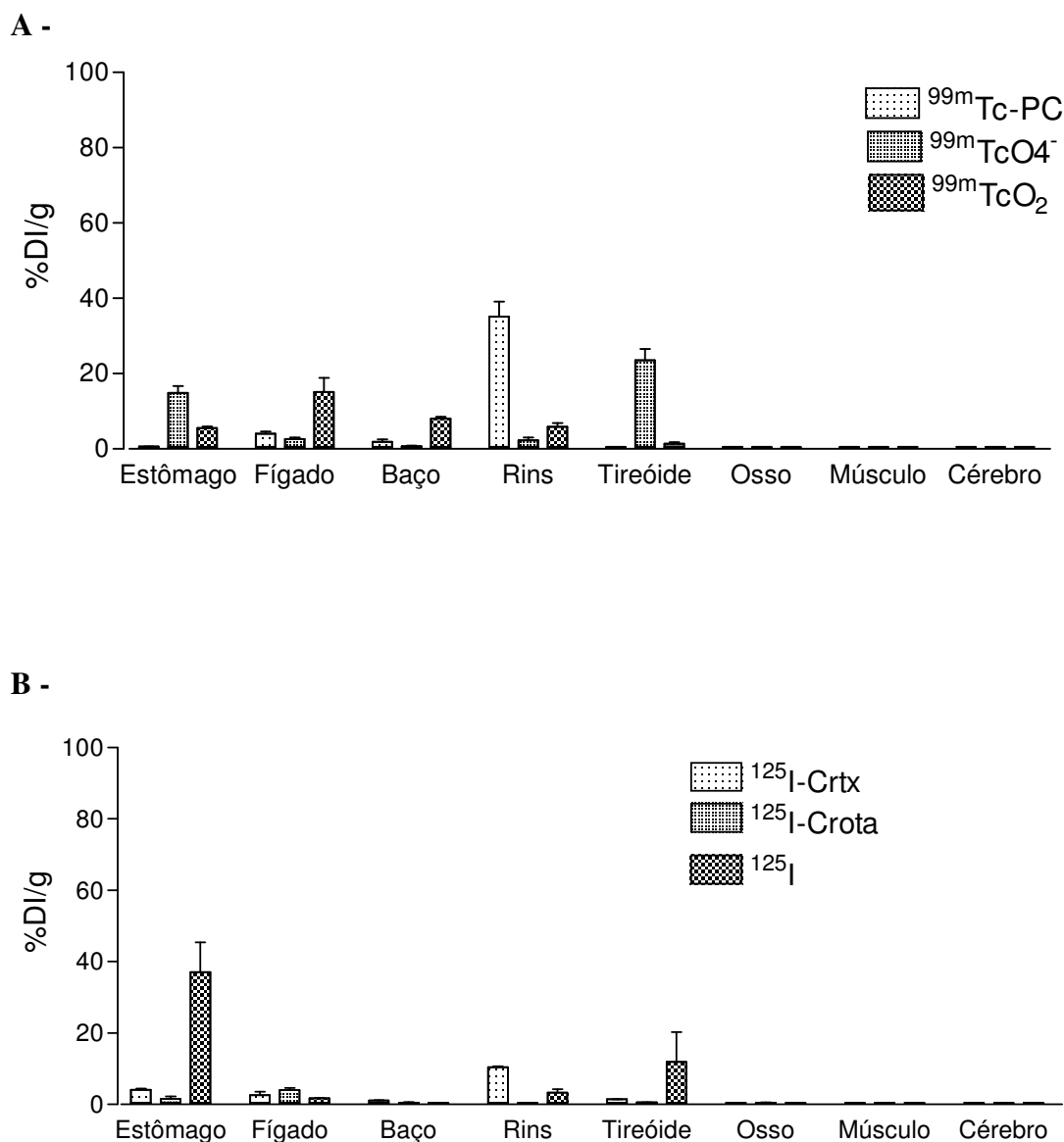


FIGURA 52: Comparação do perfil de biodistribuição das moléculas radiomarcadas e dos possíveis contaminantes presentes nos radiofármacos ($^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e Na^{125}I). Após 30 minutos da injeção de $20 \times 10^3 \text{Bq}$, a biodistribuição dos contaminantes não segue o mesmo perfil de biodistribuição das moléculas radiomarcadas e confirmam a pureza dos radiofármacos. **A- Perfil de biodistribuição da $^{99m}\text{Tc-PC}$, $^{99m}\text{TcO}_2$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$. **B-** Perfil de biodistribuição da $^{125}\text{I-Crtx}$, $^{125}\text{I-Crota}$ e do Na^{125}I .**

$^{125}\text{I-Crtx}$ e $^{125}\text{I-Crota}$ também se ligaram no tumor de Ehrlich, porém em menor quantidade do que $^{99\text{m}}\text{Tc-PC}$ (TAB. 7). Apesar de os testes *in vitro* terem evidenciado que $^{125}\text{I-Crtx}$ possui maior ligação específica pelo tumor de Ehrlich do que a $^{125}\text{I-Crota}$, essa diferença não pôde ser detectada nos testes feitos em animais ($p>0,05$). Isto ocorreu provavelmente devido à alta ligação dos polipeptídeos marcados com as proteínas presentes no sangue, fato que pode ser evidenciado pela maior concentração de $^{125}\text{I-Crtx}$ e $^{125}\text{I-Crota}$ no sangue, em relação à PC.

**TABELA 7: Biodistribuição da $^{99\text{m}}\text{Tc-PC}$, $^{125}\text{I-Crtx}$, $^{125}\text{I-Crota}$
30 minutos após a injeção (% DI/g)**

Órgão	$^{99\text{m}}\text{Tc-PC}$	$^{125}\text{I-Crtx}$	$^{125}\text{I-Crota}$
Sangue	0,7673±0,019%	2,69±0,64%	2,047±0,53%
Coração	0,22±0,008%	0,5±0,08%	0,41±0,13%
Pulmões	5,6±0,34%	1,08±0,05%	0,68±0,2%
Estômago	0,617±0,04%	4,14±0,28%	1,58±0,67%
Fígado	4,0±0,59%	2,66±1,58%	4,05±0,6%
Baço	1,89±0,63%	1,09±0,1%	0,56±0,12%
Rins	35,16±3,99%	10,45±0,25%	0,33±0,33%
Cérebro	0,012±0,009%	0,05±0,023%	0,039±0,004%
Cerebelo	0,013±0,005%	0,065±0,002%	0,048±0,007%
Tireóide	0,305±0,04%	1,42±0,019%	0,59±0,04%
Pata s/ tumor	0,25±0,35%	1,24±0,8%	0,64±0,018%
Tumor	2,24±0,23%	0,74±0,17%	1,26±0,44%

A TAB. 8 apresenta a proporção entre a quantidade de $^{99\text{m}}\text{Tc-PC}$, $^{125}\text{I-Crtx}$, $^{125}\text{I-Crota}$ presente tumor e aquela presente no sangue e órgãos adjacentes ao tumor. As proporções são suficientemente altas para evitar a interferências na detecção do tumor, indicando que as moléculas radiomarcadas podem ser utilizadas como radiofármacos para diagnóstico.

TABELA 8: Proporção entre a concentração de $^{99m}\text{Tc-PC}$, $^{125}\text{I-Crtx}$, $^{125}\text{I-Crota}$ no tumor e órgãos adjacentes

Proporção	$^{99m}\text{Tc-PC}$	$^{125}\text{I-Crtx}$	$^{125}\text{I-Crota}$
Tumor/PN	8,98±0,93	0,6±0,14	1,98±0,7
Tumor/Sangue	2,95±0,31	0,28±0,06	0,62±0,22
Tumor/Músculo	9,35±0,97	6,2±1,4	4,52±1,6
Tumor/Osso	5,91±0,61	5,7±1,3	2,94±1,03

6 DISCUSSÃO

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (2006), a cada ano o câncer atinge pelo menos 11 milhões de pessoas e mata cerca de 7 milhões, sendo atualmente a segunda causa de morte por doença na maioria dos países, subseqüente às doenças cardiovasculares.

Os tumores cerebrais constituem apenas 1-2% dos tumores em adultos, no entanto, são de difícil prognóstico e a sobrevida dos pacientes geralmente é muito baixa. Além disso, os tumores cerebrais representam os tumores sólidos mais comuns em crianças, sendo responsáveis por 25% das mortes relacionadas ao câncer em menores de 20 anos (PEREZ et al, 1997).

O glioblastoma multiforme (GBM) é a forma mais comum de tumor cerebral primário maligno em adultos. A sobrevida dos pacientes com glioblastoma é curta, raramente ultrapassando 1-2 anos na maioria dos casos. Os glioblastomas podem se infiltrar no tecido cerebral normal o que torna a sua completa remoção uma tarefa impossível, necessitando, assim, de outras formas de terapia (BERNSTEIN et al., 2001).

Um outro tipo de tumor cerebral é o adenoma de pituitária, tumor benigno, que representa cerca de 7% dos tumores cerebrais primários (AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION, 2006). Pacientes com adenoma de pituitária podem ter hipersecreção de hormônio do crescimento (GH) e essa hipersecreção pode induzir o desenvolvimento da acromegalia (DONANGELO et al., 2004). A cirurgia é bastante utilizada para o tratamento dessa patologia, no entanto apenas 50% dos pacientes conseguem ter a atividade hormonal restaurada (ABOSH et al., 1998).

A radioterapia convencional usada para tratamento de tumores cerebrais utiliza doses terapêuticas totais de 40-50Gy (PICKETT, 2003). Os resultados dos testes *in vitro* obtidos neste trabalho mostram que baixas doses terapêuticas de radiação ionizante (3-12Gy) foram suficientes para inviabilizar o crescimento das células de adenoma de pituitária e de glioblastoma. As células de adenoma de pituitária (GH3) foram significativamente mais sensíveis à radiação gama do que as células de glioblastoma (RT2) (IC₅₀ após 48h: GH3 - 4,1±0,4Gy e RT2 - 6,3±0,6Gy) e as poucas células, de ambas as linhagens, que permaneceram vivas após tratamento com radiação, principalmente 6 e 12Gy, tiveram sua clonogenicidade inibida, ou seja, perderam a capacidade proliferativa. Além disso, os resultados obtidos neste trabalho indicam que

as células GH3 e RT2, após serem tratadas com radiação gama, são induzidas à morte apoptótica, confirmando os dados da literatura (WILSON, 2004).

A radioterapia continua sendo um dos principais tratamentos para o câncer, no entanto, assim como os quimioterápicos convencionais, representa sérios riscos para tecidos normais. Por este motivo, o desenvolvimento de substâncias com potencial terapêutico e baixa toxicidade, para serem utilizadas como terapia isolada ou como adjuvante à radioterapia, torna-se a principal ferramenta na tentativa de aumentar a sobrevida dos pacientes e garantir a segurança e eficácia do tratamento.

Uma droga eficiente no tratamento de tumores deve ser citotóxica e citostática (antiproliferativa) para as células tumorais sem, no entanto, causar danos excessivos às células normais (VORHERR, 1984).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (PC) foi citotóxica e inibiu a capacidade proliferativa de duas linhagens de tumores cerebrais: o tumor benigno de adenoma de pituitária (GH3) e o maligno glioblastoma multiforme (RT2). Além disso, o efeito citotóxico da PC foi significativamente maior do que o efeito da cisplatina, que é uma droga clinicamente usada para o tratamento de tumores (PC: $IC_{50} = 961,2 \pm 110 \text{ ng/mL}$ para GH3 e $2152,2 \pm 200 \text{ ng/mL}$ para RT2; Cisplatina: $IC_{50} = 5011 \pm 500 \text{ ng/mL}$ para GH3 e $4961 \pm 400 \text{ ng/mL}$ para RT2).

Após identificar os efeitos citotóxico e antiproliferativo da PC para as linhagens de tumores cerebrais, caracterizamos os mecanismos envolvidos nesta ação antitumoral. Para isso, foram feitos testes para avaliar o tipo de morte induzida pela peçonha, a influência dos fatores de crescimento e do cálcio extracelular no seu efeito citotóxico e, posteriormente, foram feitos estudos para identificar componentes da PC responsáveis pelo seu efeito antitumoral.

Os resultados obtidos indicam que a PC induziu morte apoptótica das células de adenoma de pituitária e de glioblastoma. Após serem tratadas com PC, as células GH3 e RT2 apresentaram alterações morfológicas, tais como, redução do volume citoplasmático, protusões na membrana plasmática, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos, todas características de apoptose. A análise do ciclo celular também demonstrou que o tratamento com PC provocou um aumento do número de células apoptóticas e, além disso, este tratamento induziu a parada das células RT2 na fase G_0/G_1 do ciclo celular (aumento de até 44% em relação ao controle). Este fato é indicativo de que as proteínas sensoras (como ATM,

ATR e DNA-PK) reconheceram os danos provocados por PC e, com o intuito de tentar repará-los, desencadearam a cascata de sinalização necessária para promover a parada do ciclo celular. Esta tentativa de reparo, no entanto, parece não ser bem sucedida em tratamentos prolongados com PC, pois, como demonstrado pelo teste de citotoxicidade, todas as células RT2 morreram após 144h de tratamento com PC.

A apoptose de células tumorais induzida por PC também foi recentemente demonstrada por TAMIETI e colaboradores (2007) em células de carcinoma de ovário (CHO-K1). Estes autores sugeriram que PC induziu a apoptose, nestas células, por via mitocondrial através da ativação do promotor de morte associado a Bcl-2 (Bad). Células CHO-K1 possuem o gene e a proteína p53 mutantes e, por este motivo, não possuem o ponto de checagem na fase G₁ do ciclo celular (HU et al., 1999). Provavelmente, a ativação de Bad, nas células CHO-K1 tratadas com PC, foi mediada pela proteína p53 na fase G₂ do ciclo. As células de glioblastoma multiforme utilizadas em nossos experimentos (RT2) possuem p53 selvagem (BROADDUS et al., 1999), o que possibilita o reparo de danos no DNA pela indução de parada do ciclo tanto em G₁ como em G₂ (INNOCENTE et al., 1999; ATTARDI et al., 2004). Observamos que o tratamento destas linhagens p53 selvagem com PC induziu danos celulares que ativaram a parada do ciclo celular na fase G₁ para reparo dos mesmos. Esta tentativa mal sucedida de reparar os danos induzidos por PC, resultou na apoptose destas células. Estes dados são indicativos de que PC é capaz de induzir a apoptose, tanto na fase G₂ como na fase G₁ do ciclo celular, de tumores expressando diferentes status da proteína supressora p53.

Os fatores de crescimento são essenciais para a proliferação celular. Na ausência destes fatores, células em G₁ saem do ciclo celular e ficam estacionadas em G₀ (fase de quiescência), onde o metabolismo celular é reduzido e não há crescimento. As células quiescentes podem voltar ao ciclo desde que haja estímulo de crescimento (ISRAELS et al., 2000). Os agentes antineoplásicos podem ser ciclo específicos (ex: antimetabólitos) mais eficazes em células que estão proliferando ativamente, ou ciclo inespecíficos (ex: alquilantes), que possuem eficácia independente da célula estar se dividindo ou em repouso. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que PC age de maneira ciclo específica. Na ausência de fatores do crescimento (SFB), o efeito citotóxico da PC foi cerca de 45% menor (p<0,05). No entanto, a possibilidade de PC atuar na fase G₀ não pode ser descartada, já que apesar de menos potente, PC ainda foi citotóxica para as células tumorais na ausência de soro.

Além da dependência de fatores do crescimento, o efeito citotóxico da PC para células de glioblastoma também foi dependente de Ca^{+2} extracelular. A importância do Ca^{+2} para a deflagração dos sinais da apoptose já foi descrita (ORRENIUS et al., 2003) e a presença de canais de cálcio nas células de adenoma de pituitária e de glioblastoma também já foi demonstrada, inclusive por nós (GOUVÊA DOS SANTOS et al., 2006; LATOUR et al., 2004). Em trabalho recente (SOARES et al., 2005) nós demonstramos ainda que o cálcio extracelular não interfere na apoptose radioinduzida, indicando que este tipo de morte é dependente apenas do cálcio intracelular proveniente dos estoques mitocondriais e reticulares. A partir destes dados é possível extrapolar que a apoptose induzida por PC nas células de glioblastoma poderia ocorrer independente de Ca^{+2} extracelular. Portanto, a redução do efeito citotóxico da PC na ausência de cálcio extracelular ocorreu, provavelmente, devido a não ativação dos seus componentes bioativos, cuja atividade é dependente de cálcio, como as fosfolipases e metaloproteases.

Os dois principais polipeptídeos da PC, Crotoxina e Crotamina, também induziram a apoptose das células de tumores cerebrais como demonstrado pelas alterações morfológicas e degradação do DNA. A Crotamina, que representa cerca de 17% do peso seco total da PC (LAURE, 1975), demonstrou ter maior atividade citotóxica do que a Crotoxina, que representa 68% da PC (DA SILVA et al., 1981). O tratamento de 48h com a concentração $2\mu\text{M}$ de Crotamina foi citotóxico para $\pm 12\%$ das células GH3 e $\pm 20\%$ das células RT2, enquanto que essa mesma concentração de Crotoxina não foi citotóxica para as células RT2 em nenhum dos tempos testados e foi citotóxica para as células GH3 somente após 144h de tratamento ($\pm 14\%$ de citotoxicidade).

Além de possuir maior efeito citotóxico para as células tumorais, a Crotamina apresenta vantagens do ponto de vista terapêutico, uma vez que é cerca de 26 vezes menos tóxica do que a Crotoxina (DL_{50} *in vivo* da Crotamina e Crotoxina= 3,4 e 0,13mg/Kg, respectivamente) (KARLSSON, 1979; NOVAIS et al., 2006).

O efeito citotóxico da Crotamina foi acompanhado de redução do volume citoplasmático que é um dos sinais morfológicos característicos de apoptose. BORTNER e colaboradores (2001) demonstraram que para ocorrer a redução de volume celular, é crucial o aumento do influxo de Na^+ e posterior perda de íons K^+ , Na^+ e Cl^- intracelulares (BORTNER et al., 1997). Em linfócitos normais a concentração intracelular de íons K^+ é 150mM e, quando estas células entram em apoptose, essa

concentração cai para 35mM. Essa diminuição na concentração de íons K^+ é essencial para a ativação de nucleases apoptóticas como as caspases (HUGHES JR. et al., 1997; CAIN et al., 2001). Saxitoxina, um bloqueador de canal de Na^+ , previne completamente o influxo Na^+ e a apoptose induzida via receptor de morte (BORTNER et al., 2003), sugerindo que além de ter um papel crucial na ativação da redução de volume celular, o influxo de Na^+ também tem um papel na ativação da apoptose. MATAVEL e colaboradores (1998) demonstraram que a Crotamina aumenta as correntes de íons Na^+ através da inibição da inativação dos canais de Na^+ .

A concentração 10 μ g/mL de PC foi citotóxica para praticamente todas as células GH3 e RT2, após 144h de tratamento. Estima-se que nessa concentração de PC estejam contidas $\pm 6,8\mu$ g/mL de Crtx e $\pm 1,7\mu$ g/mL de Crota (LAURE, 1975; DA SILVA et al., 1981). Essas concentrações de Crtx e Crota, quando utilizadas individualmente, causam um pequeno efeito citotóxico para as células de tumores cerebrais, sugerindo que apesar de exercerem papel importante no efeito antitumoral de PC, esses polipeptídeos provavelmente não atuam sozinhos. As peçonhas de serpentes são constituídas por uma mistura de substâncias biologicamente ativas (BERCOVICI et al., 1987; RANGEL-SANTOS et al., 2004) e cada componente bioativo pode exercer sua atividade isoladamente ou em conjunto com outros componentes. A Crotamina, por exemplo, pode ativar proteases e fosfolipases A_2 (MANCIN et al., 1997), indicando que ela é capaz de intensificar a atividade da Crotoxina e de outras proteases presentes na PC. Estudos utilizando outros polipeptídeos presentes na PC são necessários para identificar se há algum componente mais efetivo do que Crtx e Crota na ação antitumoral da PC.

Além dos tratamentos antineoplásicos tradicionais como a cirurgia, quimioterapia e radioterapia, uma das estratégias terapêuticas para tumores é a utilização de radiosensibilizadores, agentes químicos que aumentam a sensibilidade das células tumorais à radiação, tornando o tratamento radioterápico mais efetivo (SALVAJOLI et al., 1999). Para avaliar se a PC possui efeito radiosensibilizador, ela foi utilizada como neo-adjuvante à radioterapia (3-12Gy). Os resultados indicaram que além de ser um efetivo agente antitumoral quando utilizada isoladamente, a PC também apresenta um importante potencial radiosensibilizador. O tratamento radioterápico utilizando PC (2-5 μ g/mL) como neo-adjuvante reduziu significativamente o número de células tumorais se comparado ao tratamento individual com cada terapia (aumentou a radiosensibilidade em até 66%), indicando que neste tratamento, doses mais baixas de

ambas as terapias podem ser utilizadas com a mesma efetividade do tratamento individual com doses altas de cada terapia, reduzindo assim, os efeitos tóxicos para o paciente.

A identificação e caracterização do efeito antitumoral da PC indicou seu forte potencial terapêutico. No desenvolvimento de novos fármacos e/ou procedimentos terapêuticos, estudos toxicológicos são imprescindíveis para se avaliar os possíveis efeitos adversos. Da mesma forma a determinação de parâmetros farmacocinéticos e da especificidade de interação com o alvo são importantes.

Os estudos toxicológicos demonstraram que a administração da dose antitumoral da PC, estabelecida *in vitro* (0,016 μ g/mm² de massa tumoral) não provocou efeitos tóxicos agudos: nenhuma alteração histopatológica e funcional foi observada nos animais tratados. BRIGATTE (2005) também demonstrou que o tratamento por cinco dias consecutivos com 18 μ g de Crotoxina, a principal responsável pelo efeito tóxico da PC, além de promover a inibição do crescimento do tumor de Walker 256 (carcinossarcoma mamário) *in vivo*, não provocou alterações histopatológicas nos animais analisados. Estes resultados são encorajadores, pois demonstram a segurança do uso da PC para o tratamento de tumores.

Para os estudos de biodistribuição e especificidade para células tumorais, sondas radioativas da PC, Crotoxina e Crotamina foram sintetizadas utilizando os radioisótopos ^{99m}Tc e ¹²⁵I como radiotraçadores. As sondas radioativas foram sintetizadas com alta eficiência (80-97%) e atividade específica bastante satisfatória (2,96 x 10⁴ a 4,7 x 10⁶ Bq/ μ g), na mesma ordem de grandeza de moléculas radiomarcadas comerciais. Após o processo de síntese, as moléculas radiomarcadas continuaram biologicamente ativas.

A avaliação da capacidade de interação da ¹²⁵I-Crtx e ¹²⁵I-Crota com as células de tumores malignos de glioblastoma multiforme e de Ehrlich (carcinoma mamário) foi feita primeiramente *in vitro*. Crtx e Crota se ligaram em sítios específicos presentes na membrana das linhagens de tumores sólidos testados (RT2 e Ehrlich). Além disso, a maior ligação específica em células de glioblastoma (Crotoxina: 90% e Crotamina: 50% de ligação específica) do que células cerebrais normais (Crotoxina: 50% e Crotamina: 20% de ligação específica) torna essas moléculas candidatas atrativas para serem utilizadas como moldes de quimioterápicos para tumores cerebrais.

A Crotoxina apresentou maior ligação específica nas células de glioblastoma multiforme, no entanto, produziu efeito antitumoral menor do que a Crotamina. Este resultado pode ser indicativo de que: 1) as células de glioblastoma multiforme são

deficientes em alguma molécula chave da via apoptótica induzida pela Crtx; 2) a interação da Crotoxina com o receptor não resulta no estímulo eficaz para a sinalização da apoptose ou 3) os danos promovidos pela Crotoxina são detectados e reparados. A terceira hipótese parece ser a mais condizente com os nossos resultados, pois um número pequeno, mas significativo, de células apresentaram características apoptóticas após o tratamento com Crotoxina, mostrando que ela é capaz de induzir a apoptose. As células resistentes ao tratamento com Crotoxina, provavelmente, conseguiram reparar os danos causados por este polipeptídeo.

Para avaliar a biodistribuição e a capacidade de interação com tumores *in vivo*, $^{99m}\text{Tc-PC}$, $^{125}\text{I-Crtx}$ e $^{125}\text{I-Crota}$ foram administradas (i.v.) em camundongos com tumor de Ehrlich. O tumor de Ehrlich é bastante utilizado na oncologia experimental, pois, além de permitir o conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais inoculadas, também possui desenvolvimento rápido o que restringe o tempo de estudo (DA SILVA et al., 2004). Por este motivo, o modelo animal de tumor de Ehrlich foi utilizado nos nossos experimentos.

A cinética da biodistribuição de $^{99m}\text{Tc-PC}$ em animais com tumor de Ehrlich segue o mesmo perfil de biodistribuição de $^{99m}\text{Tc-PC}$ em animais normais já demonstrado por nosso grupo (PUJATTI et al., 2005). Além disso, a biodistribuição da $^{99m}\text{Tc-PC}$ foi significativamente diferente da biodistribuição de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$, possíveis contaminantes da preparação, confirmando a boa qualidade da marcação.

A alta concentração inicial (10min.) de $^{99m}\text{Tc-PC}$ no sangue e a rápida diminuição desses valores nos tempos subseqüentes, indicam a rápida depuração da PC do sistema circulatório, e mostram concordância com os resultados publicados por HABERMANN e colaboradores (1972) onde mais de 90% da Crotoxina é eliminada em 24h, após ser administrada (i.v.) em camundongos. O acúmulo de $^{99m}\text{Tc-PC}$ no fígado e rins indica que são estes os órgãos responsáveis por sua metabolização e eliminação e, além disso, a alta concentração da peçonha nos rins também está de acordo com o seu potencial nefrotóxico. Demonstramos recentemente (PUJATTI et al., 2005), a especificidade da PC para o tecido renal, através de estudos de competição *in vivo*.

A $^{99m}\text{Tc-PC}$ foi capaz de se ligar ao tumor de Ehrlich *in vivo*. A concentração de $^{99m}\text{Tc-PC}$ no tumor aumentou no decorrer do tempo e atingiu o pico após 30 minutos da injeção. Nos tempos subseqüentes, a concentração da peçonha foi reduzindo, seguindo a cinética sanguínea. A meia-vida ($T_{1/2}$) na fase rápida da $^{99m}\text{Tc-PC}$ no tumor foi ± 3 vezes maior do que no sangue ($T_{1/2}$ no sangue: $36,1 \pm 2,4$ minutos; $T_{1/2}$ no tumor: $108,31 \pm 19,5$

minutos). Estes resultados mostram que o tempo ideal para utilizar a $^{99m}\text{Tc-PC}$ na detecção de tumores para o diagnóstico por imagem é entre 30-60 minutos após a injeção.

$^{125}\text{I-Crtx}$ e $^{125}\text{I-Crota}$ também se ligaram no tumor de Ehrlich *in vivo*, porém, em menor quantidade do que a $^{99m}\text{Tc-PC}$. São vários os fatores que interferem na biodisponibilidade de drogas, como a capacidade de difundir através dos lipídios, o estado de ionização da molécula e a ligação com proteínas plasmáticas (RANG et al., 2004). A menor ligação dos polipeptídeos da PC com o tumor ocorreu, provavelmente, devido à alta ligação com as proteínas presentes no sangue, fato que pode ser evidenciado pela maior concentração de $^{125}\text{I-Crtx}$ e $^{125}\text{I-Crota}$ no sangue, em relação à PC. Estudos cinéticos devem ser realizados com os polipeptídeos marcados para confirmar essa hipótese.

Os resultados de biodistribuição também indicam que PC e seus polipeptídeos não atravessam a barreira hematoencefálica, o que dificultaria o uso dessas moléculas para o tratamento de tumores cerebrais via intavenosa. Uma alternativa para este problema é a encapsulação dessas moléculas em lipossomas, que por possuírem natureza lipídica, são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica com a vantagem de reduzir os efeitos tóxicos das moléculas encapsuladas. Estudos prévios já foram realizados encapsulando a Crtx em lipossomas (FREITAS et al., 1997). Além disso, a síntese de quimioterápicos utilizando os constituintes da PC como molde, permitirá a formulação de compostos mais lipofílicos, menos tóxicos preservando, no entanto, o seu efeito antitumoral.

Neste trabalho, foi possível identificar e caracterizar o efeito antitumoral da PC para tumores cerebrais e demonstrar o seu potencial radiosensibilizador e sua segurança para o tratamento local de tumores. Além disso, este trabalho demonstrou, pela primeira vez, a capacidade de interação da PC e seus polipeptídeos com um tumor sólido *in vivo*. Todos estes resultados são bastante satisfatórios e indicam fortemente o uso potencial dos componentes da PC como moldes de fármacos e radiofármacos para terapia e diagnóstico de tumores sólidos.

7 CONCLUSÕES

- A peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (PC) possui efeito antitumoral para células de adenoma de pituitária e de glioblastoma murinos.
- Assim como a radiação gama, o efeito antitumoral da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* para as células de tumores cerebrais estudadas ocorre através da indução da apoptose.
- Células de adenoma de pituitária (tumor benigno) são mais sensíveis ao efeito antitumoral da PC do que as células de glioblastoma multiforme (tumor maligno)
- Parte do efeito antitumoral da PC é ciclo específico.
- Parte do efeito antitumoral da PC é dependente de cálcio extracelular.
- PC apresenta importante potencial radiosensibilizador para células de adenoma de pituitária e glioblastoma multiforme.
- A dose antitumoral da PC, estabelecida *in vitro*, não causa efeitos tóxicos agudos para camundongos, quando administrada subcutaneamente.
- Crotoxina e Crotamina desempenham papel importante na atividade antitumoral da PC, porém, não devem atuar isoladamente.
- Sonda radioativa da PC pode ser sintetizada, utilizando o ^{99m}Tc como radiotraçador, com alta eficiência (80%), alta atividade específica ($2,96 \times 10^4 \text{Bq}/\mu\text{g}$) e preservando sua atividade biológica.
- Sondas radioativas da Crotoxina e Crotamina podem ser sintetizadas, utilizando o ^{125}I como radiotraçador, com alta eficiência (90-97%), alta atividade específica ($2,5 \times 10^5 \text{Bq}/\mu\text{g} - 4,7 \times 10^6 \text{Bq}/\mu\text{g}$) e preservando sua atividade biológica.
- Crotoxina e Crotamina interagem com sítios específicos presentes nas células de glioblastoma e tumor de Ehrlich.
- PC, Crotoxina e Crotamina não atravessam a barreira hematoencefálica nas condições testadas.
- PC e seus polipeptídeos se ligaram ao tumor de Ehrlich *in vivo*.
- Os resultados indicam o potencial biotecnológico da PC como fonte de moléculas moldes para o desenvolvimento de fármacos e radiofármacos para a terapia e/ou diagnóstico do câncer.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Identificar as moléculas intracelulares envolvidas na apoptose induzida por PC e seus polipeptídeos.
- Isolar e caracterizar os sítios específicos de Crota e Crtx presentes nas células tumorais estudadas
- Realizar estudos utilizando outros polipeptídeos presentes na PC para identificar se há algum componente mais efetivo do que Crtx e Crota na ação antitumoral da PC.
- Implantar o modelo animal de tumor cerebral para avaliar o efeito antitumoral da PC e seus componentes para esse tipo de tumor *in vivo*.
- Realizar estudos cinéticos de biodistribuição das sondas radioativas da PC, Crotoxina e Crotamina em modelos animais de tumores cerebrais.
- Desenvolvimento de formulações farmacêuticas com componentes da PC capazes de atravessar a barreira hematoencefálica.
- Avaliar a eficácia do uso da PC e seus componentes radiomarcados para detectar foco tumoral através de estudos de imagem *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS A. K.; LITCHMAN A. H. Imunologia contra tumores. In: **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. Cap. 171.

ABOSH A.; TYRELL J.B.; LAMBORN K.R. Transphenoidal microsurgery for growth hormone-secreting pituitary adenomas: initial outcome and long term results. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.83, p. 3411-3418, 1998.

ABS R.; VERHELDS J.; MASTER D.; VAN ACKER K.; NOBELS F.; COOLENS J.I. Carbengoline in the treatment of acromegaly: a study in 64 patients. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.83, p. 374-378, 1998.

AIRD S. D.; KAISER I. I.; LEWIS R. V.; KRUGGEL W. A. Rattlesnake presynaptic neurotoxins. Primary structure and evolutionary origin of the acidic subunit. **Biochemistry.** v.2, p. 7050–7058, 1985.

AIRD S. D.; KAISER I. I.; LEWIS R. V.; KRUGGEL W. G. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Arch. Biochem. Biophys.** v.249, p. 296–300, 1986.

AKIBA S.; SATO T. Cellular Function of Calcium-Independent Phospholipase A2. **Biol. Pharm. Bull.** v.27, p.1174-1178, 2004.

ALBERTS B.; JOHNSON A.; LEWIS, J.; RAFF M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. The Cell Cycle and Programmed Cell Death. In: **Molecular Biology of the Cell**. 4.ed. New York: Garland Science, 2002. Cap.17.

ALEXANDER G.; GROTHUSEN J.; ZEPEDA H.; SCHWARTZMAN R. J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon.** v. 26, p. 953-960, 1988.

ALMEIDA V.L.; LEITÃO A.; BARRETT REINA L.C.; MONTANARI C.A.; DONNICI C.L.; LOPES M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova** v.28, p.118-129, 2005.

ALVES DA SILVA J.A.; MURAMOTO E., RIBELA M.T.C.P.; ROGERO J.R.; CAMILLO M.A.P. Biodistribution of gyroxin using ¹²⁵I as radiotracer. **J. Radio. Nucl. Chem.** v.269, p.579-583, 2006.

AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION. Brain Tumor Basics In: **A Primer of Brain Tumors**. 2006. Cap.2.

AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION. Causes & Risks facts In: **A Primer of Brain Tumors**. 2006. Cap.4.

AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION. Types of brain tumors In: **A Primer of Brain Tumors**. 2006. Cap.6.

ANDREUCCI R. Radiação e Radioatividade In:**Proteção Radiológica: Aspectos Industriais**. São Paulo: Assessoria e Serviços Técnicos Ltda, 2006. Cap. 3.

ATTARDI L.D.; VRIES A.; JACKS T. Activation of the p53-dependent G1 checkpoint response in mouse embryo fibroblasts depends on the specific DNA damage inducer. **Oncogene**. v.23, p.973-980, 2004.

ATSUMI G, MURAKAMI M, KOJIMA K, HADANO A, TAJIMA M, KUDO I. Distinct roles of two intracellular phospholipase A2s in fatty acid release in the cell death pathway. **J Biol Chem**. v.275, p.18248-18258, 2000.

AYUK J.; SHEPPARD M.C. Growth hormone and its disorders. **Postgrad. Med. J.** v.82, p. 24-33, 2006.

BARRIO A. Giroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta Physiol. Latino Am.** v.11, p.224-230, 1961.

BENJAMIN R.; CAPPARELLA J.; BROWN A. Classification of glioblastoma multiforme in adults by molecular genetics. **Cancer J.** v.9, p. 82–90, 2003.

BERCOVICI D.; CHUDZINISKI A.M.; DIAS W.O.; ESTEVES M.I.; HIRAICHI E.; OISHI N.Y.; PICARELLI Z.P.; ROCHA M.C.; UEDA C.M.P.M.; YAMANOUYE N.; RAW I.A. A systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mem. Inst. Butantan**. v.49, p. 69-78, 1987.

BERGONIE J.; TRIBONDEAU L. Interpretation of some results of radiotherapy and an attempt at determining a logical technique of treatment. **Radiat Res.** p.587-588, 1959.

BERNSTEIN M.; BERGER M.S. **Neuro-Oncology: The Essentials**. New York: Thieme Medical Publishers, p. 508, 2000.

BIOCOMPARE. The Buyer's guide for life scientists. Disponível em: <http://biocompare.com>. Acesso em 20 de dezembro de 2006.

BLUME-JANSEN P.; HUNTER T. Oncogenic kinase signalling. **Nature**. v.411, p.355-365, 2001.

BON C.; CHANGEUX J. P.; JENG T. W.; FRAENKEL-CONRAT H. Postsynaptic effects of crotoxin and its isolated subunits. **Eur. J. Biochem**. v.99, p. 471–481, 1979.

BON C.; BOUCHIER C.; CHOUMET V.; FAURE G.; JIANG M.; LAMBEZAT M.; RADVANYI F & SALIOU B. Crotoxin, half-century of investigation on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta Phys. Pharm. Lat.** v.39, p. 439-448, 1989.

BOOTZ F.; BREUNINGER H.; LINDSTEDT-HILDEN M. Melanoma metastase in nasopharynx. **HNO**. v. 42. p.294-296, 1994.

BRAGANÇA B.M. Biologically active components of cobra venom in relation to cancer research. **Indian J. Med. Res.** v.64, p. 1197-1207, 1976.

BRASIL. Ministério da saúde. Acidentes por animais peçonhentos. In: **Guia de vigilância epidemiológica**. 6.ed., 2005. Cap.5.

BRAT D.J.; MAPSTONE T.B. Malignant Glioma Physiology: Cellular Response to Hypoxia and Its Role in Tumor Progression. **Ann. Intern. Med.** v. 138, p.659-668, 2003.

BREITHAUPT H. Enzymatic characteristics of crotalus phospholipase A2 and the crotoxin complex. **Toxicon**. v.14, p. 221-223, 1976.

BRIGATTE P. **Efeito antinociceptivo do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a dor de cancer em ratos. Inibição do crescimento tumoral pela crotoxina**. 2005. 151p. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

BORTNER C.D.; HUGHES F.M.; CIDLOWSKI J.A. A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. **J Biol Chem**. v. 272, p.32436-32442, 1997.

BORTNER C.D.; GOMEZ-ANGELATS M.; CIDLOWSKI J.A. Plasma membrane depolarization without repolarization is an early molecular event in apoptosis mediated by the inactivation of the Na⁺/K⁺-ATPase. **J Biol Chem**. v.276, p.4304-4314, 2001.

BORTNER C.D; CIDLOWSKI J.A. Uncoupling cell shrinkage from apoptosis reveals that Na⁺ influx is required for volume loss during programmed cell death. **J. Biol. Chem**. v.278, p.39176-39184, 2003.

CADILLO E.M.; FERREIRA C. B.; ZAVALETA A. Actividad hemolítica de venenos de serpientes de los géneros *Bothrops*, *Lachesis*, *Crotalus* y *Micrurus* (Serpentes: Viperidae y Elapidae). **Biol. Trop.** v.39, p.311-314, 1992.

CAIN K.; LANGLAIS C.; SUN X.; BROWN D.G.; COHN G.M. Physiological concentrations of K⁺ inhibit cytochrome c-dependent formation of the apoptosome. **J Biol Chem**. v.276, p.41985-41990, 2001.

CALLEGARI-JACQUES S.M. Amostras. In: Bioestatística. Porto Alegre: Artmed, 2003. Cap.16.

CALMETTE A.; SAENZ A.; COSTIL L. Effects du venin de cobra sur les greffes cancéreuses et sur le cancer spontane (adeno-carcinome) de la souris. **C. R. Acad. Sci.** p. 197-205, 1993.

CALVETE J.J; MORENO-MURCIANO M; P.; R. THEAKSTON D.G.; KISIEL D.G.; MARCINKIEWICZ C. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochem. J.** v.372, 725-734, 2003.

CANCER LINE. Disponível em: <http://www.cancerline.com>. Acesso em 20 de dezembro de 2006.

CELTIC BIOTECH. Disponível em:http://www.celticbiotech.com/bio_pharmaceuticals.php. Acesso em 28 de dezembro de 2006.

CHANG C.; SU M. J. A study of the interaction of crotopotin with crotoxin phospholipase A2, notexin and other presynaptic neurotoxins. **Br. J. Pharmacol.** v.73, p. 495–503, 1981.

CHANG C.C.; TSENG K. H. Effect of croptamine, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. **Br. J. Pharmacol.** v.63, p. 551–559, 1978.

CHANG C.H.; HORTON J.; SCHOENFELD D.; SALAZER O.; PEREZ-TAMAYO R.; KRAMER S.; WEINSTEIN A.; NELSON J.S.; TSUKUDA Y. Comparison of postoperative radiotherapy and chemotherapy in the multidisciplinary management of malignant gliomas: a joint radiation therapy oncology group study. **Cancer.** v.52, 997-1007, 1983.

CHEYMOL J.; GONÇALVES J.M.; BOURILLET F.; ROCH-ARVEILLER M. A comparison of the neuromuscular action of croptamine and the venom of *Crotalus durissus terrificus* var. *croptaminicus* 2 isolated preparations. **Toxicon.** v.9, p.279–286, 1971.

CLAYTON R.N.; FARRELL W.E. Clonality of pituitary tumors: more complicated than initially envisaged? **Brain Pathol.** v.11, p. 313-327, 2001.

COLLI B.O.; CARLOTTI JUNIOR C.G. Análise crítica dos resultados do tratamento neurooncológico dos gliomas malignos do SNC: Perspectivas futuras. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia.** v.12, p. 36-53, 2001.

COOPER G. M. The cell cycle. In: **The cell - a molecular approach.** 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2000. Cap.14.

CORIN R. E.; VISKATIS L. J.; VIDAL J. C.; ETCHEVERRY M. A. Cytotoxicity of crotoxin on murine erythroleukemia cells *in vitro*. **Investig. New Drugs.** v.11, p.11–15, 1993.

CORRÊA JR M.C.; MARIA D.A.; MOURA-DA-SILVA A.M.; PIZZOCARO K.F.; RUIZ I.R.G. Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. **Toxicon.** v.40, p. 739-748, 2002.

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

CURA J.E.; BLANZACO D.P.; BRISSON C., CURA M.A.; CABROL R., LARRATEGUY L., MENDEZ C., SECHI J.C., SILVEIRA J.S., THEILLER E., ROODT A. R., VIDAL J.C. Phase I and pharmacokinetics study of Crotoxin (Cytotoxic PLA2 NSC-624244) in patients with advanced cancer. **Clin. Cancer. Res.** v.8, p.1033-1041, 2002.

DA SILVA M.H.; GULMERME O. Titration of antiserum to south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by measuring inhibition of phospholipase A2 activity. **Toxicon**. v. 20, p.563-569, 1981.

DA SILVA R.J.; BARRAVIERA D.F.B. Effect of *Crotalus durissus terrificus* (LAURENTI, 1768) venom on the evolution of Ehrlich ascites tumor. **J. Venom. Anim. Toxins**. v. 3, 1997.

DA SILVA A. E.; SERAKIDES R.; FERREIRA E.; MORAES J.R.C.; OCARINO N.M.; CASSALI G.D. Efeito do Hipotireoidismo no Tumor de Ehrlich Sólido em Camundongos Fêmeas Castradas e Não Castradas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v.48, p.867-874, 2004.

DAVID J. P.; DAVID J. M. Planta Mediciniais. Fármacos Derivados de Plantas. In: **Farmacologia**. 6.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 134-145, 2002.

DING W.; YIN X. Dissection of the multiple mechanisms of TNF- α -induced apoptosis in liver injury. **J. Cell. Mol. Med.** v. 8, p. 445-454, 2004.

DONANGELO I.; GADELBA M. Bases moleculares dos adenomas hipofisários com ênfase nos somatotropinomas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.** v.48, p. 464-479, 2004.

DONATO N. J.; MARTIN C. A.; PEREZ M.; NEWMAN R. A.; VIDAL J. C.; ETCHEVERRY M. A. Regulation of epidermal growth factor receptor activity by crotoxin, a snake venom phospholipase A2 toxin. **Biochem. Pharmacol.** v. 51, p.1535–1543, 1996.

DOS SANTOS M.C.; GONÇALVES L.R.C.; FORTES –DIAS C., CURY Y., GUTIÉRREZ J.M.; FURTADO M.F.D. A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops Jararacussu*. **Mem. Inst. Méd. trop. São Paulo**. v.32, p.77-83, 1992.

DUBOIS D.; DUBOIS E.F. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. **Arch. Intern. Méd.** v.17, p. 862, 1916.

FADEL V., BETTENDORF P., HERRMANN T., AZEVEDO JR. W.F.; OLIVEIRA E.B.; YAMANE T., WUTHRICH K. Automated NMR structure determination and disulfide bond identification of the myotoxin crotamine from *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**. v. 46, p.759-767, 2005.

FILHO G.B.; PITELLA J.E.H.; PEREIRA F.E.L.; BAMBIRRA E.A.; BARBOSA, J.A. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: **Bogliolo patologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 2000. Cap.8.

FINE H.A.; DEAR K.G.B.; LOEFLER J.S.; BLACK P.M.; CANELLES G.P. Meta analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. **Cancer**. v.71, p. 2585-2597, 1993.

FLEISCHER A.; GHADIRI A.; DESSAUGE F.; DUHAMEL M.; REBOLLO M.P.; ALVAREZ-FRANCO F.; REBOLLO A. Modulating apoptosis as a target for effective therapy. **Molecular Immunology**. v.43, p.1065-1079, 2006.

FLETCHER J. E.; SELISTRE DE ARAUJO H. S.; OWNBY C. L. Molecular events in the myotoxic effects of phospholipases. In: **Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism**. New York: John Wiley & Sons. p. 455–497, 1997.

FORSYTH P.A.; KELLY P.J.; CASCINO T.L.; SCHEITHAUER B.W.; SHAW E.G.; DINAPOLI R.P.; ATKINSON E.J. Radiation necrosis or glioma recurrence: is computed-assisted stereotactic biopsy useful? **J Neurosurg**. v.82, p.436-444, 1995.

FREITAS T. V.; FREZARD, F. Encapsulation of native crotoxin in liposomes: a safe approach for the production of antivenom and vaccination against *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**. v.35, p. 91-100, 1997.

FUKOTOMI J.; FUKUDA A.; FUKUDA S.; HARA M.; TERADA A.; YOSHIDA M. Scavenging activity of índole compounds against cisplatin-induced reactive oxygen species. **Life Sciences**. v.80, p. 254-257, 2006.

GONÇALVES J.M.; VIEIRA L.G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. Análise Eletroforética. **Na Acad Brás. Ciec**. v.22, p. 141-150, 1950.

GOODHEAD D.T. Mechanisms for the biological effectiveness of high-LET radiations. **J. Radiat. Res**. v.40, p.1-13, 1999.

GOPALAKRISHNAKONE P.; DEMPSTER D.W.; HAWGOOD B.J.; ELDERH.Y. Celular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. **Toxicon**. v.22, p.85-98, 1984.

GORCZYCA W. Cytometric analyses to distinguish death processes. **Endocr Relat Cancer**. v. 6, p.17-19, 1999.

GOUVÊA DOS SANTOS R.; SOARES M.A.; CRUZ J.S.; MAFRA R.; LOMEIO, R.; CORDEIRO M.N.; PIMENTA A.M.; DE LIMA M.E. Tx1, from *Phoneutria nigriventer* spider venom, interacts with dihydropyridine sensitive-calcium channels in GH3 cells. **J. Radio. Nucl. Chem**. v.269, p.585-589, 2006.

HABERMANN E.; BREITHAUPT H. The crotoxin complex– an example of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon**. v.16, p. 19–30, 1978.

HABERMANN E.; WALSCH P.; BREITHAUPT H. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex II. Possible interrelationships between toxicity and organ distribution phospholipase A2, crotoxin and their combination. **Arch. Pharmacol**. v.273, p. 313–330, 1972.

- HAWGOOD B. J.; SANTANA DE SA S. Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by the crotoxin complex and its component phospholipase A2 at the frog neuromuscular junction. **Neuroscience**. v.4, p. 293–303, 1979.
- HAWGOOD B.J.; SMITH J. The presynaptic action of crotoxin at the murine neuromuscular junction. **Journal of Physiology**. v.266, p. 91-92, 1977.
- HENDRY J.H.; JEREMIC B.; ZUBIZARRETA E.H. Normal tissue complications after radiation therapy. **Rev Panam Salud Publica**. v.20, p.151-160, 2006.
- HIRABAYASHI T.; MURAYAMA T.; SHIMIZU T. Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A2. **Biol. Pharm. Bull.** v.27, p. 1168-1173, 2004.
- HONDA S.; TANAKA-KOSIGI C.; YAMADA S.; SANO T.; MATSUMOTO T.; ITAKUTA M. Human pituitary adenomas infrequently contain inactivation of retinoblastoma 1 gene and activation of cyclin dependent kinase gene. **Endocrine J.** v.50, p. 309-18, 2003.
- HU T.; MILLER C.M.; RIDDER G.M.; AARDEMA M.J. Characterization of p53 in Chinese hamster cell lines CHO-K1, CHO-WBL, and CHL: implications for genotoxicity testing. **Mutat Res.** v.426, p.51-62, 1999.
- HUGHES F.M.; BORTNER C.D.; PURDY G.D.; CIDLOWSKI J.A. Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. **J Biol Chem.** v.272, p.30567-30576, 1997.
- INCA -INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>. Acesso em 15 de janeiro de 2007.
- INNOCENTE S.A.; A. ABRAHAMSON J.L.; COGSWELL J.P.; LEE J.M. p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. **Cell Biology**. v.96, p. 2147–2152, 1999
- ISRAELS E.D; ISRAELS L.G. The cell cycle. **Oncologist**. v. 5, p. 510-513, 2000.
- JANEWAY C.A.; TRAVERS P.; WALPORT M.; SHLOMCHIK M. Utilizando a resposta imune para atacar tumores. In: **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed., 2002. Cap 13.
- JOHNSON D.G.; WALKER C.L. Cyclins and cell cycle checkpoints. **Annu. Ver. Pharmacol. Toxicol.** v.39, p. 295-312, 1999.
- JURISSON S.S.; LYDON, J.D. Potencial technecium small molecule, radiopharmaceuticals. **Chem. Rev.** v. 99, p. 2205-2218, 1999.
- KARLSSON E. Chemistry of protein toxins in snake venoms. In: **Snake venoms**. New York: Springer- Verlag. p. 159-212, 1979.

KARPINETS T.V.; FOY B.D. Tumorigenesis: the adaptation of mammalian cells to sustained stress environment by epigenetic alterations and succeeding matched mutations. **Carcinogenesis**. v. 26, p. 1323-1334, 2005.

KERKIS A.; KERKIS I.; BAPTISTA G.; OLIVEIRA B.E.; ANGELA M. VIANNA-MORGANTE A. M. V.; PEREIRA L. V.; YAMANE T. Crostamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **The FASEB J**. v.18, p. 1407-1409, 2004.

KRAVTOV V.D.; DANIEL T.O.; KOURY M.J. Comparative analysis of different methodological approaches to the *in vitro* study of drug-induced apoptosis. **American Journal of Pathology**. v. 155, p.1327-1339, 1999.

KOUYOUMDJIAN J.A.; HARRIS J.B.; JOHNSON M.A. Muscle necrosis caused by the sub-units of crostoxina. **Toxicon**. v.24, p. 575-581, 1986.

KRIZAJ I.; FAURE G.; VILLELA C.; PERALES J.; BON C. Interaction of the neurotoxic and nontoxic secretory phospholipases A2 with the crostoxin inhibitor from *Crotalus* serum. **European Journal of Biochemistry**. v.267, p.4799-4808, 1996.

KUBOTA Y.; KUBOTA K.; TANI S. DNA binding properties of DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) analogs having an imidazoline ring or a tetrahydropyrimidine ring: Groove-binding and intercalation. **Nucleic Acids Symposium**. v. 44, p. 53-54, 2000.

KUFE D. W.; POLLOCK R. E.; WEICHSELBAUM R. R.; BAST R. C.; GANSLER T. S.; HOLLAND J. F. Radiation Oncology. In: **Cancer Medicine** . Canada: BC Decker , 2003. Cap. 9.

KUFE D. W.; POLLOCK R. E.; WEICHSELBAUM R. R.; BAST R. C.; GANSLER T. S.; HOLLAND J. F. Chemotherapy. In: **Cancer Medicine** . Canada: BC Decker , 2003. Cap. 11.

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

LATOUR I.; LOUW D.F.; BEEDLE A.M.; HAMID J.; SUTHERLAND G.R.; ZAMPONI G.W. Expression of T-type calcium channel splice variants in human glioma. **Glia**. v.48, p. 112-119, 2004.

LAURE C.J. The primary structure of crostamine. **Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem**. v.365, p.213-215, 1975.

LEWIN B. Cell cycle and growth regulation. In: **Genes VIII**. Pearson: Prentice Hall, 2004. Cap. 29.

LOWRY O.H.; ROSEBROUGH N.J.; FARR A.L.; RANDALL R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**. v.193, p.265-275, 1951.

- MAGRO A. J.; SILVA R. J.; RAMOS P. R. R.; CHERUBINI A. L.; HATAYDE M. R. Intraspecific variation in the venom electrophoretic profile of recently captured *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) snakes. **J. Venom. Anim. Tox. Incl. Trop. Dis.** v. 7, p. 276-301, 2001.
- MANCIN A. C.; SOARES A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO S. H.; VIEIRA C.A.; GIGLIO J.R. The histamine releasers crotamine, protamine and compound 48/80 activate specific proteases and phospholipases A2. **Biochem Mol Biol Int.** v.42, p.1171-1177, 1997.
- MANCIN A. C.; SOARES A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO S. H.; FAÇA V.M.; GREENE L. J.; ZUCCOLOTTI S.; PELÁ I.R.; GIGLIO J.R. The analgesic activity of Crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. **Toxicon.** v.36, p. 1927-1937, 1998.
- MANNHEIM B. Cell death - Apoptosis and Necrosis. In: **Apoptosis and cell proliferation.** Biochemica, 1998. Cap 1.
- MANNHEIM B. Cell death –Cell proliferation and viability. In: **Apoptosis and cell proliferation.** Biochemica, 1998. Cap 2.
- MARSHALL E. Violent Reaction to Monoclonal Antibody Therapy Remains a Mystery. **Science.** v.311, p.1688 – 1689, 2006.
- MCKNIGHT J. A. Principles of chemotherapy. **Clin. Tech. Small. Anim. Pract.** v.18, p. 67-72, 2003.
- MARLAS G., BON C. Relationship between the pharmacological action of Crotoxin and its phospholipase activity. **Eur. J. Biochem.** v. 125, p.157-165, 1982.
- MATAVEL A.C.; FERREIRA-ALVES D.L.; BEIRÃO P.S.; CRUZ J.S. Tension generation and increase in voltage-activated Na⁺ current by crotamine. **Eur J Pharmacol.** v.348, p.167-173, 1998.
- MELMED S. Acromegaly. **N. Engl. J. Med.** v.322, p. 966-977, 1990.
- MELMED S.; KLEINBERG D. Anterior Pituitary. In: **William's textbook of endocrinology.** 10. ed. New York: Saunders, p. 177-280, 2003.
- MI-RIEONG R.; SOON-YOUNG P.; SU-MI C. Combined effect of of heptaplatin and ionizing radiation on human squamous carcinoma cell lines. **Mol. Cells.** v.19, p.143-148, 2004
- MILOSAVLJEVIC V.P.; CONRAD C.A.; YUNG W.K.A. Principles of chemotherapy for adult primary brain tumors. **Cancer of Central Nervous system. Blackwell Science.** p.200-212, 1997.
- MOLINARI M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. **Cell Proliferation.** v.33, p.261-274, 2000.

- MOOTS P.L.; MACIUNAS R.J. Neuro-oncologic treatment of malignant gliomas. **Contemporary Neurosurgery**. v.20, p. 1-7, 1998.
- NICASTRO G., FRANZONI L., CHIARA C., MANCIN A., GIGLIO J.R., SPISNI A. Solution structure of crotoxin, a Na⁺ channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Eur. J. Biochem**. v. 270, p. 1969-1979, 2003.
- NICHOLAS M.K.; PRADOS M.D.; LARSON D.A.; GUTIN P.H. Malignant astrocytomas. **Blackwell Science**. p. 464-491, 1997.
- NORBURY C. J.; HICKSON I. D. Cellular responses to DNA damage. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**. v.41, p.367-401, 2001.
- NOVAIS C.M.; PUJATTI P.B.; CASTRO M.A.S.; SOARES M.A.; DE LIMA M.E.; SIMAL C.; GOUVÊA DOS SANTOS R. ^{99m}Tc radiolabeling of crotoxin as a tool for biodistribution studies. **J. Radio. Nucl. Chem**. v.269, p.591-595, 2006.
- OGUIURA N., BONI-MITAKE M., RÁDIS-BAPTISTA G. New view on crotoxin, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon**. v. 46, p.363-370, 2005.
- OLIVEIRA M.C.; MARRONI C.P.; PIZARRO C.B.; PEREIRA-LIMA J.F.; BARBOSA-COUTINHO L.M.; FERREIRA N.P. Expression of p53 protein in pituitary adenomas. **Braz J Med Biol Res**. v.35, p. 561-565, 2002.
- OLIVEIRA R.; SANTOS D.; FERREIRA D.; COELHO P.; VEIGA F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.2, p.151-165, 2006.
- OMRAN M. A. A.; FABB S. A.; DICKSON G. Biochemical and morphological analysis of cell death induced by Egyptian cobra (*Naja haje*) venom on cultured cells. **J. Venom. Anim. Toxins**. v.10, p.219-241, 2003.
- OSIPOV A.N.; KOLOMIITSEVA G. Post-radiation changes of DNA-protein cross-links and single-stranded DNA breaks in cells of various organs in gamma-irradiated rats. **Biokhimiia**. v.61, p.927-931, 1996.
- ORRENIUS S.; ZHIVOTOVSKY B.; NICOTERA P. Regulation of Cell Death: The Calcium-Apoptosis Link. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v.4, p.552-565, 2003.
- OWNBY C. L.; SELISTRE DE ARAUJO H. S.; WHITE S. P.; FLETCHER J. E. Lysine-49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**. v.37, p.411-445,1999.
- PEREIRA A.C.; CARMO E.D.; SILVEIRA V.A.S.; AMADEI S.U.; ROSA L.E.B. O papel das MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.52, p.257-262, 2006.
- PEREZ C.A.; BRADY L.W. **Principles and practice of radiation oncology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publisher, 1997. Cap.1.

- PICKETT C.A. Diagnosis and management of pituitary tumors: recent advances. **Prim. Care Clin. Office Pract.** v.30, p. 765-789, 2003.
- PLATA G.J.H.; COSTA L.A.; CONI C.M.; VIDAL J.C. Crotoxin complex as cytotoxic agent. In: **PATENTE 5164192**. Cambridge: Ventech Research, 1992.
- PLUMB, J.A.; MILROY, R; KAYE, S.B. Effects of the pH of 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. **Cancer Research.** v.49, p.4435-4440, 1989.
- PRADO-FRANCESCHI J.; VITAL-BRAZIL O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon.** v.19, p.875-87, 1981.
- PRASAD K.N. Cellular Radiation damage. In: **Handbook of radiobiology.** 2.ed. Boca Raton: CRC, 1995. Cap 4.
- PUJATTI P. B.; SIMAL C. J. R.; SANTOS R. G. Preparation of *Crotalus* venom radiolabeled with technetium^{-99m} as a tool for biodistribution study. **Braz. Ach. Biol. Tech.** v.48, p.9-12, 2005.
- PUJATTI P.B.; SOARES M.A.; SIMAL C.; GOUVÊA DOS SANTOS R. Preparation, characterization and biodistribution study of technetium-99m labeled *Crotalus* venom. **Book of extended synopses: International Symposium on Trends in Radiopharmaceuticals.** Vienna, 2005.
- RADVANYI F.; SALIOU B.; LAMBEZAT M. P.; BON C. Binding of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin to negatively charged phospholipid vesicles. **J. Neurochem.** v.53, p. 1252–1260, 1989.
- RAMALHO, A.T. **Fundamentos em Radiobiologia.** Rio de Janeiro: IRD, 2000.
- RANG H.P.; DALE M.M.; RITTER J. M.; MOORE P.K. Quimioterapia do cancer. In: **Farmacologia.** 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003. Cap.5.
- RANG H.P.; DALE M.M.; RITTER J. M.; MOORE P.K. Absorção e biodistribuição dos fármacos. In: **Farmacologia.** 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003. Cap.7.
- RANGEL-SANTOS A.; LIMA C.; LOPES-FERREIRA M.; CARDOSO D.F. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon.** v.44, p.609-616, 2004.
- RICCI M. S.; ZONG W. Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. **Oncologist.** v. 11, p.342-357, 2006.
- ROSENFELD G. Symptomatology, pathology and treatment of snakes bites in South America. In: **Venomous animals and their venoms.** New York:Academic Press, v.2, p.345-384, 1971.

RUDD C. L.; VISKATIS L. J.; VIDAL J. C.; ETCHEVERRY M. A. *In vitro* comparison of cytotoxic effects of crotoxin in three human tumor cell lines and a normal human keratinocyte cell line. **Investig. New Drugs**, v.12. p.183–184, 1994.

SAMPAIO S.C.. **Mecanismos envolvidos no efeito inibitório do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* sobre a fagocitose por macrófagos**. 2004. 136p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

SANO-MARTINS I.S.; DAIMON T. Eletron microscopic sytochemistry on the distribution of wheat germ agglutinin receptor on platelet plasma membrane after treatment with convulxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**. v.30, p. 141-150, 1992.

SBRT – Sociedade Brasileira de radioterapia. **Radioterapia**. p.1-16, 2006.

SIKIC B. I. New approaches in cancer treatment. **Ann Oncol**. v.10, p. 149-153, 1999.

SMITH J.S.;TACHIBANA I.; PASSE S.M. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. **J Natl Cancer Inst**. v.93, p.1246- 1256, 2001.

SOARES M.A.; SANTOS R.G. Effects of Low-Dose Ionising Radiation on PituitaryAdenoma: is there a Role for L-type Calcium Channel? **Braz. Arch. Biol. Tech**. v.48, p.185-190, 2005.

STOKLOSA T.; GOLAB J. Prospects for p53-based cancer therapy. **Acta Biochimica Polonica**. v.52, p.321-328, 2005.

STRASSER A.; O’CONNOR L.; DIXIT V. M. Apoptosis signaling. **Annu Rev Biochem** v.69, p. 217-245, 2000.

TARAPHDAR A.K.; ROY M.; BHATTACHARYA R.K. Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. **Current Science**. v. 80, p.1387-1396, 2001.

TAMIETI B.P.; DAMATTA R.A.; COGO J.C.; DA SILVA N.S.; MITTMANN J.; PACHECO-SOARES C. Cytoskeleton, endoplasmic reticulum and nucleus alterations in CHO-K1 cell line after *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom treatment. **J. Venom Anim. Toxins incl. Trop. Dis**. v.13, p.56-68, 2007.

TEIXEIRA L.T.; KIYOKAWA H.; PENG X.D.; KRISTOV K.T.; FROHMAN L.A.; KINEMAN R.D. p27kip1- deficient mice exhibit accelerated growth hormone-releasing hormone (GHRH)-induced somatrotpe proliferation and adenoma formation. **Oncogene** v.19, p. 1875-1884, 2000.

THAWLEY S.E.; PANGE W.R.; BATSAKIS J.G.; LINDBERG R.D. **Comprehensive management of head and neck tumors**. 2. ed. WB Saunders Company: Philadelphia. p.1345-1349, 1999.

- THRALL J.T.; ZIESSMAN H.A. Princípios Básicos. In: **Medicina Nuclear**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 1.
- THRALL J.T.; ZIESSMAN H.A. Radiofarmácia. In: **Medicina Nuclear**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 2003. Cap. 4.
- THRALL J.T.; ZIESSMAN H.A. Oncologia. In: **Medicina Nuclear**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 9.
- TINOIS E. Imagens Funcionais PET e fMRI. **Multiciência: tecnologia para a saúde**. p.1-14, 2005.
- TRICHPOULAS D.; LI F.P.; HUNTER D.J. What causes cancer? **Sci. Am.** v. 275, p.80-87, 1996.
- TURNER, J.E. Radioactive decay. In: **Atoms, Radiation and Radiation Protection**. 2.ed. New York: Wiley Interscience , 1995. Cap. 4.
- VITAL-BRAZIL, O. Neurotoxins from South American rattlesnake. **J. Formosan. Med.Assoc.** v.71, p.394-396, 1972.
- VORHERR H. Adjuvant chemotherapy of breast cancer: Hope — Reality — Hazard? **Journal of Molecular Medicine**. p.149-161, 1984.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em :<<http://www.who.int/cancer>>. Acesso em: 25 de Janeiro de 2007.
- WILSON G.D. Radiation and cell cycle, revisited. **Cancer and metastasis reviews**. v.23, p.209-225, 2004.
- WORKMAN P.; KAYE S.B. Cancer therapeutics: A Trends Guide with eleven reviews of various new potentials approaches to the development of anticancer drugs. **Mol. Med. Suppl.** v.8, p. 1-73, 2002.
- ZHANG X.; HORWITZ G.A.; HEANEY A.P.; NAKASHIMA M.; PREZANT T.R.; BRONSTEIN M.D. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 84, p.761-767, 1999.
- ZHAO S.; DU X.; CHAI M.; CHEN J.; ZHOU Y.; SONG J. Secretory phospholipase A2 induces apoptosis via a mechanism involving ceramide generation. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1581, p.75-88, 2002.
- ZIEGLER U.; GROSCURTH P. Morphological Features of Cell Death. **News Physiol. Sci.** v. 19, p. 124-128, 2004.
- ZIMMERMANN K.C.; BONZON C.; GREEN D.R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology & Therapeutics.** v.92, p. 57-70, 2001.
- ZUR HAUSEM H. Cervical carcinoma and human papillomavirus: on the road or preventing a major human cancer. **J Natl Cancer Inst.** v. 93, p. 252-253, 2001.

APÊNDICE

**CÁLCULO ESTATÍSTICO DO TAMANHO DA AMOSTRA PARA
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CALLEGARI-JACQUES, 2003)**

Cálculo do n visando comparar dois grupos independentes:

$$n \text{ para cada amostra} = \frac{S_A^2 + S_B^2}{(\mu_A - \mu_B)^2 \times (\alpha + \nu_B)^2}$$

Onde:

$$gl = (n_A + n_B - 2).$$

s_A^2 e s_B^2 são estimativas provisórias das variâncias nas populações A e B, respectivamente.

α e ν_B são valores da tabela t de student.

Considerando o grupo controle 100%.

Quantos animais devem ser usados para que possamos identificar uma diferença, se houver, de pelo menos 20% entre o grupo controle e tratado com PC.

Considerar as estimativas das variâncias nas populações iguais a 10% (desvio padrão = 10).

Então:

$$S_A^2 = S_B^2 = (10)^2 = 100$$

$$(\mu_A - \mu_B) = 20$$

$$\alpha = 0,05$$

$$\text{Poder} = 1 - \beta = 0,80 \text{ então } \beta = 0,2$$

Como n ainda não está determinado, o pesquisador não pode calcular o gl para obter os valores tabelados de t.

A solução é escolher um valor de n_0 para iniciar os cálculos e depois realizar interações até que o valor de n estabilize.

Começando com $n_0=5$: $gl= 8$; $t\alpha = t_{0,05 \text{ bilateral}; 8} = 2,306$ e $u\beta= t_{0,20; 8} = 0,889$

$n= 5,088$

$n_0=5,088$: $gl= 5,088+ 5,088 - 2 =8,176$; $t\alpha = t_{0,05 \text{ bilateral}; 8} = 2,306$ e $u\beta= t_{0,20; 8} = 0,889$

$n= 5,088$

$n_0=5,088$: $gl= 5,088+ 5,088 - 2 = 8,176$; $t\alpha = t_{0,05 \text{ bilateral}; 8} = 2,306$ e $u\beta= t_{0,20; 8} = 0,889$

$n= 5,088$

Repetindo os cálculos, verifica-se que o valor calculado estabiliza em $n=5,088$ para cada amostra. Pode-se dizer, então, que o número de animais necessário para identificar uma diferença de pelo menos 20% entre o grupo controle e tratado com PC, com um nível de 0,05 de significância e poder de 80%, é de no mínimo 5 animais por grupo.

Considerando o grupo controle 100%.

Quantos animais devem ser usados para que possamos identificar uma diferença, se houver, de pelo menos 30% entre o grupo controle e tratado com PC.

Considerar as estimativas das variâncias nas populações iguais a 10% (desvio padrão = 10).

Então:

$$S^2_A = S^2_B = (10)^2 = 100$$

$$(\mu_A - \mu_B) = 30$$

$$\alpha = 0,05$$

$$\text{Poder} = 1 - \beta = 0,80 \text{ então } \beta = 0,2$$

Como n ainda não está determinado, o pesquisador não pode calcular o gl para obter os valores tabelados de t.

A solução é escolher um valor de n_0 para iniciar os cálculos e depois realizar interações até que o valor de n estabilize.

*Começando com $n_0=5$: $gl= 8$; $t\alpha = t_{0,05 \text{ bilateral}; 8} = 2,306$ e $u\beta = t_{0,20; 8} = 0,889$

$$n = 2.268$$

$n_0=2.268$: $gl= 2.268 + 2.268 - 2 = 2.536$; $t\alpha = t_{0,05 \text{ bilateral}; 2.536} = 3.182$ e $u\beta = t_{0,20; 2.536} = 0.978$

$$n = 3.846$$

$n_0=3,846$: $gl= 3.846 + 3.846 - 2 = 5,69$; $t\alpha = t_{0,05 \text{ bilateral}; 5,69} = 2,447$ e $u\beta = t_{0,20; 5,69} = 0,906$

$$n = 2.498$$

$n_0=2.498$: $gl= 2.498 + 2.498 - 2 = 2.996$; $t\alpha = t_{0,05 \text{ bilateral}; 2.996} = 3.182$ e $u\beta = t_{0,20; 2.996} = 0.978$

$$n = 3.846$$

$n_0=3,84$: $gl= 3,84 + 3,84 - 2 = 5,68$; $t\alpha = t_{0,05 \text{ bilateral}; 5,68} = 2,447$ e $u\beta = t_{0,20; 5,68} = 0,906$

$$n = 2.498$$

Repetindo os cálculos, verifica-se que o valor calculado estabiliza em $n=2,498$ e $3,846$ para cada amostra. Pode-se dizer, então, que o número de animais necessário para identificar uma diferença de pelo menos 30% entre o grupo controle e tratado com PC, com um nível de 0,05 de significância e poder de 80%, é de no mínimo 3-4 animais por grupo.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)