UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

EFEITO CITOTÓXICO E ANTITUMORAL DA BOTHROPSTOXINA-I E DA CROTAMINA

LUIZ CARLOS GEBRIM DE PAULA COSTA

UBERLÂNDIA-MG
JANEIRO-2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

EFEITO CITOTÓXICO E ANTITUMORAL DA BOTHROPSTOXINA-I E DA CROTAMINA

LUIZ CARLOS GEBRIM DE PAULA COSTA
ORIENTADORA: MARIA INÊS HOMSI BRANDEBURGO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica)

UBERLÂNDIA-MG

JANEIRO-2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

EFEITO CITOTÓXICO E ANTITUMORAL DA BOTHROPSTOXINA-I E DA CROTAMINA

COMISSÃO EXAMINADORA

PRESIDENTE: MARIA INÊS HOMSI BRANDEBURGO

EXAMINADORES:

Data da defesa:

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

Profa. Dra. Maria Inês Homsi Brandeburgo

Uberlândia,

Agradecimentos

Dra. Maria Inês Homsi Brandeburgo, pela orientação durante o mestrado e iniciação cientifica.

Dra. Veridiana de Merlo Rodrigues Ávila, pela co-orientação durante o mestrado, sugestões para o desenvolvimento do projeto, correções durante o desenvolvimento deste trabalho e pelo apoio financeiro .

Dra. Amélia Hamaguchi pelas sugestões durante a realização deste trabalho.

Dra. Elisãngela de Paula Silveira Lacerda, pelo apoio durante o início do trabalho e desenvolvimento das metodologias empregadas.

Carla Menezes, pela convivência e ajuda oferecida durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Dr. Andreimar Martins Soares pelo fornecimento das toxinas nativas e modificadas, e pelo apoio na realização deste trabalho.

Dr. Auro Nomizo, pelo estágio oferecido em seu laboratório durante a fase inicial do trabalho e pelo fornecimento das linhagens tumorais humanas.

Dra. Heloisa Vieira Ferro, pela disponibilização do Laboratório de Histologia do Instituto de Biociências da UFU para a realização das análises histológicas.

Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho por disponibilizar seu laboratório para a realização das análises de expressão gênica..

Dr. Mineo pelo fornecimento da linhagem tumoral de camundongo.

Msc. Cristiani Baldo pela convivência, ajuda nas análises de expressão gênica e importantes comentários a respeito deste trabalho.

Marcio José pela realização da parte morfológica deste trabalho..

Elisângela do laboratório de genética pela ajuda no início das análises de expressão gênica..

Msc. Luiz Fernando M. Izidoro pela ajuda nas análises hematológicas.

Aos colegas do Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais: Renata, Miriam, Rodrigo, André, Luiz Henrique, Daiana, Carol, Fabio, Marilia, Johara, Luiz Antônio e Danilo.

A CAPES e ao CNPq pelo apóio financeiro

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS vi
LISTA DE TABELAS E FIGURAS vii
INTRODUÇÃO GERAL 01
1. Constituição da peçonha ofídica 02
1.1. Gênero Bothrops- Constituição da peçonha botrópica 02
1.2. Gênero Crotalus- Constituição da peçonha crotálica 08
2. Definição e características gerais das neoplasias 10
2.1. Classificação das neoplasias 11
2.2. Causas do câncer 12
2.3. Imunidade para o tumor 13
2.4. Antineoplásicos 14
OBJETIVOS 17
Objetivos gerais 18
Objetivos específicos 18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 19
CAPÍTULO ÚNICO **"**Efeito Citotóxico e Antitumoral da Bothropstoxina-I e da Crotamina"
RESUMO 29
ABSTRACT 30
1. INTRODUÇÃO 31
2. MATERIAL E MÉTODOS 33
2.1. Peçonhas 33
2.2. Toxinas 33
2.3. Animais 33
2.4. Quantificação de proteínas 34
2.5. Meios de cultura celular para células tumorais e macrófago 34
2.6. Linhagens de células tumorais humanas e de camundongos 35
2.7. Cultivo de células tumorais 35
2.8. Obtenção de macrófagos peritôneais de camundongos 35
2.9. Atividade citotóxica 36
2.10. Atividade bacteriolítica 36

2.11. Inoculação e manutenção do tumor (S180) 37
2.12. Implantação do tumor sólido 38
2.13. Atividade antitumoral 38
2.14. Estudo do efeito miotóxico da miotoxinas BthTX-I e BthTx-I BPB sobre músculo gastrocnemius de camundongos 39
2.15. Análise estatística 39
3. RESULTADOS 40
3.1. Atividade citotóxica da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu*, BthTX-I nativa e modificada (BPB) sobre linhagem leucêmica linfoblástica T humana Jurkat 40
3.2. Atividade citotóxica da BthTX-I nativa e modificada (BPB) sobre linhagem adenocarcinoma de mama humano SK-Br-3 40
3.3. Atividade citotóxica de BthTX-I nativa e modificada (BPB) sobre linhagem de melanoma humano B16F10 43
3.4. Atividade citotóxica de BthTX-I nativa e modificadas (BPB, NPSC e NBSF), peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* e crotamina sobre linhagem de sarcoma 180 murino 43
3.5. Atividade citotóxica de BthTX-I nativa e modificada (BPB, NPSC e NBSF), peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* e crotamina sobre macrófagos peritoniais murinos 44
3.6. Atividade bactericida da BthTx-I nativa e modificada (BPB, NPSC e NBSF) sobre *E. coli* e *S. aureus* 48
3.7. Inibição do crescimento do tumor sólido (S180) implantado em camundongos 50
3.7.1. Avaliação histopatológica 52
3.7.1.1. Efeito da inoculação de BthTx-I em camundongos normais 52
3.7.1.2. Efeito da inoculação de BthTX-I BPB em camundongos normais 52
3.7.1.3. Efeito tumor sólido (S180) implantado em camundongos não tratados 52
3.7.1.4. Efeito do tratamento do tumor sólido com BthTX-I 52
3.7.1.5. Efeito do tratamento do tumor sólido com BthTX-I BPB 53
4. DISCUSSÕES 63
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 71

LISTA DE ABREVIATURAS

A: absorbância

Asp: aspartato

ATCC: American Type Culture Collection

B16F10: melanoma humano

BPB: brometo de p-bromofenacila

BthTX-I: Bothropstoxina-I

Cys: cisteína

DMSO: dimetil sulfato de sódio

DNA: ácido desoxirribonucléico

DP: desvio padrão

Glu: glutamato

HTLV-1: vírus linfocitotrófico T humano

i.m.: intramuscular

IL: interleucina

KGD: lisina-glicina-aspartato

Lys: lisina

MAF: macrophage activator factor

MDR: muti drug resistance

MMP: metaloprotease de matriz

MPAC: murine peritoneal adherent cells

MTT: 2,5-difenil-tetrazolium-(3-[4,5-dimetiltiazol-2]

NBSF: fluoreto de 2-nitrobenzenosulfonila

NK: natural killer

NPSC: cloreto de o-nitrofenilsulfenila

PI%: porcentagem de inibição

PLA_2: fosfolipase A_2

RGD: arginina-glicina-aspartato

RNA: ácido ribonicléico

RPM: rotações por minuto

RPMI: meio de cultura RPMI

RT-PCR: transcripitase reversa- reação em cadeia da polimerase

S180: sarcoma 180

Ser: serina

SFB: soro fetal bovino

Sk-Br-3: células do adenocarcinoma humano

TIMP: inibidor tecidual de metaloprotease

TNF: fator de necrose tumoral

Trp: triptofano

VRCTC-310-ONCO: agente antineoplásico composto de crotoxina e cardiotoxina

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Efeito do tratamento com BthTX-I ou BthTX-I BPB no tumor sólido induzido por células do Sarcoma 180 implantados em camundongos (pág 51).

Figura 1. Efeito citotóxico da peçonha bruta de *Botrhops jararacussu*, BthTX-I e BthTX-I BPB sobre a linhagem leucêmica linfoblástica T humana Jurkat (pág 41).

Figura 2. Efeito citotóxico de BthTX-I e BthTX-I BPB sobre a linhagem de adenocarcinoma de mama humano SK-BR-3 (pág 42).

Figura 3. Efeito citotóxico de BthTX-I e BthTX-I BPB sobre a linhagem de melanoma humano B16F10 (pág 45).

Figura 4. Efeito citotóxico: da peçonha bruta de *Botrhops jararacussu* , BthTX-I, BthTX-I BPB, BthTX-I NPSC e NBSF, da peçonha bruta de *Crotalus durrissus terrificus* e crotamina sobre a linhagem de sarcoma 180 murino (pág 46).

Figura 5. Efeito citotóxico: de BthTX-I, BthTX-I BPB, BthTX-I NPSC e NBSF, da peçonha bruta de *Crotalus durrissus terrificus* e crotamina sobre macrófagos peritoneais murinos (pág 47).

Figura 6. Atividade bactericida de BthTX-I nativa e modificada (BPB, NBSF e NPSC) sobre *E. coli S. aureus* (pág 49).

Figura 7. Fotomicrografia de secções musculares de camundongos Balb/c machos normais injetados com a miotoxina BthTX- I (pág 54).

Figura 8. Fotomicrografia de secções musculares de camundongos Balb/c machos normais injetados com a miotoxina BthTX- I BPB (pág 56).

Figura 9. Fotomicrografia de secções de fragmentos de tumor sólido (S180) implantados em camundongos não tratados (pág 57).

Figura 10. Fotomicrografia de secções de fragmentos de tumor sólido (S180) implantados em camundongos tratados com BthTX-I (pág 58-59).

Figura 11. Fotomicrografia de secções de fragmentos de tumor sólido (S180) implantados em camundongos tratados com dose única BthTX-I BPB (pág 61-62).

INTRODUÇÃO GERAL

1. CONSTITUINTES DA PEÇONHA OFÍDICA

As peçonhas são misturas complexas de componentes tóxicos que possuem diversas formas de ação em presas e que podem vitimar seres humanos. Estes componentes consistem principalmente de proteínas (90%), compreendendo grande variedade de enzimas e toxinas não enzimáticas (SCHIMIDT et al, 1976) que tem como funções primárias matar ou imobilizar suas presas, e ajudar na digestão. A parte não protéica é representada por carboidratos, lipídeos e compostos de baixo peso molecular, como nucleosídeos e diversos íons (CHIPPAUX et al, 1991).

1.1. Gênero *Bothrops*- Constituição da peçonha botrópica

A peçonha botrópica pode desencadear severas desordens metabólicas devido às atividades: proteolítica, coagulante, hemorrágica, necrosante e reação inflamatória com uma ampla liberação de mediadores celulares, entre citocinas e produtos microbicidas (reativos de oxigênio e nitrogênio) (AMARAL et al, 1985; LOMONTE et al, 1993). Embora raramente fatais, os casos de envenenamentos por estas serpentes se agravam devido à intensidade dos efeitos locais. Observa-se eritema e edema, este último tão intenso e prolongado que pode causar a compressão dos tecidos e vasos, resultando em isquemia e aumentando a necrose tecidual. Dependendo do tempo transcorrido até o tratamento da vítima, a amputação da área afetada poderá ser necessária. A necrose do córtex renal é uma freqüente e séria complicação do envenenamento botrópico (DA SILVA et al, 1979), vasoespasmos, nefrotoxicidade direta da peçonha e/ou coagulação intravascular disseminada, levando a oclusão vascular e isquemias, são hipóteses do mecanismo patogênico que explicam a necrose local observada (BASU et al, 1977).

Toxinas e enzimas como as hemorraginas, proteases inespecíficas, fosfolipases A_2, fosfodiesterases, L-aminoácido oxidases, entre outras, provocam

estas atividades por efeitos cumulativos e/ou sinérgicos (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995; MARKLAND, 1998).

O mecanismo do dano tecidual local provocado pelo envenenamento ofídico também envolve a ativação de uma resposta imunológica em que uma cascata de eventos é geralmente iniciada por macrófagos e monócitos do sangue. Os monócitos ativados liberam um amplo espectro de mediadores no qual a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF) disparam vários eventos pro-inflamatórios importantes (LOMONTE et al, 1993).

Os fatores hemorrágicos (SVMP- *snake venoms metalloproteases*) encontrados nas peçonhas de serpentes são metaloproteases pertencentes a subfamília das reprolisinas (dentro da família das metzincinas); estes são peptidases dependentes cataliticamente de íons metálicos, especialmente o zinco (Kamigutti et al, 1998).

As SVMPs apresentam grande diversidade em relação á massa molecular (20 a 100 KDa) e são divididos de acordo com seus domínios estruturais (Bjarnason & Fox, 1994).

As metaloproteases da classe PI apresentam baixo peso molecular (20 a 30 KDa), elas possuem somente um domínio metaloprotease, a ação hemorrágica é baixa ou ausente mas induzem lesão tecidual local (Gutierrez et al, 1995).

Na classe PII estão as proteases de massa molecular de 30 a 60 KDa e com alta atividade hemorrágica; além do domínio metaloprotease possuem um domínio adicional tipo desintegrina (Gutierrez & Rucavado, 2000), este domínio é responsável pela inibição da agregação plaquetária por ligar ao receptor GPαIIb/βIII da plaqueta impedindo a ligação com a molécula do fibrinogênio.

As metaloproteases encontradas na classe PIII possuem massa molecular de 60 a 80 KDa e são altamente hemorrágica, além dos domínios citados nas classes PI e PII, possuem um terceiro, o carboxi-terminal rico em cisteína, e provavelmente tenha uma função de estabilização do domínio desintegrina. Na classe PIV, estão as proteases com massa variando de 80 a 100 KDa, possuem um quarto domínio adicional, o ligante de lectina que atua como marcador para alvo de proteólise (Gutierrez & Rucavado, 2000).

A ação destas metaloproteases consiste na degradação da estrutura do endotélio vascular, dois mecanismos são identificados, um onde a hemorragia ocorre devido a ruptura proteolítica dos componentes da membrana basal dos vasos capilares (colágeno tiipo IV, laminina, fibronectina etc) este mecanismo é denominado hemorragia *per rhexis*, e outro onde o sangue extravasa através de junções endoteliais (hemorragia *per diapedesis*) (Kamiguti et al, 1996, Gutierrez & Rucavado, 2000).

Dentre as proteases existem as enzimas fibrinogenolíticas que atuam sobre o fibrinogênio, podendo hidrolisar suas cadeias ($A\alpha$, $B\beta$ e γ), levando a incoagulabilidade sangüínea (HUANG et al, 1993).

Outro grupo de proteases são as enzimas "*Thrombin-like*", que são serino-proteases. Estas enzimas convertem o fibrinogênio em fibrina liberando os fibrinopeptídeos A e B, formando, portanto o microcoágulo de fibrina, porém as "*Thrombin-like*" não ativam o fator XIII, responsável por unir de forma cruzada os monômeros de fibrina, tornando o coágulo mais denso. Deste modo, o coágulo fica mais suscetível à degradação pela plasmina, induzindo assim um estado de desfibrinogenação *in vivo* (FAN et al, 1999). As serinoproteases também são capazes, de ativar o fator V da coagulação e a proteína C plasmática e clivar o componente C3 do sistema de complemento (PETRETSKI et al, 2000).

Proteínas "*Lectin-like*" têm sido encontradas em peçonhas elapídicas, viperidicas e crotalídicas. Estas proteínas ligam-se a motivos de lactose e induzem a aglutinação de eritrócitos (OGILVIE & GARTNER, 1984) e agregação plaquetária (OGILVIE et al, 1989).

As desintegrinas pertencem a uma família de proteínas pequenas que contêm a seqüência de aminoácidos RGD (Arg-Gly-Asp) ou KGD (Lys-Gly-Asp) que é o motivo estrutural reconhecido pelo receptor da plaqueta $\alpha_2\beta_3$ para o fibrinogênio, elas também agem como potentes antagonistas de várias integrinas, inclusive $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_5\beta_1$ que são expressas em células do endotélio vascular e em algumas células tumorais. Além de sua atividade antiagregante potente, as desintegrinas revelaram novas funções inibindo a angiogênese e proliferação de tumor (KAMIGUTI et al, 1998).

Um dos principais componentes da peçonha botrópica é a enzima termoestável fosfolipase A_2 (PLA_2), que tem como substrato os fosfolipídeos

constituintes da membrana plasmática celular. Com a ação da enzima, os fosfolipídeos são hidrolisados, desestruturando a membrana e comprometendo sua permeabilidade seletiva. A hidrólise ocorre especificamente na ligação acil na posição sn-2 do fosfoglicerídeo (MOLLIER at al, 1990; ARNI & WARD, 1996; KINI et al, 2003) liberando ácidos graxos e lisofosfatídeos. Muitas vezes um destes ácidos é o araquidônico, que é precursor de outros eicosanóides, entre eles estão as prostaglandinas e hormônios aromáticos que são gerados pela cicloxigenação, e leucotrienos e acidos hidroxieicotetranóicos gerados pela lipooxigenação (DESSEM, 2000). Os lisofosfatídeos liberados podem ser convertidos em fator de ativação plaquetária (PAF).

Os eicosanóides são potentes mediadores celulares (DENNIS, 1997) tendo importantes papéis nos eventos de regulação do fluxo sanguíneo, migração, secreção e apoptose celular, estímulo de reações inflamatórias, crescimento de tumores e metástases (KUDO et al, 1993; DENIZOT et al, 1999).

As PLA_2 são encontradas tanto no interior como no exterior da célula (BOSCH, 1980; DENNIS, 1994). As PLA_2 intracelulares estão freqüentemente associadas a membranas e envolvidas com o metabolismo de fosfolipídios, transdução de sinais e outras funções celulares (MUKHEERJEE et al, 1994). As extracelulares são amplamente distribuídas em secreções pancreáticas, exudados inflamatórios e nas peçonhas de serpente e artrópodes e foram divididas em dez classes (I a X), com base no número de resíduos de aminoácidos e posição das ligações dissulfeto (RENETSEDER et al, 1985; DENNIS, 1997; WARD et al, 2001).

As PLA_2s de serpentes estão todas reunidas nos grupos I e II, estas são proteínas pequenas de 119 a 143 resíduos de aminoácidos com peso molecular variando de 13.000 a 18.000. As PLA_2 do grupo I são encontradas em peçonhas de serpentes do gênero *Elapidae* e *Hydrophidae*, enquanto que as do grupo II são encontradas, principalmente em peçonha de serpentes crotálicas e viperideas (WARD et al, 2001).

A distinção entre as classes I e II é baseada em dois critérios estruturais, o primeiro critério é a localização das pontes dissulfeto formadas entre os resíduos de meia cistina 11 e 77 no grupo I, e 51 e 133 para as PLA_2 do grupo II (ARNI & WARD, 1996). O segundo critério é a presença de duas a três inserções de

aminoácidos (*loop* elapídico), que está presente na região dos resíduos de aminoácidos 52-65 nas PLA_2s da classe I. Este "*loop*" é truncado nas da classe II, porém, possui uma extensão C-terminal de 5-7 aminoácidos. Esta extensão C-terminal é ligada ao corpo da proteína pela ponte dissulfeto 51-133 (ARNI & WARD, 1996; OHNO et al, 2004).

Três regiões na estrutura das PLA_2 das classes I e II possuem um alto grau de homologia em suas seqüência. Estas regiões contribuem para a formação de estruturas secundárias e terciárias altamente conservadas incluindo a hélice N-terminal, "*loop*" ligante de cálcio (-W/YCGxG-) nas regiões 28-32, regiões do sítio ativo nas regiões 44-51 junto com os aminoácidos que formam o canal hidrofóbico que liga as cadeias de fosfolipídeos (ARNI & WARD, 1996).

A conformação catalítica da PLA_2 é estabilizada pelo íon cálcio ligado no resíduo de aspartato na posição 49 (Asp49) no *loop* ligante de cálcio, (VERHEIJ et al, 1980). A substituição por outros íons divalentes como o bário ou cádmio resulta em uma redução significante da atividade (YUAN et al, 1993). O ión cálcio é coordenado por dois átomos de oxigênio do grupo carboxila no resíduo de Asp49 e três átomos de oxigênio na cadeia principal, duas moléculas de água completam a esfera de coordenação com íon cálcio formando uma bipirâmide pentagonal. A ponte dissulfeto (Cys27-Cys44) assegura a correta orientação do "*loop*" ligante de cálcio em relação aos aminoácidos que formam a rede catalítica. Resíduos de glicina dão a esta região uma flexibilidade e a conformação necessária, permitindo que os três átomos de oxigênio da cadeia carbonila contribuam para a estabilização da ligação do íon cálcio (ARNI & WARD, 1996).

O resíduo de Asp49 é essencial para a ligação do íon cálcio, a substituição conservativa Asp$\rightarrow$Glu49 reduz a afinidade pelo cálcio em 12 vezes levando a uma perda da atividade catalítica (ARNI & WARD, 1996). Naturalmente ocorrem PLA_2s homólogas cujo resíduo de Asp49 é substituído pelo de lisina (Lys49), serina ou alanina e portanto estas enzimas são cataliticamente inativas; porém, elas retêm sua atividade citolítica (HOMSI-BRANDEBURGO et al, 1988; LOMONTE et al, 1993) por meio de um processo independente de cálcio. Estruturas em cristal da PLA_2s Lys49 revelam que o grupo ε-amino das Lys49 está localizado na posição normalmente ocupada pelo íon cálcio nas PLA_2 Asp49 (ARNI & WARD, 1996; WARD et al, 2001). Esta substituição no "*loop*" ligante de

cálcio torna as PLA_2-Lys49 incapazes de se ligar ao cálcio, levando a uma inabilidade da proteína de estabilizar o intermediário tetraédico no mecanismo catalítico (ANDRIÃO-ESCARSO et al, 2000).

As PLA_2s utilizam em seu sítio catalítico o resíduo de histidina (His48) assistido por Asp49 para polarizar uma ligação com a água, o qual ataca o grupo carbonila do fosfolipídeo.

As PLA_2 são as únicas enzimas hidrolíticas que são altamente solúveis em água mas hidrolisam substratos fosfolipídeos Estas enzimas agem com maior eficiência quando seu substrato (fosfoglicerídeos) é parte de uma interface como uma micela ou membranas (OWNBY, et al, 1999; KINI, 2003).

Outras atividades tóxicas que podem ser independentes de sua atividade catalítica primária também estão associadas às PLA_2s de peçonhas de serpentes: hemolitica (KIHARA et al, 1992), miotóxica (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995), edematogênica (LLORET & MORENO, 1993), agregante plaquetária (YUAN et al, 1993), hemolítica indireta (CONDREA et al, 1981), hipotensiva (HUANG, 1984), cardiotóxica (FLETCHER et al, 1981) e anticoagulante (ALVARADO et al, 1988).

A necrose muscular pode ser devida a uma ação direta de PLA_2s miotóxicas sobre a membrana plasmática das células musculares, ou indireta, como por conseqüência de degenerações vasculares e isquêmicas, causadas por hemorraginas.

A análise da composição de aminoácidos indica que as PLA_2s miotóxicas são ricas em aminoácidos básicos e hidrofóbicos (HOMSI-BRANDEBURGO et al, 1988; LOMONTE et al, 1987).

As PLA_2s miotóxicas afetam principalmente membranas plasmáticas de músculo esquelético (LOMONTE et al, 1999). As PLA_2s Asp49 e Lys49 lisam rapidamente o sarcolema, causando necrose total, lesões em delta, inchaço mitocondrial e hipercontração de sarcomeros (MEBS & OWNBY, 1990). Nos casos das Asp49, cataliticamente ativas, esta desorganização da membrana é potencializada pela degradação enzimática de fosfolipídeos.

Um modelo hipotético foi proposto para o entendimento do mecanismo de ação das miotoxinas Lys49 (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995):

1. ligação da miotoxina em um sítio não identificado localizado na membrana sarcoplasmática;

2. interação eletrostática entre o sítio catiônico da toxina com grupos carregados negativamente na membrana;
3. penetração da miotoxina na bicamada por uma interação hidrofóbica mediada pela região citotóxica da molécula;
4. penetração da região citotóxica no centro da bicamada (o efeito seria a desorganização e ruptura da membrana, com conseqüente prejuízo na regulação da permeabilidade seletiva) e
5. grande influxo de íons cálcio e início de uma variedade de mecanismos degenerativos.

As miotoxinas isoladas da peçonha *Bothrops jararacussu* são Bothropstoxina I e Bothropstoxina II (HOMSI-BRANDEBURGO et al, 1988).

Bothropstoxina I (BthTX-I) é uma fosfolipase Lys49 de caráter básico com massa molecular de 13,7kDa e 121 resíduos de aminoácidos (WARD et al, 2001) e possui vários efeitos biológicos, incluindo mionecrose, edema de pata em camundongos, bloqueio neuromuscular irreversível e lise de células em cultura (SOARES et al, 2002).

1.2. Gênero *Crotalus*- Constituição da peçonha crotálica

A peçonha crotálica atua principalmente na parte central do sistema neural (neurotóxica), a vítima apresenta pouca dor ou nenhum sintoma no local da picada, fácies miastêmica caracterizada por ptose palpebral, diplopia, anisocoria e visão turva. O sangue da vítima apresenta dificuldade de coagulação. A atividade miotóxica também existe, aparecendo mioglobulina na urina da vítima, podendo ocorrer falência renal aguda com possíveis danos no coração e fígado (BARRAVIEIRA et al, 1995; MONTEIRO et al, 2001).

A peçonha crotálica é composta essencialmente por quatro toxinas principais (crotoxina, crotamina, giroxina, convulxina) e vários peptídeos (BARRAVIEIRA et al, 1995). A convulxina é um componente que induz convulsões (PRADO-FRANCHECHII et al, 1970) e a giroxina possui atividade similar à trombina (BARRIO et al, 1961).

Crotoxina é uma B-neurotoxina pré-sináptica presente nas peçonhas das cascavéis da América do Sul (LENON & KAISER, 1990). A crotoxina exerce seu

efeito patofisiológico bloqueando a transmissão neuromuscular. Ela age primeiramente em nível pré-sináptico alterando a liberação do neurotransmissor (FAURE & BON, 1987), entretanto, esta enzima também é capaz de agir pós-sinapticamente estabilizando o receptor de acetilcolina em um estado inativo (BON et al, 1979).

A crotoxina é um heterodímero composto de subunidades ligadas não-covalentemente: componente B (crotactina), uma proteína básica, de ~14,5 kDa, com atividade PLA_2, e o componente A (crotapotina), uma proteína ácida de ~9,5 kDa. O componente B é uma PLA_2 formada por cadeia única de 122 resíduos de aminoácidos e apresenta sete ligações de dissulfeto intracadeia (AIRD et al, 1986). O componente A é formado por três cadeias polipeptídicas ligadas por sete pontes dissulfeto (AIRD et al, 1986).

Os dois componentes se complexam e a associação espontaneamente inibe a atividade PLA_2 da crotactina mas aumenta a toxicidade em pelo menos uma ordem de magnitude. A crotactina apresenta moderada toxicidade enquanto a crotapotina é destituída de toxicidade e atividade enzimática. A adição da crotapotina aparentemente aumenta a toxicidade da crotactina. A dissociação das subunidades é reversível, e é proposto que a crotapotina funcione como uma molécula chaperonina, impedindo ligações não específicas na crotactina (CHANG, 1981) .

A crotamina é um peptídeo de caráter básico miotóxico, neurotóxico e não enzimático composto de cerca da 42 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 4.880. (MANCIN et al, 1998). Esta toxina induz a despolarização de membrana das células musculares, ativa os canais de sódio principalmente de fibras musculares esqueléticas (CUPO et al, 1990).

A mionecrose ativada pela crotamina difere da relatada para as PLA_2s miotóxicas e outros peptídeos citotóxicos (MEBS & OWNBY, 1990). Após as 12 primeiras horas da administração *in vivo* da crotamina, quase não ocorre mudança na morfologia do músculo esquelético, exceto pela dilatação do retículo sarcoplasmático. Após 48 horas, a mitocôndria torna-se inchada e a miofibrilas sofrem degeneração sem que o sarcolema e os túbulos-T sejam afetados. Embora não exista alteração morfológica no sarcolema detectáveis por microscopia eletrônica, esta toxina ainda pode causar alterações na função de

proteínas do sarcolema, como a ativação do canal de sódio (LOMONTE et al, 1999; FLETCHER et al, 1996).

2. Definição e características das neoplasias

Neoplasia é uma proliferação celular autônoma, geralmente acompanhada de perda da diferenciação, caracterizada por ser uma massa anormal de tecido cujo crescimento e divisão se mostra desordenado, quando comparado ao dos tecidos normais, e persiste da mesma maneira excessiva, mesmo depois de cessado o estímulo que provocou todas as mudanças (AMORIM, 1964; BRASILEIRO-FILHO, 2004).

As neoplasias são formadas por células que apresentam certas propriedades particulares que as distinguem das células normais. As principais características de uma célula cancerosa são a possibilidade de um número, teoricamente ilimitado de divisões e a perda da inibição de sua multiplicação quando entram em contato com outra célula (inibição de contato); isto é, quando as células atingem um estado de confluência (as membranas plasmáticas se tocam). Células neoplásicas continuam se multiplicando e passam a formar pilhas de células superpostas (ÉTIENNE, 2003; BRASILEIRO-FILHO, 2004).

As células cancerígenas têm menor adesão entre si devido aos seguintes mecanismos (ETIENNE, 2003; BRASILEIRO-FILHO, 2004):

1. modificações e irregularidades na membrana plasmática;
2. diminuição de estruturas juncionais;
3. redução de moléculas de adesão e
4. liberação de enzimas proteolíticas que alteram o glicocálice.

A destruição da matriz extracelular é indispensável para permitir o deslocamento das células neoplásicas, além de representar o principal mecanismo da capacidade invasiva destas células (FULOP & LARBI, 2002).

As células tumorais expressam metaloproteases de matriz extracelular, as principais são a metaloprotease 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9). Estas enzimas degradam o colágeno do tipo IV, o principal componente da membrana basal. A MMP-2 (gelatinase A) é a mais amplamente distribuída das MMPs e é expressa constitutivante pela maioria das células. A MMP-9 (gelatinase B) é produzida por

células inflamatórias, incluindo neutrófilos e macrófagos teciduais (POLETTEM et al, 1998; FODA et al, 2001).

A atividade incontrolada das metaloproteases promove a progressão do tumor de modo direto catalisando a degradação da matriz extracelular ou indiretamente, pela liberação de fatores de crescimento ligados à matriz (FODA et al, 2001).

A superexpressão de metaloproteases é relacionada com carcinomas humanos, como os de estômago, pulmão , próstata e mama (HERNANDEZ-BARRANTES et al, 2002).

Uma característica das células cancerígenas é a habilidade de sofrer uma extensiva proliferação por meio da superprodução de fatores de crescimento e/ou superexpressão de receptores para estes fatores de crescimento (ADAM et al, 2003).

Os tumores necessitam de oxigênio e nutrientes, que são providos por novos vasos sanguíneos que permeiam a massa tumoral. As células tumorais ativam a angiogênese pela secreção de fatores de crescimento e expressão de receptores (ADAM et al, 2003; SIEMANN et al, 2004).

Além das células neoplásicas, os tumores têm células estromais as quais fornecem um arcabouço para sustentação e nutrição das mesmas. Quanto mais rápido o crescimento tumoral, menor é a quantidade de estroma e mais comum a presença de necrose devido à nutrição deficiente das células em proliferação.

2.1- Classificação das neoplasias

O termo câncer é a tradução latina da palavra grega carcinoma (de *karinos*= crustáceo, caranguejo). Foi usado pela primeira vez por Galeno (aproximadamente 138-201 d.C.) para indicar um tumor maligno da mama no qual as veias superficiais deste órgão eram túrgidas e ramificadas, lembrando as patas de um caranguejo. O termo generalizou-se e hoje é usado para indicar qualquer neoplasia maligna (AMORIM, 1964; BRASILEIRO-FILHO, 2004).

Existem praticamente 800 tipos de neoplasias que são classificados de acordo com três critérios: 1) pelo comportamento clínico (benigno ou maligno); 2)

pelo aspecto microscópico (histomorfológico) e 3) pela origem da neoplasia (histogênico).

O critério mais utilizado é o histomorfológico, no qual a neoplasia é identificada pelo tecido ou célula que está se proliferando (AMORIM, 1964; BRASILEIRO-FILHO, 2004). A denominação é feita utilizando o sufixo "-oma", que designa qualquer neoplasia; a palavra carcinoma indica tumor maligno que reproduz epitélio de revestimento; e o termo sarcoma indica tumor maligno mesenquimal (BRASILEIRO-FILHO, 2004).

As neoplasias benignas muitas vezes não representam grande problema para seus portadores, porém alguns efeitos lesivos podem ocorrer: obstrução de órgãos ou estruturas ocas, compressão de órgãos podendo causar isquemias e morte do tecido (BRASILEIRO-FILHO, 2004).

Em geral as neoplasias benignas apresentam baixa taxa de crescimento, tipo de crescimento expansivo e limites bem definidos (BRASILEIRO-FILHO, 2004).

Em contraste, as malignas em geral, têm crescimento rápido e infiltrativo, não se observa limite do tumor e muitas vezes provocam perturbações homeostáticas graves que acabam levando o paciente à morte (BRASILEIRO-FILHO, 2004).

2.2. Causas do câncer

O câncer pode estar ligado a múltiplas causas: pode ter relação com desequilíbrios hormonais (alguns cânceres de mama); estar ligado ao ambiente, como nas radiações emitidas pelo sol (nos cânceres da pele), a radiações radiativas (nos cânceres do sangue); ao tabaco (no câncer do pulmão); a certas gorduras ou alguns produtos químicos utilizados como aditivos alimentares (nos cânceres do cólon), etc (ÉTIENNE, 2003).

Somente alguns tipos de câncer, que representam uma pequena percentagem de câncer humano, estão ligados a vírus. Trata-se então de vírus com DNA, como por exemplo, o vírus da hepatite B no câncer primitivo do fígado, o câncer de Epstein-Bairr no linfoma de Burkitt e nos tumores da rinofaringe, ou ainda papilomavírus em alguns tipos de câncer cutâneo e genital. Entre os vírus

com RNA, só na família dos retrovírus que foram identificados dois vírus humanos, o vírus HTLV-1 e II (*Human T lymphocytotropic viruses*), associados ao desenvolvimento de leucemias e de linfomas (ÉTIENNE, 2003; BRASILEIRO-FILHO, 2004).

As alterações genéticas responsáveis pelo aparecimento de uma neoplasia podem ser devido à aquisição de oncogenes ou à perda de genes funcionais que protegem a célula de uma divisão descontrolada (supressores de tumor) (ÉTIENNE, 2003; BRASILEIRO-FILHO, 2004).

Oncogenes são genes mutantes que codificam proteínas importantes para o crescimento e diferenciação celular. Podem ser introduzidos em um hospedeiro por infecção viral, ou podem aparecer pela mutação de um gene normal que controla a divisão celular. Os oncogenes ativam vias de sinalização levando a uma formação inapropriada de fatores de transcrição e/ou receptores anormais para fatores de crescimento. Os genes supressores de tumor codificam proteínas que impedem uma divisão celular descontrolada por reprimir alguns oncogenes (ÉTIENNE, 2003; MAREK et al, 2003).

2.3. Imunidade para o tumor

O sistema imunológico do hospedeiro age por meio das respostas humoral e celular para eliminar células tumorais. Para tumores sólidos a reação mediada por células é mais eficiente do que a humoral. No entanto, esta também coopera com a resposta celular e parece que o efeito final depende da ação conjunta de ambas (ABBAS et al, 2000).

Os macrófagos são as células mais eficientes na destruição de células tumorais, eles lisam as células por meio da produção de TNFα, radicais livres do oxigênio ou por citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ABBAS et al, 2000).

As células NK (*natural killer*) constituem importante mecanismo de defesa do organismo, pois são capazes de reconhecer e destruir células neoplásicas por meio de lise direta ou dependente de anticorpos (ABBAS et al, 2000).

A resposta imune freqüentemente falha em impedir crescimento do tumor pois as células tumorais são derivadas de células hospedeiras e, portanto,

assemelham-se com células normais em muitos aspectos, isto é, a maioria dos tumores expressa somente poucos antígenos que podem ser reconhecidos como não-próprios, e como resultado, a maioria tende a ser fracamente imunogênico. (ADAM et al, 2003). O rápido crescimento e espalhamento do tumor podem sobrecarregar a capacidade do sistema imune de erradicar o tumor. Muitos tumores possuem mecanismos especializados de evasão da resposta imune.

2.4. Antineoplásicos

A maioria dos medicamentos antineoplásicos inibe as mitoses, interfere com o metabolismo dos ácidos nucléicos ou promove distúrbios específicos de processos bioquímicos, como inibição de certas reações enzimáticas (ZANINI & OGA,1994).

Pelo seu modo de ação, os quimioterápicos utilizados na terapêutica antineoplásica podem ser classificados em: (1) agentes alquilantes, (2) antimetabólitos, (3) medicamentos obtidos por produção natural, como antibióticos ou alcalóides e (4) hormônios (ZANINI & OGA,1994; ÉTIENNE, 2003).

A característica dos agentes alquilantes é a liberação de radicais alquila, após metabolização. Geralmente apresentam dois ou mais grupos terminais cíclicos ou insaturados, ou são convertidos nestas formas em meio aquoso. Em face disto, esses grupos são capazes de se ligarem a outras moléculas indispensáveis à economia celular, podendo fazer ligações cruzadas com o DNA e bloqueando a divisão celular (ZANINI & OGA,1994; ÉTIENNE, 2003).

Os antimetabólitos são análogos estruturais de substâncias em ocorrência vital para o seu metabolismo. Deste modo, eles interferem com a biossíntese das purinas e pirimidinas, inibindo a produção de precursores normais. Privam, portanto, a célula neoplásica de substratos ou cofatores fundamentais necessários para a síntese do DNA ou, mesmo, são incorporados como falsos precursores. Em geral os agentes antimetabólitos atuam na célula que se encontra no período S do ciclo celular. As principais substâncias deste grupo são representadas por análogos do ácido fólico, pirimidinas ou purinas (ZANINI & OGA,1994; ÉTIENNE, 2003).

Infelizmente esses medicamentos não são seletivos para as células cancerosas e agem sobre todas as células. Eles podem bloquear a replicação de células como as da medula óssea que sintetizam os precursores dos glóbulos brancos e vermelhos, provocando assim uma grave diminuição desses elementos sanguíneos (ZANINI & OGA,1994).

As resistências que se desenvolvem aos medicamentos anticancerígenos podem dever-se à amplificação de um gene chamado mdr (*multi drug resistance*), esse gene codifica uma proteína membranária (gp 170), que expulsa para fora da célula as moléculas antitumorais administradas (ÉTIENNE, 2003).

Muitas substâncias oriundas de plantas e microorganismos possuem atividade antineoplásica. Do grande esforço dispendido em testes farmacológicos em tumores experimentais, resultaram alguns citostáticos extraídos de plantas (vincristina, vimblastina), alguns antibióticos e enzimas (1-asparaginase) com ação útil no homem (ZANINI & OGA,1994; DAS, 2002; ÉTIENNE, 2003).

Os alcalóides da vinca, *Catharantus roseus*, a vincristina e vimblastina, ligam-se a proteínas componentes dos microtúbulos celulares. Isto interfere com a formação do fuso cromático, o que leva à paralisação da divisão na metáfase mitótica (ZANINI & OGA,1994; ÉTIENNE, 2003).

Outros tipos de procedimentos terapêuticos, como a radioterapia, a cirurgia e o homotransplante de medula têm permitido notáveis resultados. O conjunto de tratamentos disponíveis aumentou, em muito, a sobrevida de pacientes com neoplasias malignas, especialmente no controle de neoplasias hematológicas e linfóides, sendo admitidos em diversos casos na cura de coriocarcinoma, tumor de Wilms e doença de Hodgkin (ÉTIENNE, 2003).

A imunoterapia das neoplasias, embora ainda incipiente, tem apresentado resultados animadores, dando suporte a diversos pesquisadores que acreditam que o estado neoplásico inibe as respostas imunológicas do indivíduo, o que facilitaria a disseminação da doença. Os vários métodos imunológicos atualmente utilizados consistem em: (a) imunização ativa com células ou extratos celulares de tumores, cujas células são susceptíveis à terapia por radiação ou neuroamidase; (b) transferência da imunidade por meio de linfócitos ou extratos linfocitários de doadores; (c) transferência de anticorpos citotóxico específico e (d) tratamento

com agentes que estimulam a reatividade imunológica geral, como o interferon, ou que interferem com ela, como o levamitol (ZANINI & OGA,1994).

O interesse de testar peçonhas de serpentes como agentes antitumorais é relatado desde o início do século passado, quando Calmette et al (1933) demonstraram a atividade antitumoral da peçonha de *Naja* sp em células de adenocarcinomas. Desde então muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com este propósito (COTTE et al, 1972; CARVALHO et al, 2001).

As peçonhas atuam por diferentes mecanismos capazes de afetar o desenvolvimento do tumor, elas podem agir diretamente, por meio de uma ação lítica ou indiretamente destruindo o microambiente produzido pelo tumor ou ainda, pela indução da liberação de mediadores da resposta inflamatória, que compensam a falta de uma resposta induzida pelo tumor (LOMONTE et al, 1993).

Assim, o estudo das atividades antineoplásicas de algumas toxinas isoladas das serpentes brasileiras, poderá fornecer novas informações para subsidiar as investigações a respeito de mecanismos envolvidos no desenvolvimento de processoss tumorais, bem com no controle e/ou erradicação de células neoplásicas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade citotóxica *in vitro* da Bothropstoxina-I (BthTX-I) e da Crotamina frente a diversas linhagens celulares, bem como avaliar a atividade antitumoral da BthTX-I contra o desenvolvimento do tumor sólido do Sarcoma 180 implantado em camundongos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* da BthTX-I em células tumorais (SK-BR-3; Jurkat; B16F10 e S180), macrófagos peritoneais e linhagens de bactérias (*Escherichia coli* e *Staphilococus aureus*);

2. Avaliação do efeito das modificações químicas dos resíduos de aminoácidos (histidina, triptofano e tirosina) sobre a atividade citototóxica *in vitro* da BthTX-I;

3. Avaliar a atividade citotóxica da crotamina *in vitro* em Sarcoma 180 e macrófagos peritoneais;

4. Avaliar o efeito antitumoral da BthTX-I em camundongos implantados com tumor sólido (S180);

5. Analisar o efeito da modificação química do resíduo de aminoácido (histidina) sobre o efeito antitumoral da BthTX-I em camundongos implantados com tumor sólido (S180).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. LICHTMAN, A. H. AND POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**. 4ed. 2000, 553p.

ADAM, J. K.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Immune response in cancer. **Pharmacol. & Ther**., 99:113-32, 2003.

AIRD, S. D.; KAISER, R. V.; LEWIS, W. G. et al. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Arch. of Biochem. and Biophys.**, 249: 296-300, 1986.

ALVARADO, J. AND GUTIÉRREZ, J. M. Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A_2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidade). **Rev. Biol. Trop.**, 36:563-5, 1988.

AMARAL, C. F. S.; DA SILVA, A. A.; GODOY, P. et al. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. **Toxicon**, 23: 877-85, 1985.

AMORIM, M. F. **Patologia dos tumores (Princípios Fundamentais de Cancerologia)** São Paulo-SP, Fundo Editorial Procienx,1964, 370p.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.et al. Myotoxic phospholipase A_2 in *Bothrops* snake venom: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*, **Biochimie**, 82: 755-63, 2000.

ARNI, R. K. AND WARD, R, J. Phospholipases A_2- A structural review. **Toxicon**, 34: 827-41, 1996.

BARIO, A. Gyroxin a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta. Physiol. Latinoam**. 11: 221, 1961.

BARRAVIEIRA, B. **Venenos animais: Uma visão integrada.** Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas LTDA, 1995. 411p.

BASU, J.; MAJUNDARR, G.; DUTTA, A. et al. Acute renal failure following snake bite (viper). **J. Ass. Phys. India**, 25: 883-92, 1977.

BJNARSON, J. W. AND FOX, J. W. Hemorragic toxins from snake venoms. **Pharmacol. Ther.**, 62: 325-72, 1994.

BOM, C.; CHANGEAUX, J. P.; JENG, T. W. et al. Post-synaptic effects of crotoxin and its isolated subunits. **Eur. J. Biochem.**, 99: 471-81, 1979.

BOSCH, H. V. Intracelular phospholipases A. Biochem. **Biophys. Acta**, 604: 191-246, 1980.

BRASILEIRO-FILHO, G. . **Bogliolo Patologia Geral**, Geraldo Brasileiro Filho, 3° ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ, 2004, 367p.

CALMETTE, A.; SAENZ, A.; COSTIL, L. Effects du venim de cobra sur les greffes cancereuses et le cancer spontane (adeno-carcinome) de la souris. **Acad. Sci.**, 197: 205-17, 1933.

CARVALHO, D. D.; SCHMITMEIER, S.; NOVELLO et al Effect of BJccL (a lectin from the venom of snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and tumor and endothelial cells. **Toxicon**, 39: 1471-6, 2001.

CHANG, C. AND SU, M. J. A study of the interaction of crotapotin with crotoxin phospholipase A2, notexin and others presymnaptic neurotoxins. **Br. J. Pharmacol.**, 73: 495-503, 1981.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V. AND WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, 29(11): 1279- 303, 1991.

CONDREA, E.; YANG, C. C. AND ROSEMBERG, P. Lack correlation between the anticoagulant activity and phospholipase hydrolysis snake venom phospholipase A_2. **Thromb. Hemostasis**, 45; 82-9, 1981.

COTTE, C. A. ESSENFELD-YAHIR, E. AND LAIRET, C. Effect of *Crotalus* and *Bothrops* venom on normal and malignant cells cultivated in vitro. **Toxicon**, 10: 157-61, 1972.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M. AND HERING, S. E. Acute myocardial infarctio-like enzyme profile in human victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 84: 447-51, 1990.

DAS, S. Garlic- A natural source of cancer preventive compounds. **A. P. J. C. P.**, 3:305-11, 2002.

DENIZOT, Y.; DULERY, C.; DESPLAT, V. et al Incorporation and effect of arachidonic acid on the growth of the human K562 cell line. **Cancer Letters**, 139: 75-8, 1999.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A_2. **J. Biol. Chem.**, 269: 13057-60, 1994.

DENNIS, E. A. The growing phospholipase A_2 superfamily of signal transduction enzymes. **TiBS**, 22:1-2, 1997.

DESSEN, A. Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A_2. **Biochim. Biophys. Acta**, 1488: 40-7, 2000.

ÉTIENNE, J. **Bioquímica Genética e Biologia Molecular**, 5º ed, Santos Livraria Editora, São Paulo-SP. 2003, 504p.

FAN, C. Y.; QIAN, Y. C.; YANG, S. L.; et al. Cloning, sequence analysis and expression in *E. coli* of the $_c$DNA of Thrombim-like enzyme (Pallabin) from the venom of *Agkistrodon halys pallas*. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, 47: 217-25, 1999.

FAURE, G. AND BON, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the south American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* . **Toxicon**, 25: 229-34, 1987.

FLETCHER, J. E.; HUBERT, M.; WIELAND, S. J.;et al. Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. **Toxicon**, 34(11/12): 1301-11, 1996.

FLETCHER, J. E.; RAPUANO, B. E.; CONDREA, E.; et al. relationship between catalysis and toxicological properties of three phospholipase A_2 from elapid snake venom. **Toxic. Appl. Pharmac.**, 59; 375-82, 1981.

FODA, H. D. AND ZUCKER, S. Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. **Drug Discovery Today**, 6: (9): 478-82, 2001.

FULOP, T. AND LARBI, A. Putative role of 67 kDa elastin-laminin receptor in tumor invasion. **Sem. Cancer Biol.**. 12; 219-29, 2002.

GUTIÉRREZ, J. M. AND LOMONTE, B. Phospholipase A_2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, 33:1405-24, 1995.

GUTIERREZ, J. M. AND RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Theis role the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, 82: 841-50, 2000.

HERNARDEZ-BARRANTES, S.; BERNARDO, M.; TOTH, M. et al. Regulation of membrane type metalloproteinases. **Sem. Cancer Biol.**, 22: 131-8, 2002.

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L. S.; SANTOS-NETO, H.et al. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biologicala ctivity of bothropstoxin. **Toxicon**, 26: 615-27, 1988.

HUANG, H. C. Realese of slow reacting substance from the guinea-pig lung by phospholipase A_2 of *Viperidae russelli* snake venom. **Toxicon**, 22:359-65, 1984.

HUANG, R. C.; HUNG. C. C.; AND CHIOU. S. H. Characterization of three fibrinogenolitic proteases isolated from the venom of Taiwan habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*). **Biochem. Mol. Biol. Int.**, 31:1041-50, 1993.

KAMIGUTI, A. S.; ZUZEL, M. AND THEAKSTON, R. G. D. Snake venoms metalloproteases and disintegrins: interactions with cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 31: 853-62, 1998.

KIHARA, H.; UCHIKAWA, R.; HATTORI, R. et al. Myotoxic and physiological effects of three *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A_2. **Biochem. Int.**, 28:895-903, 1992.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A_2 enzymes. **Toxicon**, 42:827-40, 2003.

KUDO, I.; MURAKAMI, M.; HARA, S.; et al. Mammalian non-pancreatic phospholipase A_2. **Biochem. Biophys. Acta**, 117: 217-31, 1993.

LLORET, S. AND MORENO, J. J. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A_2 purified from porcine pancreas and snake venoms. **Toxicon**, 31: 949-56, 1993.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y,. RUFINI, S. et al. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipase A_2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells *in vitro*. **Toxicon**, 37:145-58, 1999.

LOMONTE, B.; MORENO, E. AND GUTIÉRREZ, J. M. Detection of proteins antigenically related to *Bothrops asper* myotoxin in crotaline snake venoms. **Toxicon**, 25(9): 947-55, 1987.

LOMONTE, B; TARKOWSKI, A. AND HANSON, L. A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells and cytokines release in a mouse model. **Inflammation**, 17: 93-105, 1993.

MANCIN, A. C.; SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.;et al. The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South merican rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. **Toxicon**, 36(12): 1927-37, 1998.

MARAGANORE, J. M.; MERUTKA, G.; CHO, W. et al. A group of phospholipases A_2 with lysine instead of aspartat 49. **J. Biol. Chem.**, 259: 13839-43, 1984.

MAREK J.; WITOLD L.; JAKUB G.A. Natural mechanisms protecting against cancer. Immunol. **Letters**, 90: 103–122, 2003.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, 36: 1749-800, 1998.

MEBS, D. AND OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharm. Ther.**, 48: 223-36, 1990.

MOLLIER, P.; CHWETZOFF, S. AND MENEZ, A. A monoclonal antibody recognizing a conserved epitope in a group of phospholipase A_2. **Mol. Immunol.**, 27: 7-15, 1990.

MONTEIRO, H. S. A.; DA SILVA, I. M. S. C.; MARTINS, A. M. C. et al. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 34(10): 1347-52, 2001.

MUKHERJEE, A. B.; MIELE, L. AND PATTABIRAMAN, N. Phospholipase A_2 enzymes regulation and physiological role. **Biochem. Pharmacol.**, 48: 1-10, 1994.

OGILVIE, M. L. AND GARTNER, T. K. Identification of lectins in snake venoms. **J. Herpet.**, 18: 285-90, 1984.

OGILVIE, M. L.; BYL, J. A. W. AND GARTNER, T. K. Platelet-aggregation is stimulated by lactose-inhibitable snake venom lectins. **Thromb. Haemostasis**, 62: 704-7, 1989.

OHNO, M.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; et al Molecular evolution of myotoxin phospholipase A_2 from snake venom. **Toxicon**, 42: 841-54, 2004.

OWNBY, C. L., SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P. FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A_2 proteins. **Toxicon**, 37: 411-45, 1999.

PETRESTSKI, J. H.; KANASHIRO, M.; SILVA, C. P.et al. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. **Braz. J. Med. Biol. Res**, 33: 1293-1300, 2000.

POLETTE, M. AND BIREMBAUT, P. Membrane-type metalloproteinases in tumor invasion. **International J. Biochem. & Cell Biol.**, 30: 1195-1202, 1998

PRADO-FRANCHETI, J. Estudo sobre convulxina. **Tese de Doutoramento**. UNICAMP. Campinas-SP, 1970.

RENETSEDER, R.; BRINIE, S.; DIJKSTRA, B. W.; et al. A comparison of the crystal structural of phospholipase A_2 from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **J. Biol. Chem.**, 260: 11627-34, 1985.

SCHIMIDT, M. E.; ABDELBAKI, Y, Z. AND TU, A. T. Nephotoxic action of rattlesnake and sea snake venoms: an electron-microcopic study. **J. Path.**, 118: 49-53, 1976.

SIEMANN, D. W. AND SHI, W. effecacy of combined antiangiogenic and vascular disrupting agents in treatment of solid tumors. **Int. J. Radiation Biol. Phys.**, 60: 1233-40, 2004.

DA SILVA, O. A.; LÓPEZ, M. AND GODOY, P. Intensive care unit treatment of acute renal failure following snake bite. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 28:401-11, 1979.

SOARES, A. M.; OSHIMA-FRANCO, Y.; VIEIRA, C. A. et al. Mn^{2+} íons reduce the enzimatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxin Lys 49 phospholipase A_2 homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Intern. J. Biochem. & Cell Biol.**, 34:668-677.

VERHEIJ, H. M.; VOLWERK, J. J.; JANSEN, E. H. J. et al. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A_2 role of histidine and calcium ion catalytic mechanism. **Biochemistry**. 19: 743-50, 1980.

WARD, R. J.; de OLIVEIRA, A. H. C.; BORTOLETO, R. K.; et al. Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys49-Phospholipase A_2 homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Prot. Expr. & Purification**, 21: 134-140, 2001.

YUAN, Y.; JACKSOON, S. P.; MITCHEL, C. A. et al. Purification and characterization of a snake venom phospholipase A_2: a potent inhibitor of platelet aggregation. **Thromb. Res.**, 70:471-81, 1993.

ZANINI, C. A. AND OGA, S. **Farmacologia Aplicada**, 5° edi, Atheneu Editora São Paulo, 1994, 739p.

CAPITULO ÚNICO

EFEITO CITOTÓXICO E ANTITUMORAL DA BOTHROPSTOXINA-I E DA CROTAMINA

RESUMO

BthTX-I e Crotamina são miotoxinas não enzimáticas isoladas das peçonhas de *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus* respectivamente Os objetivos deste trabalho foram avaliar a ação *in vitro* da BthTX-I nativa e modificada e da crotamina sobre diversas linhagens celulares e na proliferação de bactérias gram positiva e negativa; verificar o efeito da BthTX-I (nativa e modificada com BPB), sobre crescimento do tumor induzido por S180 em camundongos. Os ensaios *in vitro* mostraram que BthTX-I nativa ou modificada nos resíduos de Trp, Tyr ou His, bem como crotamina incubadas separadamente em diferentes concentrações com linhagens celulares, reduziu a viabilidade celular em um padrão dose dependente. BthTX-I (1μg/μL) produziu 100% de morte em linhagem Jurkat, 90% em macrófagos, S180 e B16F10, 45% em Sk-BR-3; enquanto BthTX-I BPB (1μg/μL) mostrou 20-40% de citotoxicidade em todas as linhagens testadas; e na mesma concentração as BthTX-I modificadas nos resíduos de Tyr e Trp, mostraram citotoxicidade de 50-60% para S180 e 20-40% sobre macrófagos. A crotamina (1μg/μL) apresentou citotoxicidade de 75% sobre S180 e 20% sobre macrófagos. A atividade bactericida da BthTX-I (0,8 μg/μL) frente a *E. coli* e *S. aureus* foi de aproximadamente 100%, enquanto que as modificações químicas reduziram esta atividade Camundongos (n=5) inoculados com S180 ($6X10^6$ células, i.m.) na virilha desenvolveram um tumor sólido que se tornou evidente em 5 dias, apresentando alterações histopatológicas no músculo da coxa. BthTX-I e

BthTX-I BPB (50μg/μL, i.m.) administradas em camundongos no 5º dia após inoculação i.m. de células S180 na virilha, reduziram o volume de tumor em 30% no 14° dia e 80% no 60º dia, além de reduzir as alterações histopatológicas. Tais resultados demonstram que BthTX-I e crotamina possuem atividade citótoxica sobre linhagens celulares testadas *in vitro* e a atividade citotóxica de BthTX-I após modificação por BPB foi atenuada, sugerindo que o resíduo de His tem um papel importante na citotoxidade; a inibição do crescimento do tumor sólido em camundongos tratados com BthTX-I ou BthTX-I BPB foram similares, sugerindo que o mecanismo antitumoral da toxina possa ser independente da atividade citotóxica.

Palavras chaves: BthTX-I, crotamina, citotoxicidade e células tumorais.

ABSTRACT

BthTX-I and Crotamine are non enzymatic myotoxins isolated from *Bothrops jararacussu* venom and *Crotalus durissus terrificus* respectively. The aims of this work were to evaluate the action of BthTX-I (native or modified) and crotamine (*in vitro*) on cells lines and on the bacterial proliferation; and the native and modified BthTX-I on the growth of the tumor induced by the Sarcoma 180 (S180) in mice. The *in vitro* assays showed that native and modified BthTX-I and crotamine incubated separately in different concentrations with different cells lines, reduced the cellular viability in a dose dependent manner. BthTX-I (1μg/μL) produces 100% cellular death on Jurkat, 90% in macrophages, S180 and B16F10, 45% in Sk-BR-3; while BthTX-I BPB (1μg/μL) showed 20-40% of cytotoxicity on all of cellular lines. BthTX -I modified in the Tyr and Trp residues, showed 50-60% of cytotoxicity for S180 and 20-40% for macrophages. Crotamine (1μg/μL) showed of 75% on S180 and 20% on macrophages. The bactericidal activity of BthTX-I (0, 8 μg /μL) against *E. coli* and *S. aureus* was of approximately 100%, while the chemical modification reduced this activity Mice (n=5) inoculated with S180 in the groin (i.m.) developed a tumor developed a solid tumor that became evident after 5 days, presenting histological alterations. BthTX-I and BthTX-I BPB (50μg/μL, i.m.) injection administered in mice on the 5th day after the inoculation of S180 cell in the groin (i. m.) reduced the tumor volume in 30% in the 14th day and 80% in the 60th day, besides reducing the histological alterations. These results demonstrate

that BthTX-I and crotamine possess hight cytotoxic activity on the cellular lines tested *in vitro* and the cytotoxicity of BthTX-I after the modification by BPB was lower suggesting that the His residue has an important role in the cytotoxicity; the inhibition of the growth of the solid tumor in mice treated with BthTX- I or BthTX-I BPB were similar, suggesting that the mechanism antitumoral of the toxin can be independent of the cytotoxicity activity.

Key word: BthTX-I, crotamine, cytotoxicity and tumor cells.

1. INTRODUÇÃO

O interesse de testar peçonhas de serpentes como agentes antitumorais é relatado desde o início do século passado, quando Calmette et al (1933) demonstrou a atividade antitumoral da peçonha de *Naja* sp em células de adenocarcinomas. Desde então muitos trabalhos foram realizados com este propósito (COTTE et al, 1972; CARVALHO et al, 2001).

As peçonhas possuem diferentes mecanismos que afetam o desenvolvimento do tumor, elas podem agir diretamente, através de uma ação lítica ou indiretamente destruindo o microambiente produzido pelo tumor ou pela indução da liberação de mediadores da resposta inflamatória, que compensam a falta de uma resposta induzida pelo tumor (LOMONTE et al, 1994).

Peçonhas de serpente inibem a adesão, migração e crescimento de células tumorais e metástase (KNUDSEN et al, 1988).

Abu-Sinna et al (2003) demonstraram a inibição do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos, utilizando frações letais e não letais isoladas da peçonha de *Cerastes cerastes cerastes*, resultando em um aumento no tempo de sobrevivência e na diminuição da porcentagem de crescimento do tumor.

As peçonhas também induzem apoptose em tumores, Souza et al (1999) demonstraram que a L-aminoácido oxidase isolada da peçonha de *Agkistrondon contortrix laticintus* induz a apoptose de linhagens de leucemia promielocítica .

VRCTC-310-Onco é um novo produto farmacêutico desenvolvido como agente anti-neoplásico, ele é composto de crotoxina de *C. durissus terrificus* e cardiotoxima de *Naja naja atra*. Estudo *in vitro* e *in vivo* durante a avaliação pré-clínica mostraram que VRCTC-310-Onco induz uma citotoxicidade em várias linhagens tumorais humanas (STANCHI et al, 2002).

Carvalhho et al (2001), utilizando uma lectina isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu* inibiu a adesão e crescimento de células endoteliais e tumorais.

Jararagina, uma metaloprotease isolada da peçonha de *B. jararaca*, reduziu a migração e invasão de células tumorais *in vivo* e demonstrou alta citotoxicidade *in vitro* (CORREA et al, 2002).

O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade citotóxica *in vitro* da crotamina e da BthTX-I (nativa ou com modificações químicas) frente a células tumorais e normais e avaliar a atividade antitumoral *in vivo* da BthTX-I (nativa ou com modificação química) contra o tumor sólido implantado em camundongos.

Bothropstoxina I (BthTX-I) é uma fosfolipase Lys49 de caráter básico com massa molecular de 13,7kDa e 121 resíduos de aminoácidos (WARD et al, 2001) e possui vários efeitos biológicos, incluindo mionecrose, edema de pata em camundongos, bloqueio neuromuscular irreversível (SOARES et al, 2003). Além destes efeitos BthTX-I e capaz de lisar células quando testadas em cultura. Soares et al (2000) demonstraram uma atividade de 100% de citotóxicidade em células endoteliais (tEnd) e mioblastos (C2C12), devido a este fato escolhemos BthTX-I para nosso modelo de estudo frente a linhagens de células tumorais *in vitro.*

A crotamina é um peptídeo miotóxico e neurotóxico, não enzimático composto de cerca de 42 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 4.880, de caráter básico (MANCIN et al, 1998). Esta toxina induz a despolarização de membrana das células muscular e ativa os canais de sódio, principalmente de fibras musculares esqueléticas (CUPO et al, 1990).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. PEÇONHAS

As peçonhas de *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus durissus* foram obtidas na Penthapharm do Brasil mantidas a -20°C.

2. 2. TOXINAS

A Bothropstoxina-I (BthTX-I) (nativa e modificada quimicamente) e a crotamina foram cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Andreimar Martins Soares da UNAERP- Ribeirão Preto-SP.

Bothopstoxina-I foi purificada da peçonha de *Bothrops jararacussu* conforme a metodologia descrita por Soares et al (1998).

A modificação química do resíduo de His-48 da BthTX-I foi feita com brometo de p-bromofenacila (BPB) segundo método descrito por Díaz-Oreiro & Gutiérrez (1997), com as seguintes modificações: cerca de 3 mg da BthTX-I foi dissolvida em 1mL de bicarbonato de amônio 0,1M, pH 8,0, contendo EDTA 0,7mM, e incubados com 125µL de BPB (1,5mg/mL em etanol). Após incubação por 24 horas, à temperatura ambiente, a solução protéica foi centrifugada a 7.000 rpm por 10 minutos para retirar o reagente precipitado, e o sobrenadante foi lavado várias vezes, em sistema de ultrafiltração (AMICON) com membrana YM-3 e tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH8,0, até que a absorbância do descarte estivesse semelhante à leitura do tampão (A_{280nm}= 0,001). O controle da

toxina foi feito como descrito anteriormente, fazendo-se a incubação somente com 125 μL do etanol sem o reagente.

O reagente cloreto de o-nitrofenilsulfonila (NPSC) foi utilizado para modificar resíduos de Trp, seguindo a metodologia descrita por Takasaki et al (1990).

Para a realização da modificação química dos resíduos de tirosina da BthTX-I, utilizou-se o reagente fluoreto de 2-nitrobenzenosulfenila (NBSF), seguindo a metodologia descrita por Soons et al (1986).

Crotamina foi purificada da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* seguindo a metodologia descrita por Mancin et al (1998).

2.3. ANIMAIS

Os camundongos Swiss (25-30g) foram fornecidos pela Vallé; os camundongos isogênicos da linhagem Balb/C (18-23g) foram adquiridos no Biotério Central da USP (Ribeirão Preto, SP).

2.4. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As dosagens de proteínas em soluções de 0,1 a 2,0 mg/2,0 mL de solução foram realizadas pelo método de micro-biureto conforme descrito por Itzaki & Gill (1964). A reta padrão foi construída utilizando a soroalbumina bovina como proteína padrão, considerando-se o seu coeficiente de extinção molar em A280 nm (0,666).

2.5. MEIO DE CULTURA CELULAR PARA CÉLULAS TUMORAIS E MACRÓFAGOS

Para a manutenção das linhagens de células tumorais e macrófagos, seguiram-se o protocolo do ATCC (*American Type Culture Collection*), utilizando meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 20mM de L-glutamina, 7,5% de bicarbonato de sódio, 10 μg/mL de gentamicina, 100 mg/mL de estreptomicina, 100 mM de aminoácidos não essenciais, 1 mM de piruvato de

sódio e 50 mM de 2-mercaptoethanol (meio completo). Este meio foi preparado na hora do uso e esterilizado por filtração em membranas de 0,22μm.

2.6. LINHAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANA E DE CAMUNDONGO

Foram utilizadas as seguintes linhagens de células tumorais: Jurkat: leucemia linfoblástica T humana, SK-Br-3: adenocarcinoma de mama humana, B16F10: melanoma humano, S180: sarcoma 180 (Tumor de Crocker) murino. As linhagens tumorais humana foram cedidas pelo Prof. Dr. Auro Nomizo, do Laboratório de Imunologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo-Ribeirão Preto (USP-RP). A linhagem de S180 foi obtida no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

2.7. CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS

As células tumorais foram cultivadas em frascos para cultivo celular estéreis com 175 cm^3, contendo meio RPMI 1640 completo, seguindo o protocolo do ATCC. Para fins experimentais, as células foram cultivadas em microplacas de 96 poços (200μL/poço), fundo chato com tampa. As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera 5% de CO_2.

2.8. OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

Grupos de 5 camundongos swiss machos receberam intra-peritonealmente 1mL de PBS e após 5 minutos foi realizado uma massagem na região peritoneal, logo depois os camundongos foram sacrificados e o exsudato peritoneal formado foi coletado, em condições estéreis, com 5mL de meio RPMI 1640 completo. As células peritoneais retiradas foram centrifugadas a 1.000rpm e as células precipitadas foram lavadas 2 vezes com PBS, restando somente as células aderentes (aqui denominadas de MPACs, *Murine Peritoneal Adherent Cells*)..

Para fins experimentais, as células foram cultivadas em microplacas de 96 poços (200μL/poço), fundo chato com tampa. As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera 5% de CO_2.

2.9. ATIVIDADE CITOTÓXICA

Para realização da atividade citotóxica as linhagens de células tumorais e macrófagos peritoneais foram transferidos para tubos "Falcon" para procedimentos de lavagem. As células foram lavadas três vezes por centrifugação a 1.000 rpm por 10 minutos em meio RPMI. Ao final da última lavagem, as células foram ressuspendidas em 5 mL de meio RPMI completo. Uma alíquota de 10μL da suspensão celular foi colocada em 90μL de azul de Tripan 1% (m:v) (SIGMA, EUA) e contadas em Câmara de Neubauer.

Para realização dos testes de citotóxicidade, $1x10^5$ células tumorais ou macrófagos foram plaqueadas em microplacas de 96 poços, na presença ou na ausência das toxinas (diferentes concentrações) diluídas no meio de cultura. Em seguida, as células foram incubadas por 24h a 37°C, em estufa umidificada. Após a incubação, as células viáveis foram quantificadas colorimetricamente utilizando a técnica padrão do MTT (MOSSMAN, 1983) com algumas modificações. Foram adicionados 10μL (0,5mg/mL) do reagente MTT (brometo de 2,5-difenil-tetrazolio-3-[4,5- dimetiltiazol-2-yl]) em cada poço, após 4h de incubação a 37°C, os cristais de formazan produzidos pela redução do MTT foram solubilizados pela adição de 50μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) em cada poço. A redução do MTT foi quantificada pela leitura da absorbância a 540 nm do produto solubilizado, utilizando um leitor de placa.

O cálculo da porcentagem de atividade citotóxica das toxinas foi obtido seguindo a seguinte fórmula:

A= (leitura da absorbância residual do produto colorido formado (cristais de formazan) após a ação da toxina na célula) x 100/ leitura da absorbância do produto colorido formado (cristais de formazan) da célula somente na presença do meio de cultura.

B= % atividade citotóxica = 100 –A.

2.10. ATIVIDADE BACTERIOLÍTICA

Staphylococcus aureus, cepa ATCC-25923 e *Escherichia coli*, cepa ATCC – 25922, foram adquiridos junto ao Laboratório Central do Hospital de Clínicas da UFU, cedidas gentilmente pelo Dr. Luiz Ricardo Goulart, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

As bactérias individuais, *S.aureus* e *E.coli*, foram inicialmente inoculadas em meio de cultura estéril BHI (*Brain Heart Infusion-Broth* – infusão desidratada de coração e cérebro 1,75% (m/v), Triptose 0,1% (m/v), glicose 0,2% (m/v), NaCl 0,5% (m/v), Na_2HPO_4 0,25% (m/v), pH 7,4 ± 0,2 a 25°C da Diagnolab, Espanha) e ativadas por 16 horas a 37°C em repouso. As culturas foram diluídas 100 vezes em BHI estéril. Retirou-se 2mL para o plaqueamento da microplaca de 96 poços, na presença ou na ausência das toxinas em concentrações de 0,4 e 0,8 μg.m/L diluídas em BHI. Inicialmente e após 6 horas de incubação a 37°C sem agitação, a densidade óptica foi monitorada em espectrofotômetro (Leitor de microplacas Camberra-Packard) utilizando-se o filtro de interferência de 600nm.

2.11. INOCULAÇÃO E MANUTENÇÃO DO TUMOR S180

As células do sarcoma 180 (ATCC-TIB66), expandidas em dois frascos de cultivo celular, cedidas pelo Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia foram utilizadas para a inoculação e manutenção da linhagem nos camundongos. O meio de cultura contendo as células tumorais foi centrifugado (2000 rpm, por 10 min., a 4°C), o precipitado celular foi suspeso em PBS e inoculado por via intraperitoneal (0,3mL) em camundongos albinos (Swiss), onde houve a formação do tumor ascítico.

A linhagem foi mantida por meio de passagens intra-peritoneais semanais da seguinte maneira: após sete dias da inoculação das células tumorais no peritôneo, os animais foram sacrificados e o líquido ascítico contendo as células tumorais, aspirado. As células foram contadas e avaliadas quanto à viabilidade após adição do corante vital Azul de Tripan e sua concentração ajustada para 10^5 células/ mL. Outros camundongos foram então, inoculados com 1 ml desta

suspensão celular via intraperitoneal. Desta maneira sempre havia células disponíveis para fins experimentais.

2.12. IMPLANTAÇÃO DO TUMOR SÓLIDO S180

A formação do tumor sólido S180 foi obtida pela administração do líquido ascítico do S180 ($6X10^6$ células) por via intramuscular na virilha de camundongos da linhagem Balb/c.

2.13. ATIVIDADE ANTITUMORAL

A atividade antitumoral foi determinada comparando o volume da coxa dos camundongos inoculados com o tumor sólido S180 tratados e não tratados após um período de 14 dias e 60 dias Os valores de PI% foram definidos como a porcentagem de inibição do volume do tumor dos camundongos tratados dividido pelo volume do tumor dos camundongos não tratados e expresso como percentagem. Neste experimento, 10 animais receberam injeção de PBS e serviram como controle. 30 camundongos foram inoculados com o tumor sólido do Sarcoma 180 onde foram criados os seguintes grupos de avaliação:

- 5 animais que não receberam tratamento e foram avaliados após 14 dias;
- 5 animais que não receberam tratamento e foram avaliados após 60 dias;
- 5 animais que receberam injeção intramuscular (na região do tumor sólido) após 5 dias da inoculação do tumor sólido de 50μg de BthTX-I e foram avaliados após 14 dias;
- 5 animais que receberam injeção intramuscular (na região do tumor sólido) após 5 dias da inoculação do tumor sólido de 50μg de BthTX-I e foram avaliados após 60 dias;
- 5 animais que receberam injeção intramuscular (na região do tumor sólido) após 5 dias da inoculação do tumor sólido de 50μg de BthTX-I BPB e foram avaliados após 14 dias;

- 5 animais que receberam injeção intramuscular (na região do tumor sólido) após 5 dias da inoculação do tumor sólido de 50μg de BthTX-I e foram avaliados após 14 dias.

A mortalidade e volume de tumor dos camundongos foram acompanhados durante todos os dias do experimento.

A atividade antitumoral dos tratamentos foi avaliada também por análise histológica por microscopia de luz dos tumores retirados após 14 e 60 dias e comparadas com os tumores não tratados nos mesmos períodos de tempo.

Um fragmento da porção dos tumores tratados ou não foi retirado e colocado em solução fixadora de água:etanol:formol:ácido acético na proporção 5:3:1:1 (v/v). Após permanecer neste fixador por uma noite, o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol e então processado para inclusão em glicol metacrilato (historesina).

Os blocos obtidos foram aparados e então cortados com auxílio de um ultramicrótomo (Leica Instrument). Cortes com 2,5μm de espessura foram corados com azul de toluidina a 1%, montados em lâmina e lamínula, examinados ao microscópio óptico de luz (Nikon, modelo Optihot-2) e fotografados.

2.14. ESTUDO DO EFEITO MIOTÓXICO DAS MIOTOXINAS BthTX-I E BthTX-I BPB SOBRE O MÚSCULO GASTROCNEMIO DE CAMUNDONGOS

Foram utilizados camundongos BALB/c machos de 18-22g divididos em vários grupos (n=5) e um grupo controle, que recebeu injeção intramuscular, no músculo gastrocnemius direito, de 25μL de PBS.

Os outros grupos receberam também pela mesma via, injeção de 25μL de PBS contendo 50 μg de cada miotoxina (BthTX-I ou BthTX-I BPB). Estes animais serviram de controle da atividade de BthTX-I e BthTX-I BPB. Após 24, 72h, 1 e 2 semanas os animais foram sacrificados e um pequeno fragmento da porção central do músculo gastrocnemius foi retirado e processado para análise em microscopia de luz conforme descrito no item 2.13.

2.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste – *t* de Student e o nível de significância foi menor que 0,05 ($p<0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Atividade citotóxica da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu*, BthTX-I nativa e modificada (BPB) sobre linhagem leucêmica linfoblástica T humana Jurkat.

Os resultados apresentados na Figura 1A demonstram que a peçonha bruta de *B. jararacussu* em concentrações variando de 0,01 a 0,02 μg/μL apresenta atividade citotóxica significante ($p<0,05$) sobre as células Jurkat. A citotoxicidade máxima foi de aproximadamente 100%. A atividade da miotoxina BthTX-I foi significantemente menor nas mesmas concentrações, quando comparada com a da peçonha bruta (20%). Nestas concentrações não foi detectada atividade citotóxica para BthTX-I BPB.

A atividade citotóxica máxima de BthTX-I em concentrações variando de 0,1 a 1,0 μg/μL foi de aproximadamente 100%, enquanto que a citotoxicidade máxima de BthTX-I BPB nas mesmas concentrações foi significamente menor (30%) ($p<0,05$) (Figura 1B).

3.2. Atividade citotóxica da BthTX-I nativa e modificada (BPB) sobre linhagem adenocarcinoma de mama humano SK-Br-3.

Na Figura 2 observa-se que a BthTX-I nas concentrações variando de 0,1 a 1,0 μg/μL apresenta atividade citotóxica máxima de 50% sobre as células tumorais SK-Br-3 ($p<0,05$), enquanto que a atividade de BthTX-I BPB nas mesmas concentrações foi significativamente menor (30%).

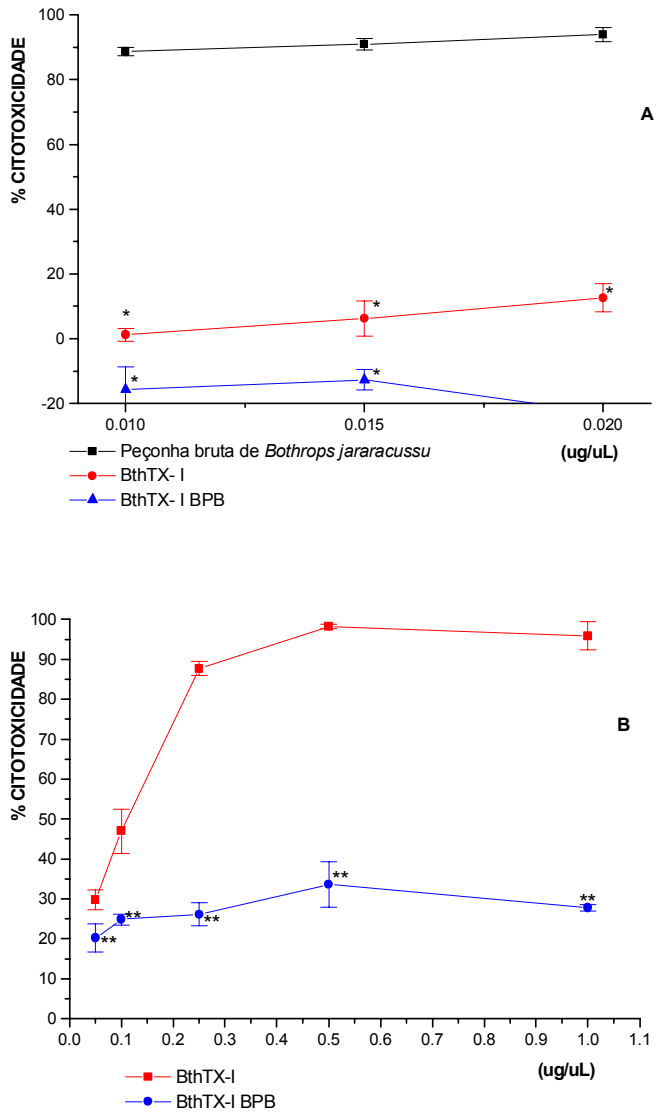


Figura 1. Efeito citotóxico da peçonha bruta de *Botrhops jararacussu* (A), BthTX-I (A e B) e BthTX-I BPB (A e B) sobre a linhagem leucêmica linfoblastica T humana Jurkat. As células Jurkat foram incubadas por 24 h a 37°C na presença de diferentes concentrações das toxinas. Os dados são expressos como porcentagem de citotoxicidade em comparação com a porcentagem de crescimento das células não tratadas. As barras de erro mostram a médias ± desvio padrão (DP) de três experimentos realizados em triplicata. Os asteriscos representam os valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$ teste *t*).
* Significância estatística em relação à peçonha de *B. jararacussu.* ** Significância estatística em relação a BthTX-I.

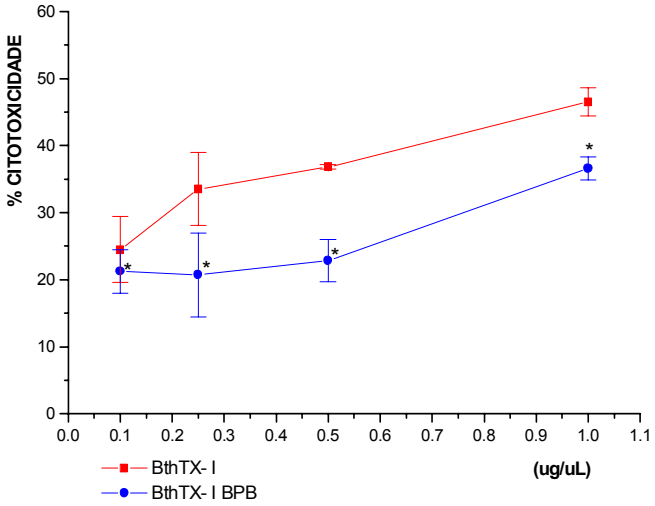


Figura 2. Efeito citotóxico de BthTX-I e BthTX-I BPB sobre a linhagem de adenocarcinoma de mama humano SK-BR-3. As células de SK-BR-3 foram incubadas por 24 h a 37°C na presença de diferentes concentrações das toxinas. Os dados são expressos como porcentagem de citotoxicidade em comparação com a porcentagem de crescimento das células não tratadas. As barras de erro mostram as médias ± desvio padrão (DP) de três experimentos realizados em triplicata. O asterisco representa os valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$ teste *t*).
* Significância estatística em relação a BthTX-I.

3.3. Atividade citotóxica de BthTX-I nativa e modificada (BPB) sobre linhagem de melanoma humano B16F10.

Os resultados apresentados na Figura 3 demonstram que BthTX-I nas concentrações variando de 0,25 a 1,0 μg/μL apresenta atividade citotóxica máxima de 90% sobre as células tumorais B16F10 ($p<0,05$), nenhuma citotoxicidade foi encontrada em concentrações menores que 0,25μg/μL. Enquanto que a atividade de BthTX-I BPB nas mesmas concentrações foi significativamente menor (20%).

3.4. Atividade citotóxica de BthTX-I nativa e modificadas (BPB, NPSC e NBSF), peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* e crotamina sobre linhagem de sarcoma 180 murino (S180).

Os resultados apresentados na Figura 4A demonstram que BthTX-I nas concentrações variando de 0,05 a 1,0 μg/μL apresenta atividade citotóxica máxima de 90% sobre as células tumorais S180 ($p<0,05$), enquanto que a atividade das miotoxinas modificadas com NBSF, NPSC e BPB nas mesmas concentrações foi menor sendo de 60, 50, 40 % respectivamente.

Os resultados apresentados na Figura 4B demonstram que a crotamina nas concentrações variando de 0,02 a 0,1 μg/μL apresenta atividade citotóxica máxima de 75% sobre as células tumorais S180 ($p<0,05$), enquanto que a atividade da peçonha bruta de *C. durissus* nas mesmas concentrações foi significativamente menor, a peçonha apresentou citotoxicidade máxima (25%) na menor concentração utilizada.

3.5. Atividade citotóxica de BthTX-I nativa e modificada (BPB, NPSC e NBSF), peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* e crotamina sobre macrófagos peritoneais murinos.

BthTX-I e BthTX-I BPB nas concentrações variando de 0,05 a 1,0 μg/μL apresentam atividade citotóxica máxima de 90% sobre macrófagos ($P<0,05$), enquanto que a atividade das miotoxinas modificadas com NPSC E NBSF, nas mesmas concentrações, foi significativamente menor (40 e 20%, respectivamente) (Figura 5A).

Os resultados apresentados na Figura 5B demonstram que a crotamina, nas concentrações variando de 0,02 a 0,1 μg/μL, apresenta atividade citotóxica máxima de 20% sobre macrófagos ($p<0,05$) enquanto que a peçonha nas concentrações de 0,02 e 0,1μg/μL estimulou a proliferação de macrófagos em aproximadamente 24 e 60%, respectivamente.

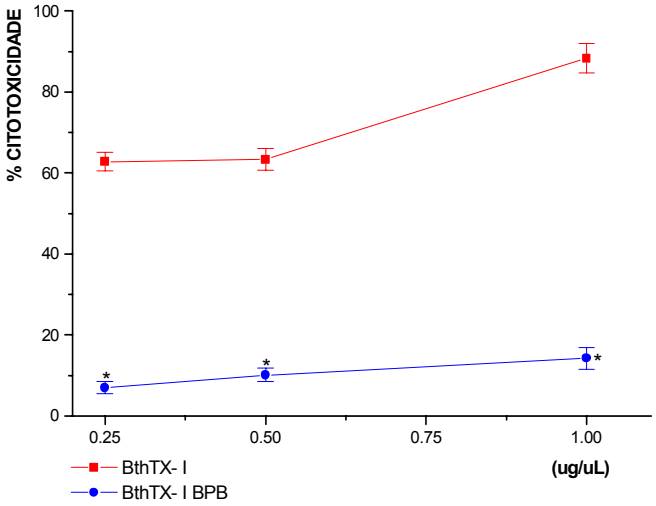


Figura 3. Efeito citotóxico de BthTX-I e BthTX-I BPB sobre a linhagem de melanoma humano B16F10. As células de B16F10 foram incubadas por 24 h a 37°C na presença de diferentes concentrações das toxinas. Os dados são expressos como porcentagem de citotoxicidade em comparação com a porcentagem de crescimento das células não tratadas. As barras de erro mostram a médias ± desvio padrão (DP) de três experimentos realizados em triplicata. O asterisco representa os valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$ teste *t*).
* Significância estatística em relação a BthTX-I.

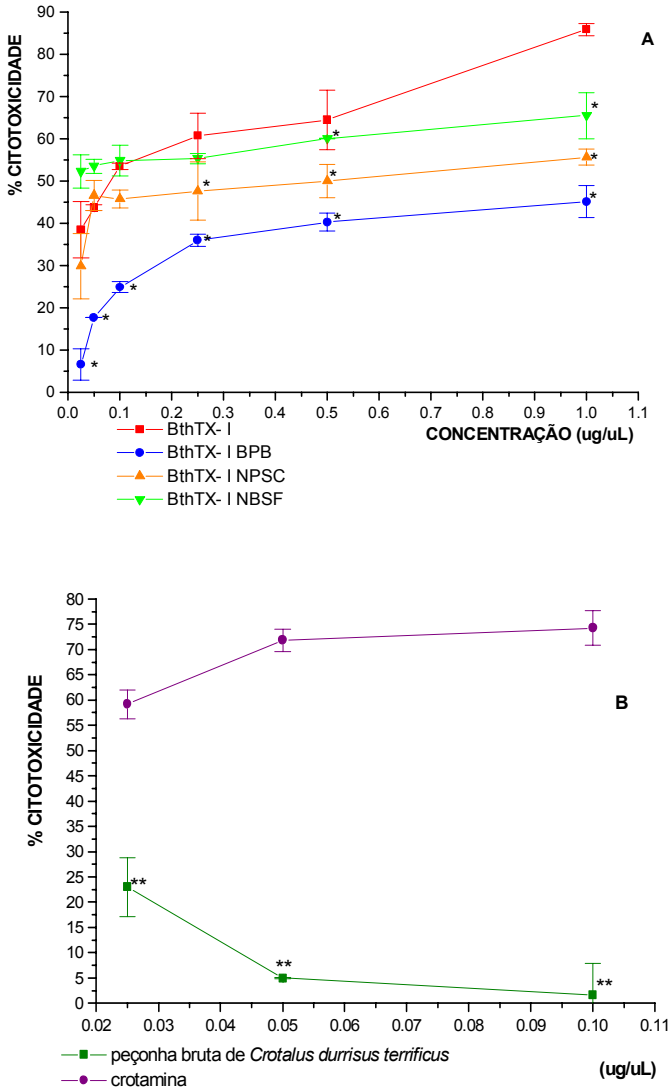


Figura 4. Efeito citotóxico sobre a linhagem de sarcoma 180 murino. **(A)** BthTX-I, BthTX-I BPB, BthTX-I NPSC e BthTX-I NBSF, **(B)** peçonha bruta de *Crotalus durrissus terrificus* e crotamina. As células de S180 foram incubadas por 24 h a 37°C na presença de diferentes concentrações das toxinas ou somente na presença do meio de cultura. Os dados são expressos como porcentagem de citotoxicidade em comparação com a porcentagem de crescimento das células não tratadas. As barras de erro mostram a médias ± desvio padrão (DP) de três experimentos realizados em triplicata. Os asteriscos representam os valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$ teste *t*).
* Significância estatística em relação a BthTX-I. **Significância estatística em relação a peçonha de *C. d. terrificus*.

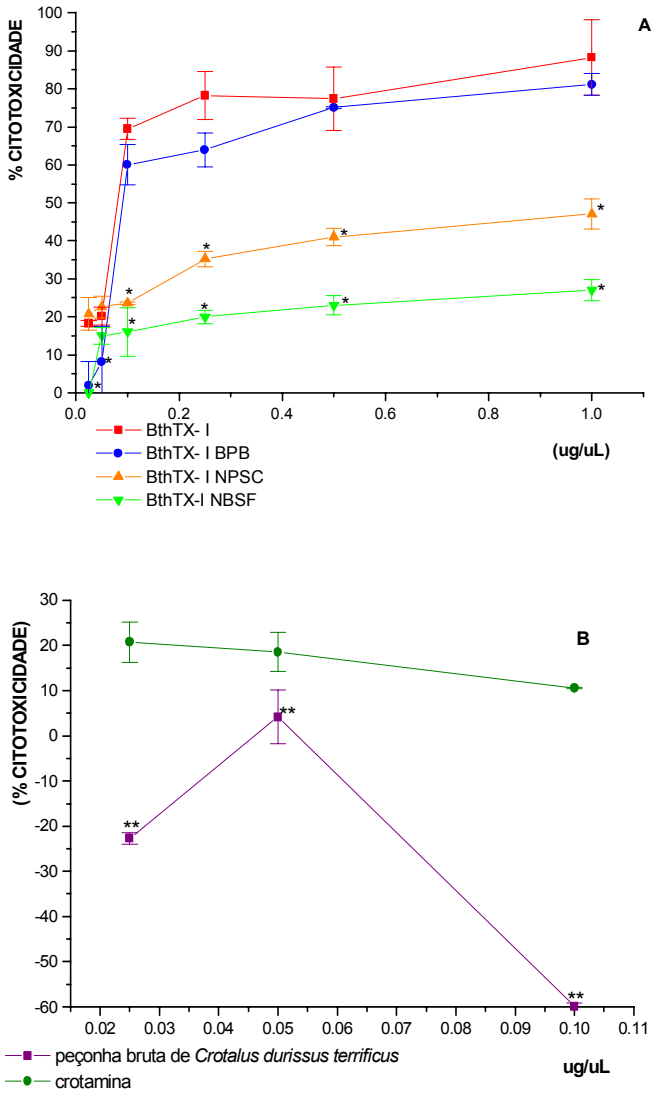


Figura 5. Efeito citotóxico sobre macrofagos peritoneais murinos. **(A)** BthTX-I, BthTX-I BPB, BthTX-I NPSC e BthTX-I NBSF, **(B)** peçonha bruta de *Crotalus durrissus terrificus* e crotamina. Os macrofagos foram incubados por 24 h a 37°C na presença de diferentes concentrações das toxinas. Os dados são expressos como porcentagem de citotoxicidade em comparação com a porcentagem de crescimento das células não tratadas. As barras de erro mostram a médias ± desvio padrão (DP) de três experimentos realizados em triplicata. Os asteriscos representam os valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$ teste *t*).

* Significância estatística em relação a BthTX-I. **Significância estatística em relação a peçonha de *C. d. terrificus.*

3.6. Atividade bactericida da BthTX-I nativa ou modificada (BPB, NPSC e NBSF) sobre e *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Os resultados apresentados na Figura 6 demonstram a proliferação de *E. coli* e *S. aureus* durante 4h por monitoramento da densidade óptica sem ou com influência de BthTX-I nativa ou com modificações. BthTX-I ou BthTX-I BPB nas concentrações de 0,4 a 0,8 μg/μL apresentam atividade bactericida significativa sobre *E. coli* ($p<0,05$) Na concentração de 0,8 μg/μL de BthTX-I a inibição da proliferação foi de 100% aproximadamente e de 92% para BthTX-I BPB. Enquanto que a atividade das miotoxinas modificadas com NBSF, NPSC nas mesmas concentrações, foi significantemente menor (Figura 6A).

Na Figura 6B, a atividade de BthTX-I nas concentrações de 0,4 a 0,8 μg/μL mostrou-se significativa sobre *S. aureus* ($P<0,05$). Na concentração de 0,8 μg/μL a inibição da proliferação foi de aproximadamente 90%, enquanto que a atividade das miotoxinas modificadas com BPB, NBSF, NPSC nas mesmas concentrações, foi significativamente menor.

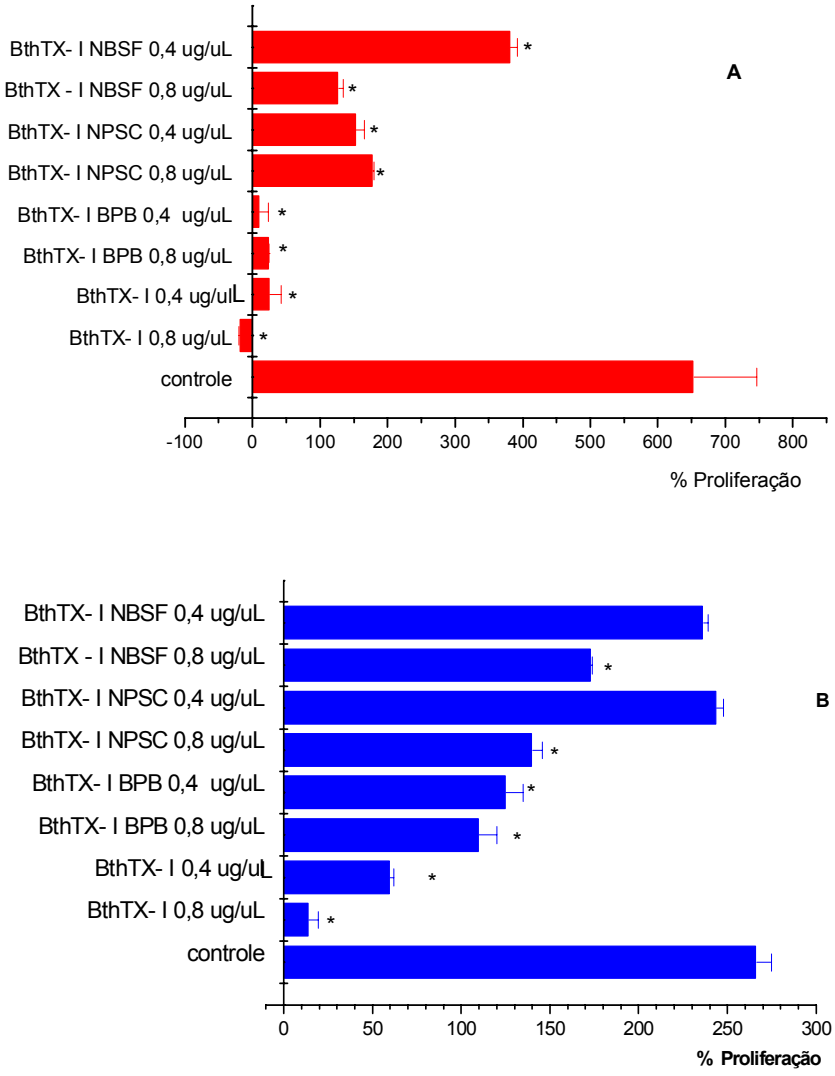


Figura 6. Atividade bactericida de BthTX-I nativa e modificadas (BPB, NBSF e NPSC) sobre *E. coli* (A) *S. aureus* (B). Após o plaqueamento, as bactérias individuais foram incubadas por 4 h na presença de várias concentrações de toxinas. A atividade das miotoxinas sobre as bactérias foi representada pela redução da densidade óptica a 600nm, com 0 e 4 h a 37°C. Os dados percentuais são relativos à diferença entre 0 e 4 h, e a média ± DP é representativa de amostras em triplicata. Os asteriscos representam os valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$ teste *t*).
* Significância estatística em relação ao controle.

3.7. Inibição do crescimento do tumor sólido (S180) implantado em camundongos

A implantação de células do S180 (6 x 10^6) na virilha de camundongos resultou em um tumor sólido (em todos os camundongos) que se localizava na coxa, este apresentava consistência firme a partir do 5º dia.

A administração intramuscular de 50 μg de BthTX-I ou BthTX-I BPB (dose única) no quinto dia após a implantação do tumor sólido (Sarcoma 180) em camundongos avaliados até 14 e 60 dias reduziu consideravelmente o volume do tumor (Tabela 1).

Nos animais avaliados até 14 dias, o volume do tumor tratado com BthTX-I ou BthTX-I BPB diminui 31 e 30%, respectivamente, em relação ao grupo não tratado.

Nos camundongos avaliados até 60 dias, a redução do volume do tumor foi mais acentuada, resultando em uma inibição de 81 e 76%, respectivamente.

Na Tabela 1 também estão apresentados os resultados do acompanhamento da sobrevivência dos animais. Até o 14º dia, 2 camundongos que pertenciam ao controle (sem tratamento) foram a óbito, enquanto que nos grupos tratados com BthTX-I ou BthTX-I BPB nenhuma morte foi verificada.

Nos animais que foram avaliados até 60 dias, 100% do grupo controle morreu, sendo que a primeira morte ocorreu no 15º, outros 2 no 25º dia e os 2 últimos no 58º dia, quando foram feitas as últimas avaliações de volume de tumor. Nos camundongos que receberam os tratamentos, somente 2 mortes ocorreram nos que receberam o tratamento com BthTX-I, enquanto que os que receberam BthTX-I BPB ocorreu apenas 1 morte (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito do tratamento com injeção i. m. de 50 μg de BthTX-I ou BthTX-I BPB no tumor sólido induzido por 6 x 10^6 células do Sarcoma 180 implantadas na virilha de camundongos Balb/c (n=5)

Tratamento	Volume do tumor (cm^3)	Variação do volume do tumor (cm^3)[a]	PI (%)[b]	Mortalidade
14 dias[c]				
Controle sem tratamento	639,23 ± 20,8	60,22 ± 5,4	-	2
BthTX-I	443,29 ± 31,4*	46,81 ± 6,9*	31	0
BthTX-I BPB	451,04 ± 19,3*	49,48 ± 6,7*	30	0
60 dias[c]				
Controle sem tratamento	4691,13 ± 97,8	4338,47 ± 10,2	-	5
BthTX-I	905,96 ± 35,4*	581,29 ± 25,3*	81	2
BthTX-I BPB	1128,6 ± 65,2*	563,08 ± 12,36*	76	1

[a] Variação do volume do tumor foi medida subtraindo o volume do tumor no 14° ou 60° dia pelo volume do tumor no 5º dia após a implantação do tumor.
[b] PI (%)- porcentagem de inibição do volume de tumor tratado em relação ao controle sem tratamento.
[c] Dois blocos foram criados: um avaliado até 14 dias e outro avaliado até 60 dias da implantação do tumor.
Os asteriscos representam os valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$ teste *t*).
* Significância estatística em relação ao controle sem tratamento.

3.7. 1. Avaliação histopatológica

3.7.1.1. Efeito da inoculação de BthTX-I em camundongos normais.

As fibras de músculo gastrocnêmio de camundongos normais inoculados com 50μg de BthTX-I mostraram, após 24h (Figura 7B e C) e 72h (Figura 7D e E), uma acentuada diminuição da estrutura muscular, áreas com necrose e infiltrado leucocitário (principalmente neutrófilos polimorfonucleares). Nenhuma alteração em vasos sanguíneos foi observada.

Após 1 e 2 semanas (Figuras 7F e G respectivamente) nota-se regeneração do tecido muscular, com aparecimento de músculos com núcleo central.

3.7.1.2. Efeito da inoculação de BthTX-I BPB em camundongos normais

As fibras de músculo gastrocnêmio de camundongos normais inoculados com 50μg de BthTX-I BPB mostraram, após 24h (Figura 8A) e 72h (Figura 8B) um infiltrado leucocitário evidente e uma diminuição acentuada da mionecrose em relação à BthTX-I.

3.7.1.3. Efeito do tumor sólido (S180) implantado em camundongos não tratados

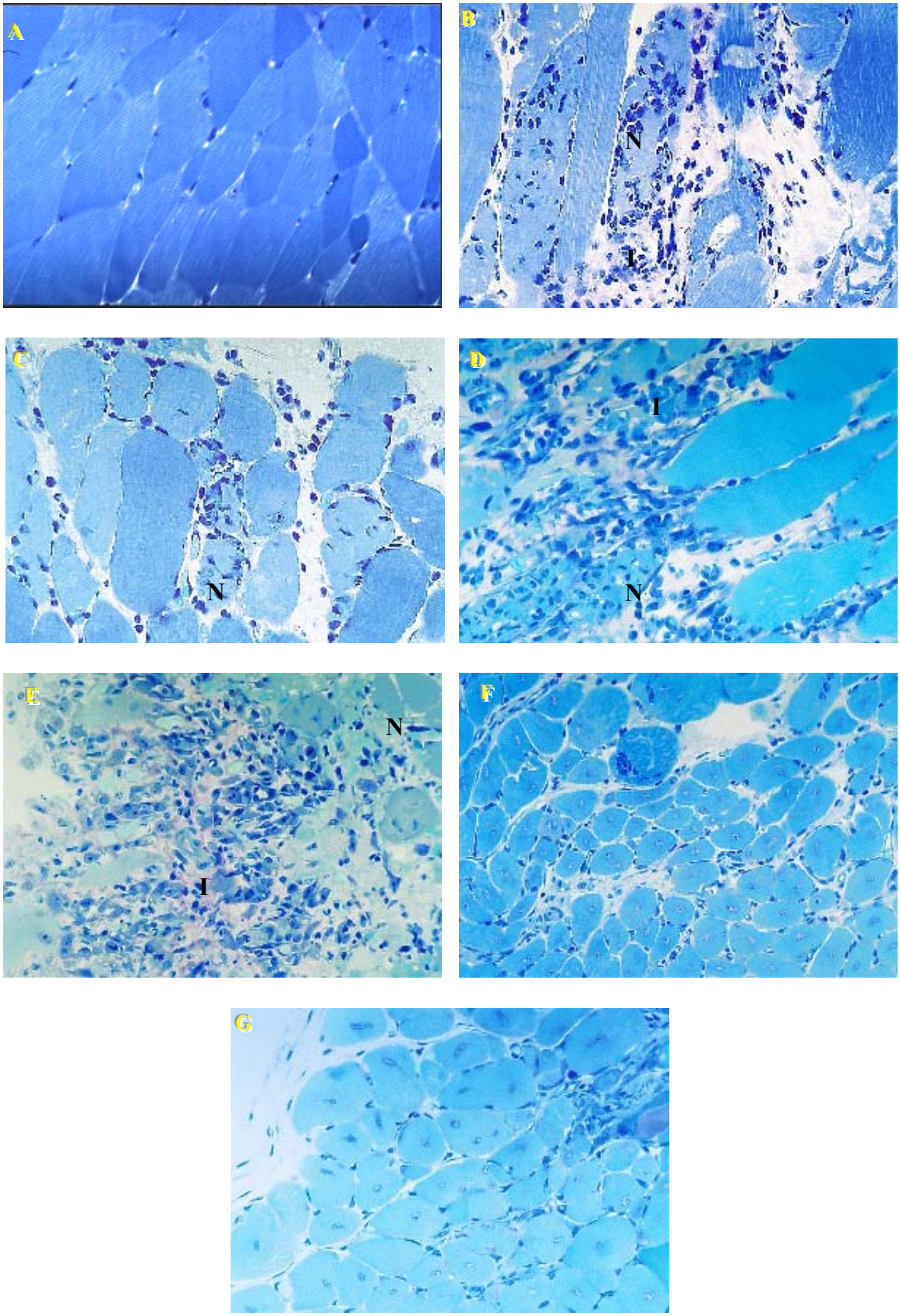
Os cortes histológicos mostram neoplasia constituída por células com citoplasma mal delimitado, núcleos pleomórficos, de contornos irregulares (seta) (Figuras 9C e F), necrose multifocal (N), em meio a grupos de células tumorais (Figuras 9A, B, C e D) e infiltrado leucocitário (I) (Figuras 9C, E e F).

3.7.1.4. Efeito do tratamento do tumor sólido com BthTX-I

Os músculos implantados com sarcoma 180 e tratados com dose única de 50 μg de BthTX-I mostraram uma redução do volume do tumor, representado por uma diminuição de células tumorais do sarcoma 180, este efeito foi mais evidente após 60 dias de tratamento (Figuras 10H-M). As fibras musculares mostraram se mais preservadas após 14 (Figuras 10B, C, E, F) e 60 dias de tratamento (Figuras 10H, I, K, L, M), e um amplo infiltrado leucocitário evidente foi evidenciado (Figuras 10A, B, C, I e K).

3.7.1.5. Efeito do tratamento do tumor sólido com BthTX-I BPB

Os músculos implantados com sarcoma 180 e tratados com dose única de 50 μg de BthTX-I BPB também mostraram uma redução do volume do tumor, representado por uma diminuição de células tumorais do sarcoma 180, este efeito foi mais evidente após 60 dias de tratamento (Figuras 11E-J). As fibras musculares mostraram-se mais preservadas após 14 (Figuras 11C e D) e 60 dias de tratamento (Figuras 11E, H e J), e um amplo infiltrado leucocitário foi evidenciado (Figuras 11A, B, C, I e K).



(legenda na página 55)

Figura 7. Fotomicrografia de secções musculares (cortes de 2,5 μm) do gastrocnêmio direito de camundongos Balb/c machos normais injetados com: PBS **(A)**; BthTX- I (50μg): **(B)** e **(C)** após 24h, **(D)** e **(E)** após 72 h, **(F)** após 1 semana e **(G)** após 2 semanas.

N= necrose, I= infiltrado leucocitário, coloração: azul-de-toluidina, aumento: 120X **(A**, **E** e **G)**, 260X **(B, C, D e F).**

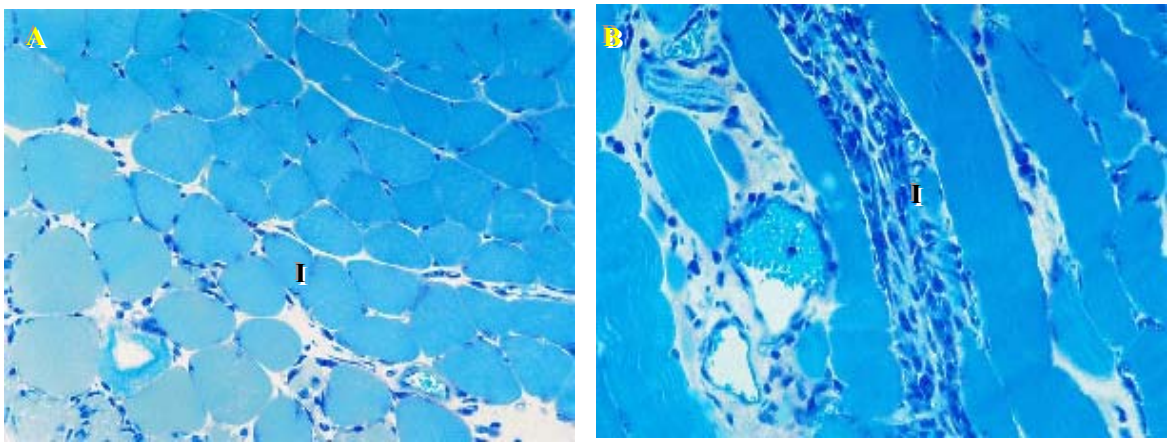


Figura 8. Fotomicrografia de secções musculares (cortes de 2,5 μm) do gastrocnêmio direito de camundongos Balb/c machos normais injetados com BthTX- I BPB (50μg): **(A)** após 24h e **(B)** após 72 h.
I= infiltrado leucocitário, coloração: azul-de-toluidina, aumento: 120 **(A)**, 260 **(B)**.

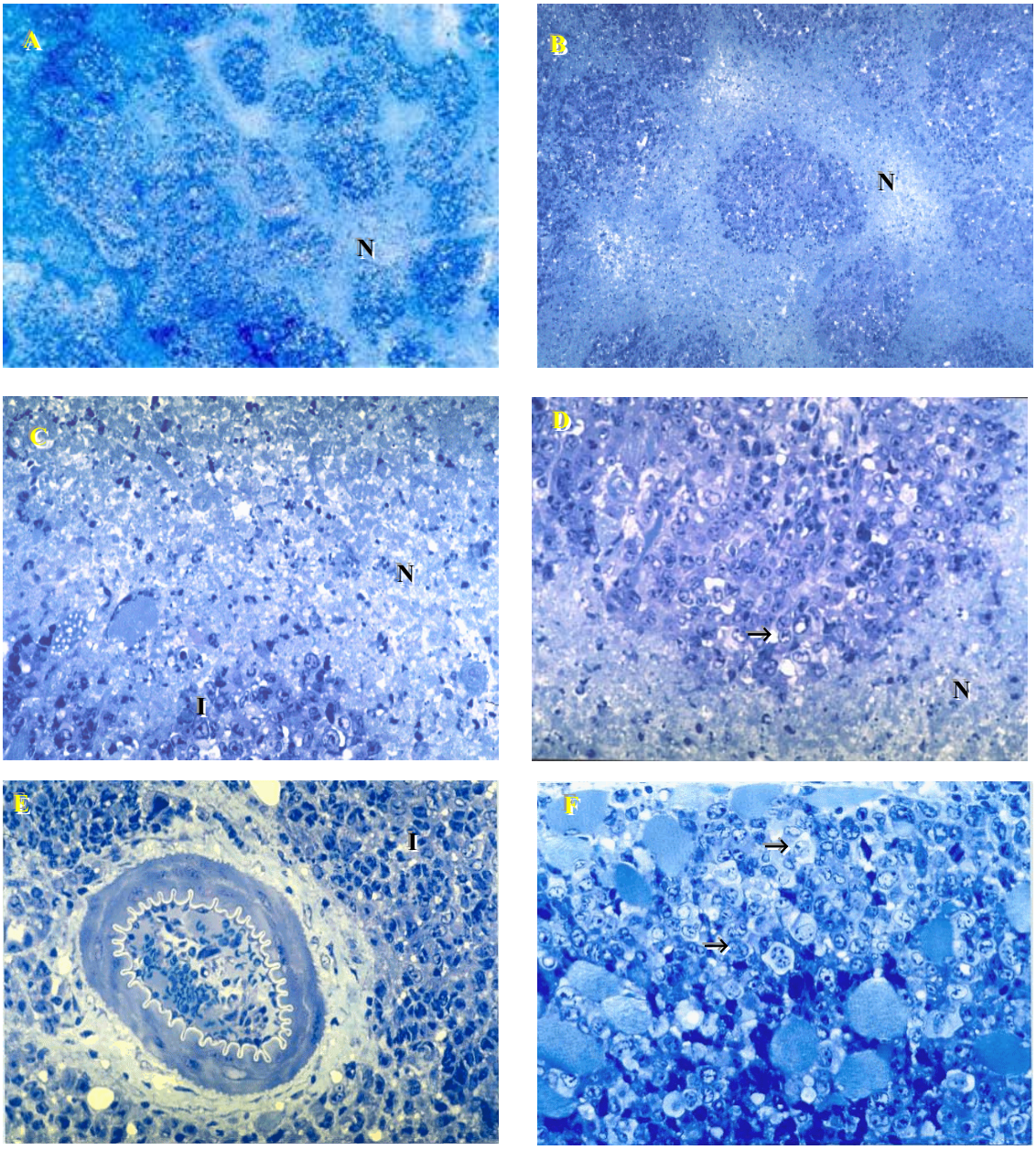
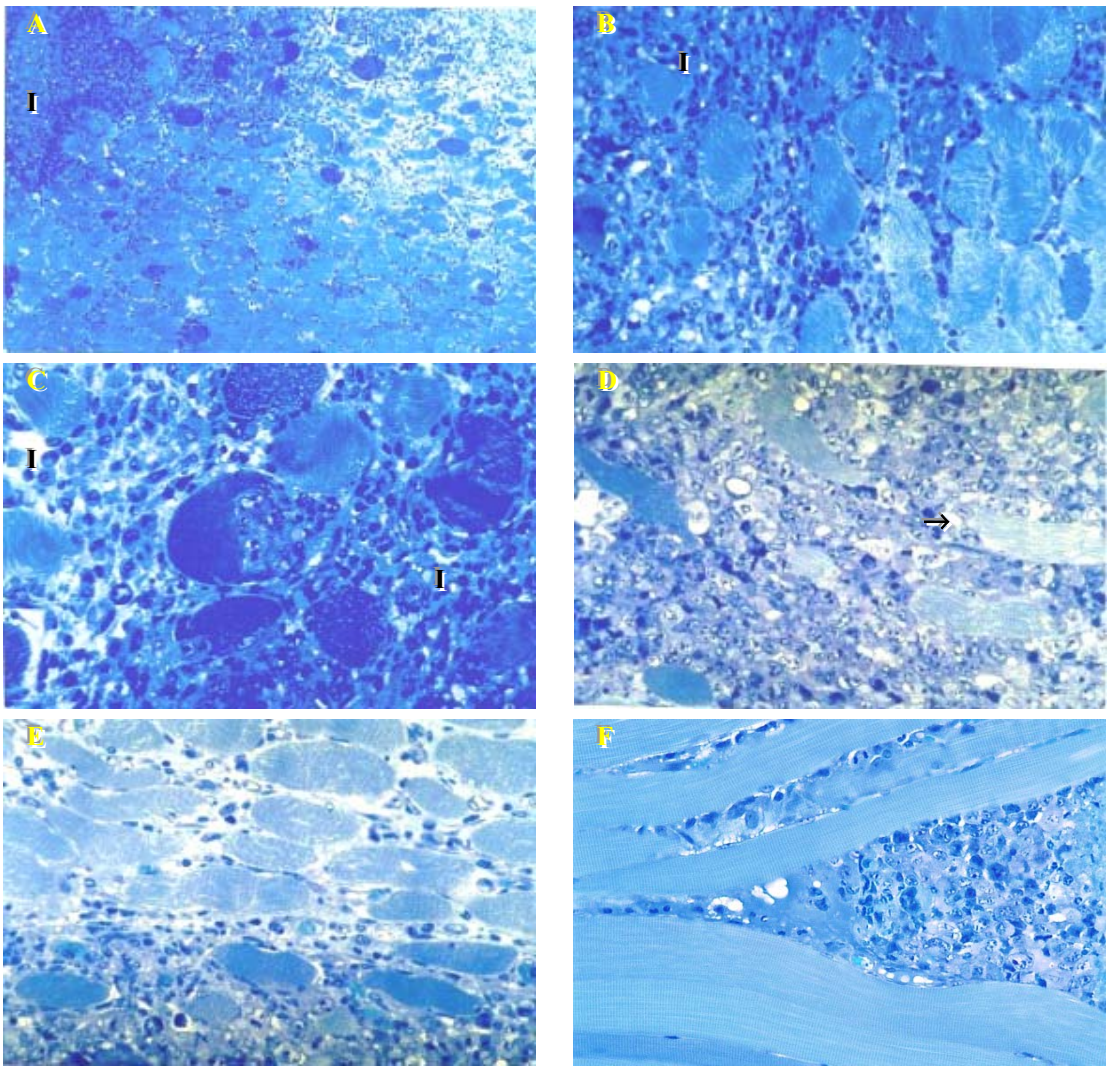
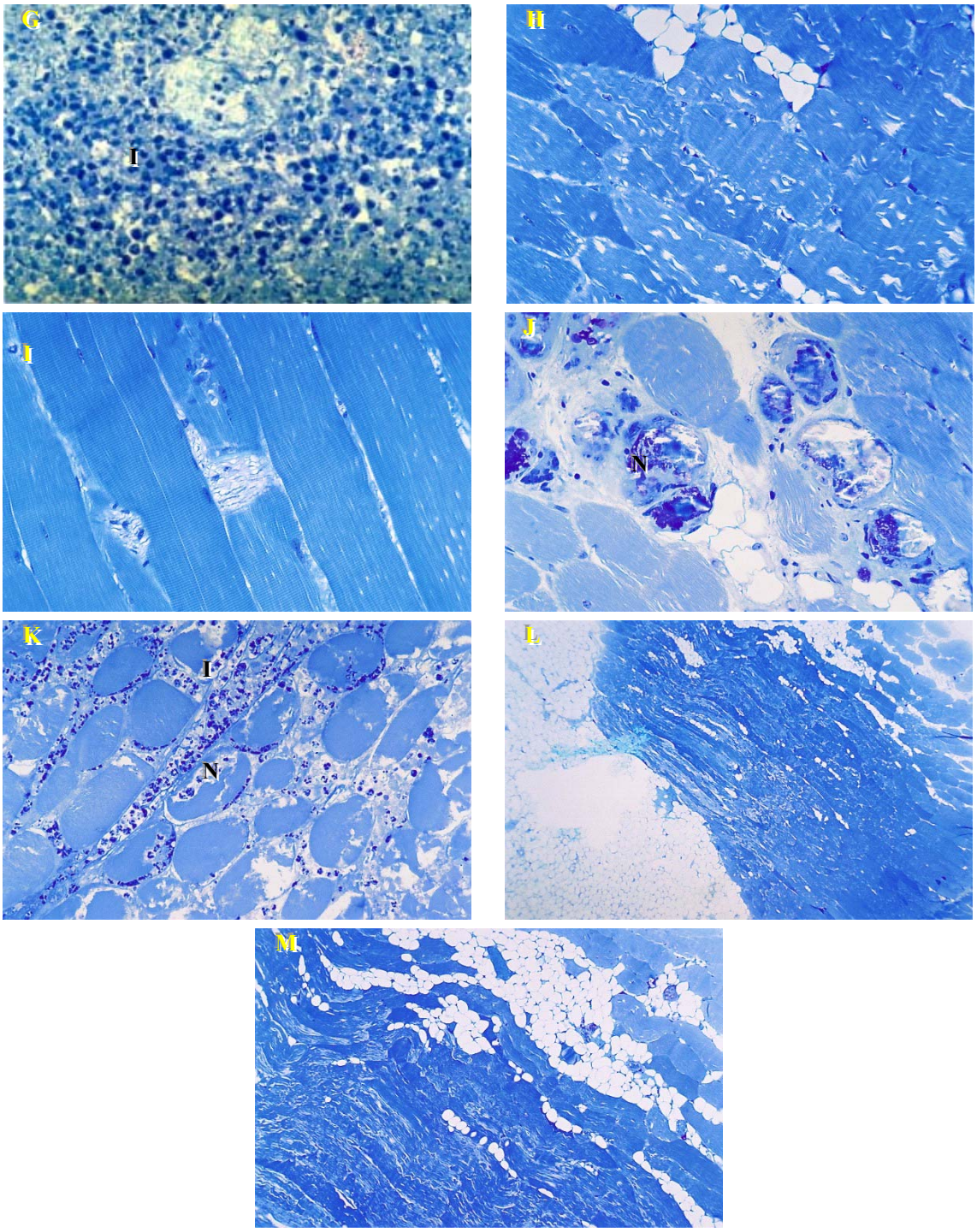


Figura 9. Fotomicrografia de secções de fragmentos de tumor sólido (S180) (cortes de 2,5 μm) implantados em camundongos não tratados.
I (infiltrado leucocitário) → (célula tumoral) N (necrose)
Coloração: azul-de-toluidina; aumento: 26X **(A)**, 120 **(B e E)** e 260X **(C, D e F)**



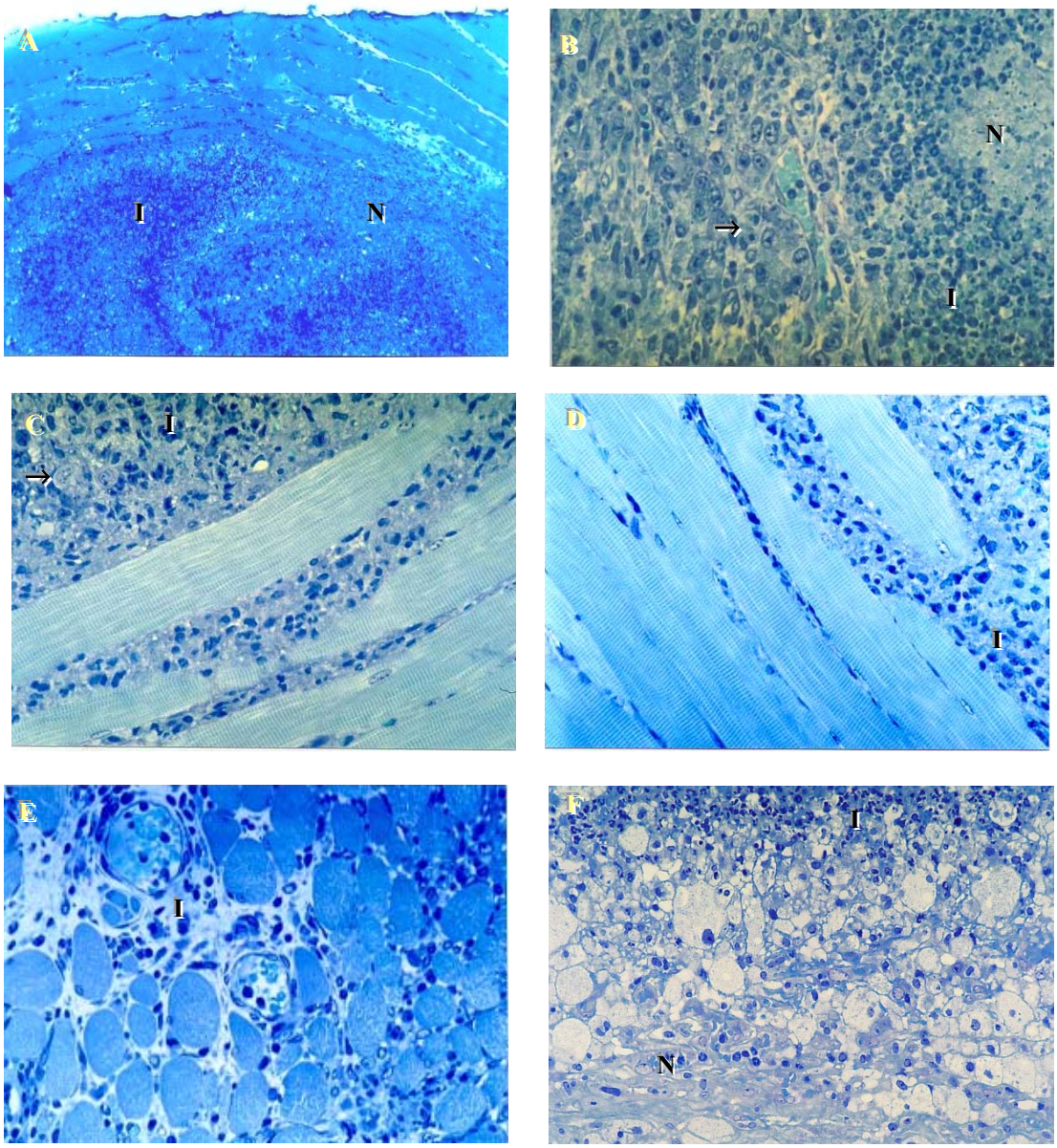
(legenda na página 60)



(legenda na página 60)

Figura 10. Fotomicrografia de secções de fragmentos de tumor sólido (S180) (cortes de 2,5 μm) implantados em camundongos tratados com dose única (50μg) de BthTX-I: (A - G) após 14 dias e (H - M) após 60 dias.
I (infiltrado leucocitário) → (célula tumoral) N (necrose)

Coloração: azul-de-toluidina; aumento: 26 **(G e I)**, 120 **(A e M)** 260X **(B-F, H-K)**



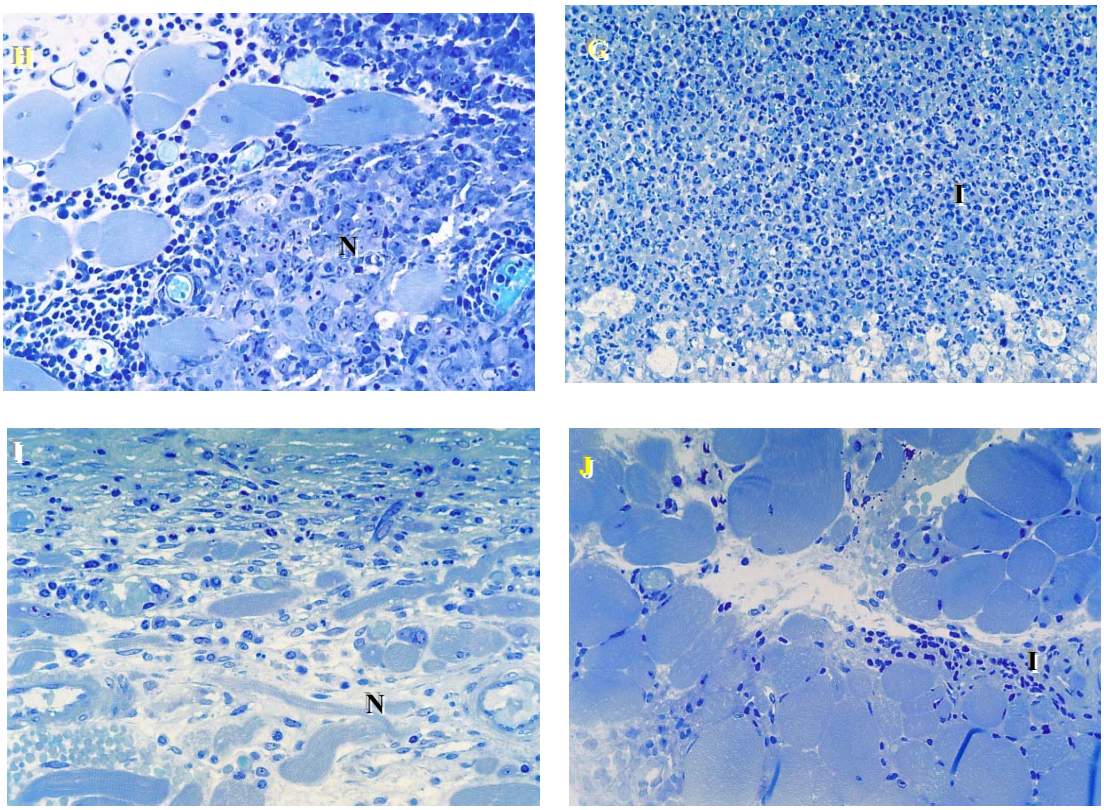


Figura 11. Fotomicrografia de secções de fragmentos de tumor sólido (S180) (cortes de 2,5 μm) implantados em camundongos tratados com dose única (50μg) de BthTX-I BPB: (A - D)após 14 dias e (E - J) após 60 dias.
I (infiltrado leucocitário) → (célula tumoral)
N (necrose)
Coloração: azul de toluidina
Aumento: 260 **(A-J)**

4. DISCUSSÃO

Peçonhas de serpentes possuem efeito inibitório no crescimento de vários tumores *in vitro* e *in vivo*. Diversos trabalhos foram realizados com o objetivo de avaliar a citotoxicidade e mecanismo de ação das toxinas frente às células tumorais (COTTE et al, 1972; BRAGANÇA et al, 1976; de CARVALHO et al, 2001; COSTA et al, 2001; ABU-SINNA et al ,2003).

O efeito citótoxico *in vitro* de miotoxinas botrópicas têm sido estudado em culturas de células demonstrando que elas afetam não somente mioblastos e miotubulos, mas também outros tipos celulares. Miotoxinas de *B. asper* são citotóxicas em culturas de células musculares, neurônios, macrófagos e fibroblastos (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995).

A peçonha bruta de *B. jararacussu*, em baixas concentrações (0,01 e 0,02 μg/μL), apresentou alta atividade citotóxica sobre a linhagem tumoral humana Jurkat, enquanto que nas mesmas concentrações a atividade da BthTX-I foi significativamente menor. Isto pode ser explicado pelo fato da peçonha bruta conter diversos tipos de proteínas que possuem mecanismos de ação diferente e podem em conjunto aumentar a atividade citotóxica. Em concentrações maiores de BthTX-I (0,1-1,0μg/μL) houve um acréscimo significativo da citotoxicidade (100% na maior concentração).

A sensilbildade das linhagens tumorais à ação citotóxica da BthTX-I varia dependendo do tipo de linhagem tumoral. A atividade citotóxica da BthTX-I para a linhagem jurkat foi maior que o verificado para Sk-Br-3, B16F10 e S180 nas mesmas concentrações. A citotoxicidade na maior concentração (1,0μg/μL) variou de: 45% para SK-Br-3 e 90% para B16F10 e S180.

A atividade citotóxica da BthTX-I também foi testada em macrófagos peritoneais murinos, a atividade na maior concentração (1,0μg/μL) foi de 90%.

A inibição da proliferação de bactérias, após 4h de avaliação do crescimento, pela atividade da BthTX-I (0,8μg/μL) também foi evidenciada nas linhagens *E. coli* (100%) e *S. aureus* (~92%).

A atividade citotóxica pode estar relacionada a diferentes tipos de interação da toxina com as células alvos. Lomonte et al (1999) demonstraram que miotoxinas botrópicas são mais citotóxicas para miotúbulos do que a células endoteliais. Estudos de ligação celular realizado com PLA_2 mostraram que esta pode ligar-se a receptores ou lipídeos de membrana com diferentes graus de afinidade, deste modo as PLA_2s poderiam estar agindo através do reconhecimento de lipídios de membrana ou sítios receptores específicos. No caso das miotoxinas botrópicas este receptor ainda é desconhecido (KINI & EVANS, 1989; GUTIÉRREZ & OWNBY, 2003).

Estudos com lipossomos multilamelares mostraram que, somente as vesículas com carga negativa eram afetadas por miotoxinas botrópicas (DÍAZ et al, 2001), sugerindo o envolvimento de aminoácidos básicos no mecanismo perturbador de membranas biológicas. Muitas células apresentam domínios compostos por fosfolipídeos carregados negativamente, especialmente fosfatidilserina, do lado externo da membrana. Um baixo conteúdo destes fosfolipídeos negativos na superfície da membrana de alguns tipos celulares poderia dar resistência à ação citotóxica das miotoxinas (DÍAZ et al, 2001). Eritrócitos enriquecidos com fosfatidilserina mostraram ser suceptíveis à acão lítica das miotoxinas botrópicas quando comparados com os eritrócitos normais que são resistentes a estas toxinas (DÍAZ et al, 2001). Isto sugere que fosfolipídeos carregados negativamente na superfície externa da membrana devem participar na ancoragem das PLA_2 miotóxicas (GUTIÉRREZ & OWNBY, 2003).

Paramo et al (2001) mostraram que o efeito citotóxico sobre bactérias induzido por miotoxinas Lys49 pode ser atribuido a região C-terminal (115-129) da proteína que é o sítio ligante da heparina. Esta região também apresentou atividade miotóxica *in vivo* e lisou células endoteliais (LOMONTE et al, 1994; LOMONTE et al, 1999).

O resíduo de His48 é altamente conservado nas PLA_2 e a alquilação deste resíduo nas Lys49 induz a diminuição da toxicidade e efeitos farmacológicos, como indução de edema e degranulação de mastócitos *in vitro* (ANDRIÃO-ESCARSO et al, 2000).

A alquilação do resíduo de His48 com brometo de p-bromofenacila promoveu a inibição de aproximadamente 70% da citotoxicidade sobre as linhagens tumorais Jurkat e SK-BR-3, 80% para B16F10 e 40% para S180.

Porem, não foram evidenciados inibição significativa na citotóxicidade quando testada frente a macrófagos.

A atividade bactericida frente a *E. coli* ocasionada pela BthTX-I modificada com BPB foi similar à da BthTX-I nativa, porem frente a *S. aureus* a atividade foi significantemente inibida após a alquilação da BthTX-I com BPB.

Soares et al (2003) demonstraram que as miotoxinas Lys 49 após alquilação do resíduo de histidina com BPB reduziram em cerca de 40-50% o efeito miotóxico, 80-85% do efeito citotóxico e 15-20% do edema, sem interferir com rupturas de lipossomos carregados negativamente, deste modo poderia haver regiões distintas do sítio catalítico, que podem ser responsáveis por algumas propriedades farmacológicas.

Várias hipóteses foram propostas para explicar a perda da atividade farmacológica das PLA_2 pela alquilação da His48 pelo BPB, uma delas é a indução de mudanças conformacionais nas regiões moleculares distintas do sítio catalítico (RENETSEDER et al, 1988). Nas Lys49 poderiam existir domínios farmacológicos independentes ou sobrepostos distintos do sítio ativo (OWNBY et al, 1999).

O cloreto de o-nitrofenilsulfonila (NPSC) é um reagente utilizado para modificar resíduos de triptofano, enquanto que o reagente fluoreto de 2-nitrobenzenosulfonila (NBSF) é utilizado para modificar resíduos de tirosina. A maioria das PLA_2 botrópicas possue vários resíduos de tirosina e um ou mais resíduos de triptofano. O resíduo de Trp na posição 77 é muito conservado nas PLA_2 Lys49, é sugerido que estes aminoácidos exerçam funções importantes na manutenção estrutura molecular da proteína (VERHEIJ et al, 1994).

A modificação do resíduo de triptofano utilizando NPSC reduziu a atividade citotóxica da BthTX-I frente ao Sarcoma 180 em 50%, 60% em macrófagos.

NPSC também interferiu sobre a atividade da BthTX-I em reduzir a proliferação de bactérias. *E. coli* apresentou uma proliferação de 30% quando incubada com BthTX-I NPSC na concentração de 0,8μg/μL em relação ao controle e em *S. aureus* a proliferação foi de aproximadamente 50% (0,8μg/μL de

BthTX-I NPSC). Provavelmente a modificação do resíduo de Trp é importante na atividade bactericida em bactérias gram negativas e positivas uma vez que a BthTX-I nativa inibiu a proliferação em 100%.

BthTX-I possui somente um resíduo de Trp (ANDRIÃO-ESCARSO et al, 2000) e estudos estruturais realizados por Da Silva Giotto et al (1998) demonstraram que este resíduo apresenta um importante papel na orientação dos monômertos, nas duas formas de cristais dos dímeros, “aberta” e “fechada”. Este Trp 77 contribui para a estabilização do dímero pelas pontes de hidrogênio intermoleculares. Transições entre estas duas conformações nas estruturas quaternárias dos homodímenros das Lys49 poderia ser fundamental no mecanismo de ação para a atividade destruidora de membrana, uma vez que a região C-terminal destas enzimas poderiam inserir-se dentro da membrana. (WARD et al, 1995).

A modificação do resíduo de tirosina pelo NBSF reduziu a atividade citotóxica da BthTX-I frente ao sarcoma 180 em 60% e 70% em macrófagos (Figura 5A).

Houve aproximadamente 20% de proliferação em *E. coli* quando incubada com BthTX-I NBSF (0,8μg/μL), entretanto esta modificação interferiu menos na proliferação em *S. aureus*.

Soares et al (2003) demonstraram que a as modificações nos resíduos de Tyr nas Lys49r pelo NBSF afetaram a letalidade, miotoxicidade e a citotoxicidade, sugerindo um importante papel deste resíduo de aminoácido nestas atividades.

Nossos resultados indicam que BthTX-I apresenta um potente efeito citotóxico frente às linhagens de células tumorais, macrófago e bactérias testadas, e as modificações químicas nos resíduos de His Tyr, Trp influem na citotoxicidade das linhagens tumorais. Portanto é necessário estudos mais aprofundados que visam desvendar o mecanismo citotóxico desta proteína.

Apesar da peçonha de *C. d. terrificus* não apresentar atividade citotóxica frente a S180 e macrófagos, a crotamina mostrou citotoxicidade *in vitro* frente à linhagem do sarcoma 180, porém esta atividade foi significantemente menor frente a macrófagos.

Fletcher et al (1996) ao testar a crotamina em cultura de músculo esquelético não encontrraram uma concentração de toxina que matasse 50% das

células. Lomonte et al (1999) utilizando as concentrações de 20 e 80 μg/poço de crotamina em cultura de células endoteliais e de miotubulos não evidenciaram atividade citotóxica.

Nossos resultados, ao contrário dos resultados encontrados por Fletcher et al (1996) e Lomonte et al (1999), demonstraram atividade citotóxica em células tumorais e macrófago por meio de um mecanismo ainda desconhecido.

Nos ensaios *in vivo*, observou-se que BthTX-I possui efeito mionecrótico nas células musculares de camundongo com o aparecimento de amplo infiltrado leucocitário composto de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos que se torna abundante após 24h.

A regeneração muscular após a mionecrose induzida pela BthTX-I procede normalmente, com pequenas células musculares, com núcleo central após 1 e 2 semanas. É proposto que o processo regenerativo ocorra porque as miotoxinas não afetam vasos sanguíneos e nervos, e ocorra a ativação de células satélites miogênicas e fusão de miotúbulos dentro dos espaços delimitados pela lâmina basal remanescente das células necróticas (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995; QUEIROZ et al, 1998).

A alquilação do resíduo de histidina por BPB na BthTX-I reduziu a lesão muscular, entretanto as propriedades imunológicas induzidas pela toxina não sofreram alterações Um infiltrado leucocitário foi observado após inoculação da toxina modicada com BPB. Andrião-Escarso et al (2000) modificando a BthTX-I com BPB demonstraram não haver mudanças significantes na antigenicidade uma vez que a produção de anticorpos policlonais foi mantida.

Os camundongos implantados com tumor sólido S180, que não receberam tratamento de BthTX-I ou BthTX-I BPB, tiveram um aumento do volume do tumor sólido quando comparado aos que receberam, as análises histológicas demonstram um padrão de necrose multifocal devido à morte das células musculares causada pela isquemia ocasionada pelo aumento do volume do tumor. Observa-se também infiltrado leucocitário que poderia ter a função de remover os debris de musculos esquelético necrosados.

A inoculação de uma única dose de 50 μg/μL de BthTX-I ou BthTX-I BPB na região do tumor sólido reduziu o seu crescimento principalmente após 60 dias de avaliação (81 e 76% de inibição) e diminuiu a mortalidade.

A fotomicrografia dos tumores tratados com BthTX-I ou BthTX-I BPB, onde se observa uma maior preservação das fibras musculares, quando comparado ao controle sem tratamento e um amplo infiltrado leucócitário, principalmente de neutrófilos polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos.

Como já mencionado, a alquilação do resíduo de histidina reduz significativamente a atividade citotóxica e miotóxica da BthTX-I, porém a inibição do tumor sólido pela inoculação de BthTx-I modificada com BPB foi similar à induzida pela BthTX-I nativa.

Provavelmente a inibição do crescimento do tumor S180 implantado em camundongos pode estar relacionada com a ativação do sistema imune, uma vez que a modificação química da proteína não interfere nas suas propriedades imunogênicas, onde um infiltrado leucocitário nos músculos de camundongos normais inoculados com BthTX-I BPB é evidente.

Os macrófagos normalmente infiltram-se na massa tumoral. Entretanto, eles precisam estar ativados para que participem como células efetoras contra as células tumorais, macrófagos isolados de tumores imunogênicos em fase de regressão apresentam atividade citotóxica, ao passo que os macrófagos isolados de tumores em evolução ou não imunogênicos não apresentam atividade citotóxica. Foi demonstrado, *in vitro*, que os macrófagos em repouso não são citolíticos para as células tumorais, mas podem tornar-se citolíticos caso forem ativados por fatores de ativação de macrófagos (MAF - *macrophage-activating factors*), comumente secretados pelos linfócitos Th após estimulação antígeno específica (BALLOW & NELSOM,1997).

Resultados preliminares, não apresentados, demonstram por meio da expressão por RT-PCR, uma maior expressão de TNFα e INFα nos camundongos tratados com BthTX-I ou BthTX-I BPB quando comparado com os camundongos não tratados.

TNFα é uma proteína sintetizada e secretada por macrófagos, e induz diversos efeitos como a ativação de neutrófilos polimorfonucleares e macrófagos (Witkowski et al, 1997). TNFα e INFγ são citocinas chaves na ativação de estágios inflamatórios iniciais ativando a migração de células, principalmente macrófagos e neutrófilos (CARNEIRO et al, 2002; ADAM et al, 2003; SZLOSAREK et al, 2003).

Liu et al (2004) demonstraram a inibição do crescimento do S180 *in vivo* tratando os camundongos com administração oral ou intraperitoneal de polissacarídeos purificados de *Artrodia camphorata*. Os autores sugerem que estes polissacarídeos induzam um efeito antitumoral promovendo a ativação da resposta imune do tipo Th-1, este estudo demonstrou um aumento na produção de citocinas expressas quando a resposta Th-1 está ativada (TNFα e INFγ).

Estudos *in vitro* mostram que macrófagos podem eliminar células tumorais por citólise ou fagocitose (ADAM et al, 2003).

Estudos adicionais da expressão destas citocinas poderão indicar se este mecanismo está sendo ativado pela administração de BthTX-I ou BthTX-I BPB em camundongos implantados com tumor sólido S180.

Avaliações histológicas dos órgãos (pulmão, rins e fígado) não mostraram nenhuma alteração em relação aos grupos de camundongos normais, implantados com S180 tratados ou não com BthTX-I ou BthTX-I BPB (dados não apresentados), bem como as dosagens de enzimas como bilirrubina, creatinina e desidrogenase lática. Os parâmetros hematológicos também não revelaram nenhuma alteração hematológica entre os grupos (dados não apresentados).

Os camundongos tratados com BthTx-I ou BthTX-I BPB após 60 dias mostraram uma menor expressão (RT-PCR) de metaloproteases de matriz do tipo 9 (MMP-9) quando comparados com os camundongos não tratados (resultados não apresentados).

Existe uma correlação positiva entre progressão e invasão do tumor com a expressão de metaloproteases de matriz, principalmente MMP-2 e MMP-9 (FODA et al, 2001). A progressão do tumor envolve a degradação das proteínas presentes na matriz extra-celular (LÁPIS & TIMÁR, 2002).

Estudos envolvendo células de carcinoma hepático (HCC) demonstraram que a maioria destas células secreta altos níveis de MMPs, principalmente MMP-9 e MMP-2 (YAMAMOTO et al, 1997; McKENNA et al, 2002).

Em conclusão, nossos resultados demonstram que as toxinas estudadas apresentam atividade citotóxica *in vitro* nas linhagens testadas, e que as modificações químicas na BthTX-I interferem no efeito citotóxico da proteína.

A inibição do crescimento do tumor sólido S180 em camundongos tratados com BthTX-I ou BthTX-I BPB foram similares, sugerindo que o mecanismo

antitumoral da toxina deve ser independente de sua atividade citotóxica. Provavelmente, a estimulação do sistema imune pela BthTX-I ou BthTX-I BPB esteja envolvida na diminuição da progressão do tumor sólido (S180) em camundongos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-SINNA, G.; ESMAT, A. Y.; AL-ZAHABY, A. S.; et al. Fractionation and characterization of *Cerastes cerastes cerastes* snake venom and the antitumor action of its lethal and non-lethal fractions. **Toxicon**, 42; 207-15, 2003.

ADAM, J. K.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Immune response in cancer. **Pharmacol. & Ther.**, 99:113-32, 2003.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; et al. Myotoxic phospholipase A_2 in *Bothrops* snake venom: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, 82: 755-63, 2000.

BALLOW, M.; NELSON, R. Immunopharmacology - immunomodulation and immunotherapy. **JAMA.**, 278: 2008-17,1997.

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

CALMETTE, A.; SAENZ, A.; COSTIL, L. Effects du venim de cobra sur les greffes cancereuses et le cancer spontane (adeno-carcinome) de la souris. **Acad. Sci**. 197: 205-17, 1933.

CARNEIRO, A. S.; RIBEIRO, O. G.; FRANCO, M.;et al. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice select for acute inflammatory response. **Toxicon**, 40: 1571-9, 2002.

CARVALHO, D. D.; SCHMITMEIER, S.; NOVELLO, J. C. et al. Effect of BJccL (a lectin from the venom of snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and tumor and endothelial cells. **Toxicon**, 39: 1471-6, 2001.

CORRÊA, M. C.; MARIA, D. A.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; et al. Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. **Toxicon**, 40: 739-48, 2002.

COSTA, L. A.; FORNARI, M. C.; BERADI, V. E. et al In vivo effect of snake phospholipase A_2 (crotoxin + cardiotoxin) on serum IL-1α, TNF-α and IL-1ra level in humans. **Immunol. Letters**, 75:137-41, 2001.

COTTE, C. A.; ESSENFELD-YAHIR, E.; LAIRET, C. Effect of *Crotalus* and *Bothrops* venom on normal and malignant cells cultivated in vitro. **Toxicon**, 10:157-61, 1972.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M. AND HERING, S. E. Acute myocardial infarctio-like enzyme profile in human victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 84: 447-51, 1990.

DÍAZ, C.; LEÓN, G.; RUCAVADO, A. et al. Modulation of the susceptility of human erythrocytes to snake venom myotoxic phospholipases A_2: role of negatively charged phospholipids as potential membrane binding sites. **Archives of Biochem. and Biophys.**, 391: 56-64, 2001.

DÍAZ-OREIRO AND GUTIÉRREZ, J. M. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipase A_2 isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venom: effects on enzymatic and pharmacological properties. **Toxicon**, 35: 241-52, 1997.

FLETCHER, J. E.; HUBERT, M.; WIELAND, S. J. et al. Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. **Toxicon**, 34: 1301-11, 1996.

FODA, H. D. AND ZUCKER, S. Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. **D. D. T.**, 6: 478-82, 2001.

GUTIÉRREZ, J. M. AND LOMONTE, B. Phospholipase A_2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, 33:1405-24, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M. AND OWNBY, C. L. Sketetal muscle degeneration induced by venom phospholipase A_2: insights into mechanism of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, 12: 915-31, 2003.

ITZHAKI, R. F. AND GILL, D. M. A micro-biuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.**, 9: 401-10, 1964.

McKENNA, G. J.; CHEN, Y.; SMITH, R. M. A role for matrix metalloproteinases and tumor host interaction in hepatocelular carcinomas. **A. J. Surg.**, 183: 588-94, 2002.

KINI, R. M. AND EVANS, H. J. A common cytolitic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. **Int. J. Peptide Prot. Res.**, 34: 277-86, 1989.

KNUDSEN, K. A.; TUSZYNKI, G.P.; HUANG, T. F. et al. Trigramin, an RGD containing peptide from snake venom, inhibits cell-substratum adhesion of human melanoma cells. **Exp. Cell Res.**, 179: 42-9, 1980.

LAPIS, K. AND TÍMAR, J. Role of elastin-matrix interactions in tumor progression. **Sem. in Cancer Biol.**, 12:209-17, 2002.

LIU, J. J.; HUANG, T. S.; HSU, M. L. et al. Antitumor effects of the partially purified polysaccharides from *Antrodia camphorate* and the mechanism of its action. **Toxicol. A. Pharmacol.**, 201: 186-93, 2004.

LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A. et al. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A_2 from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolitic toxin region by

the use of synthetic peptides and molecular modeling. **J. Biol. Chem.** 269: 29867-73, 1994.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; RUFINI, S. et al. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipase A_2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells *in vitro*. **Toxicon**, 37:145-58, 1999.

MANCIN, A. C.; SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; et al. The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South merican rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. **Toxicon**, 36(12): 1927-37, 1998.

MOSSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assay. **J. Immunol. Meth.**, 65: 55, 1983.

OWNBY, C. L.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. WHITE, S. P. et al. Lysine 49 phospholipase A_2 proteins. **Toxicon**, 37:411-45, 1999.

PARAMO, L.LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ. et al. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipase A_2 from *Bothrops asper* snake venom: synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptite identifies its bactericidal region. **Eur. J. Biochem.**, 253:452-61, 1998.

QUEIROZ, L. S. SANTO NETO, H., RODRIGUES-SIMIONI, L. et al. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, 22: 339-346, 1994.

RENETSEDER, R.; DIJKSTRA, B.W.; HUIZINGA, K. et al. Crystal structure of bovine pancreatic phospholipase A_2 covalently inhibited by p-bromo-phenacyl-bromide. **J. Biol. Chem.**, 200:181-8, 1988.

DA SILVA-GIOTTO, M. T.; GARRAT, R. C.; OLIVA, G.; et al. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: Conformational changes in bothropstoxinI. **Proteins**, 30:442-54, 1998.

SOARES, A. M. AND GIGLIO, J. R. Chemical modifications of phospholipases A_2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, 42: 855-68, 2003.

SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; et al A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, 36(3): 503-14, 1998.

SOONS, R. K.; CONDREA, E.; YANG, C. C. et al. Effects of modification of tyrosines 3 and 62(63) on enzymatic and toxicological properties of phospholipases A_2 from *Naja nigricolis* and *Naja naja atra* snake venoms. **Toxicon**, 24: 679-93, 1986.

SOUZA, D. H.F.; EUGENTO, L. M.; FLETCHER, J. E. et al. Isolation and Structural Characterization of a Cytotoxic L-Amino Acid Oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* Snake Venom. **Arch. Biochem. Biophys**., 368: 285–90, 1999.

STANCHI, N. O.. ARIAS, D.; MARTINO, P. E. et al. 30-Day intravenous administration of VRCT-310-ONCO in rabbits. **Il Farmaco**, 57: 167-70, 2002.

SZLOSAREK, P. W. AND BALKWILL, F. R. Tumour necrosis factor: A potential target for the therapy of solid tumours. **L. Onco.**, 4:565-73, 2003.

TAKASAKI, A.; SUGAMA, A.; YANAGITA, A. et al. Effects of chemical modification of PA-11, a phospholipase A_2 from the venom of Australian king brown snake, on its biological activities. **Toxicon**, 28: 107-17, 1990.

VERHEIJ, H. M.; VOLWERK, J. J.; JANSEN, E. M.; et al. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A_2. Role of hiostidine and calcium ion in the catalytic mechanism. **Biochemistry**, 39: 14714-22, 1994.

WARD, R. J.; MONESI, N.; ARNI, R. K. et al. Sequence of a cDNA encoding bothropstoxin I, a myotoxic from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Gene**, 156: 305-6, 1995.

WITKOWSKI, J.; YANG, L.; WOOD, D.; J et al. P. Migration and healing of ligament cells under inflammatory conditions. **J. Ortho. Research**, 15: 269-77, 1997.

YAMAMOTO, H.; ITOH, F.; ADACHI, Y. et al. Relation of enhanced secretion of active MMP with tumor spread in human hepatocellular .Carcinoma. **Gastroenterology**, 112: 1290-6, 1997.