



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Estudo do efeito do veneno de *Bothrops leucurus* em linhagens celulares de gliomas humanos

Tamires Barbosa Bezerra

Salvador (Bahia)
Agosto, 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

UFBA/SIBI/Bibliotheca Gonçalo Moniz: Memória da Saúde Brasileira

Bezerra, Tamires Barbosa

B574 Estudo do efeito do veneno de *Bothrops leucurus* em linhagens celulares de gliomas humanos / Tamires Barbosa Bezerra. Salvador: TB, Bezerra, 2014.

VII; 34 fls. :il. [graf., fig.].

Orientador: Prof. Dr. Ramon dos Santos El- Bachá.

Monografia como exigência parcial e obrigatória para Conclusão do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia (FMB) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

1. .Anticarcinogênico 2. *Bothrops leucurus* . 3. Glioma. 4. Venenos de serpentes . 5. Citotoxicidade. I. El-Bachá, Ramon dos Santos. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina. III. Título.

CDU: 591.145



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Estudo do efeito do veneno de *Bothrops leucurus* em linhagens celulares de gliomas humanos

Tamires Barbosa Bezerra

Professor orientador: **Ramon dos Santos El-Bachá**
Coorientadora: **Giselle Pinto de Faria Lopes**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60/2014.1, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia)
Agosto, 2014

Monografia: *Estudo do efeito do veneno de Bothrops leucurus em linhagens celulares de gliomas humanos*, de **Tamires Barbosa Bezerra**.

Professor orientador: **Ramon dos Santos El-Bachá**

Coorientador: **Giselle Pinto de Faria Lopes**

COMISSÃO REVISORA:

- **Ramon dos Santos El-Bachá** (Presidente, Professor orientador), Professor do Departamento de Biofunção do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.
- **Luciana Lyra Casais e Silva**, Professora do Departamento de Biorregulação do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.
- **Igor Lima Maldonado**, Professor do Departamento de Biomorfologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO: Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no VII Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em ___ de _____ de 2014.

"Às vezes o mundo pode parecer um local hostil e sinistro, mas acredite, há mais bem do que mal no mundo. Tudo que você tem que fazer é olhar com mais cuidado e o que antes parecia algo assustador pode, de fato, ser o primeiro passo de uma grande jornada." Lemony Snicket

Ao meu Deus, meus avós, meus pais e
minha irmã.

EQUIPE

- Tamires Barbosa Bezerra, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA. Correio-e: tamiresbb@hotmail.com;
- Ramon dos Santos El-Bachá, Instituto de Ciências da Saúde (ICS) /UFBA;
- Giselle Pinto De Faria Lopes, Instituto de Ciências da Saúde (ICS) /UFBA;
- Milena, Estudante do Curso de Bacharelado em Biotecnologia /ICS-UFBA.
- João Gabriel Jagersbacher Passos Oliveira, Estudante de Medicina (FMB-UFBA), do PET-Medicina

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

- Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)
- Instituto de Ciências da Saúde (ICS)

FONTES DE FINANCIAMENTO

Convênio de Assistência Técnica Financeira BNB/FAPEX/UFBA publicada no D.O.U. de 16/01/2012.

AGRADECIMENTOS

- ◆ Ao meu Professor orientador, Doutor Ramon dos Santos El-Bachá, pela presença constante , grande apoio e pela ajuda durante toda a confecção da Monografia.
- ◆ À Doutora Giselle Pinto De Faria Lopes, minha Coorientadora, pelo ensino das habilidades e técnicas laboratoriais indispensáveis para a elaboração dessa Monografia, assim como pela ajuda durante as outras etapas
- ◆ Aos acadêmicos Milena Pustilnik Pontes pelo auxílio constante nas atividades laboratoriais e João Gabriel Jagersbacher Passos Oliveira pela colaboração no levantamento das fontes de estudo da ação de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* em células tumorais.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS, QUADROS E TABELAS	2
ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS	3
I. RESUMO	4
II. OBJETIVOS	5
III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
IV. METODOLOGIA	10
IV.1. Manutenção das linhagens celulares	10
IV.2. Obtenção do veneno de <i>Bothrops leucurus</i>	10
IV.3. Experimento de viabilidade celular (MTT)	10
IV.4. Análise estatística	11
IV.5. Imunocitoquímica para marcação de proteína glial fibrilar ácida	12
IV.6. Análise do tipo de morte celular	12
V. RESULTADOS	14
V.1 Experimento de viabilidade celular (MTT)	14
V.2 Imunocitoquímica para marcação de proteína glial fibrilar ácida	17
V.3 Análise do tipo de morte celular	19
VI. DISCUSSÃO	21
VII. CONCLUSÕES	25
VIII. SUMMARY	26
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS, QUADROS E TABELAS

GRÁFICOS

- GRÁFICO 1.** Efeito da ação do veneno de *Bothrops leucurus* na viabilidade celular dos gliomas humanos U251. Pág.15
- GRÁFICO 2.** Efeito da ação do veneno de *Bothrops leucurus* na viabilidade celular dos gliomas humanos U251. Pág.15
- GRÁFICO 3.** Efeito da ação do veneno de *Bothrops leucurus* na viabilidade celular dos gliomas humanos U87. Pág.17
- GRÁFICO 4.** Efeito da ação do veneno de *Bothrops leucurus* na viabilidade celular dos gliomas humanos U87. Pág.17
- GRÁFICO 5.** Tipo de morte celular induzida pelo veneno de *Bothrops leucurus*. Pág.20

FIGURAS

- FIGURA 1.** Efeito do veneno de *Bothrops leucurus* em células de glioma humano U251. Pág.16
- FIGURA 2.** Imunocitoquímica de glioma humano da linhagem U51 para expressão de GFAP. Pág.18

ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BIL - Lectina isolada do veneno de *Bothrops leucurus*.

CDB - Convenção da Diversidade Biológica.

DA - Diaminobenzidina.

DMEM/F12 - Dubelcco's Modified Eagle Medium com a mistura de nutriente F-12.

D.O - Densidade Ótica.

EC50 - A concentração necessária para diminuir em 50% a viabilidade celular.

FITC – Isotiocianato de fluoresceína.

GBM - Glioblastoma multiforme.

GFAP - Proteína ácida do gliofilamento (Glial fibrillary acidic protein).

HUTU – Adenocarcinoma.

IL – Interleucina.

INF – Interferon.

K562 - Leucemia mielocítica crônica.

MKN-45 - Carcinoma gástrico humano.

MTT - 3-(-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio.

NOAP - Núcleo de Ofiologia e Animais Peçonhentos.

PBS - Tampão fosfato salino.

PBS-T - Tampão fosfato salino com Tween.

PI - Iodeto de propídio.

RKO - Carcinoma de cólon.

SFB - Soro fetal bovino.

TNF - Fator de necrose tumoral.

UFBA - Universidade federal da Bahia.

U251 e U87 - Células de glioma humano.

I - Resumo

Introdução: O potencial de toxinas animais vem sendo explorado no desenvolvimento de medicamentos anticancerígenos. Toxinas de serpentes do gênero *Bothrops* podem ter ação antitumoral, entretanto há poucos relatos sobre a ação dessas toxinas ofídicas em gliomas, que apresenta enormes desafios no seu tratamento. **Objetivo:** O estudo visa avaliar o efeito da ação do veneno total de *Bothrops leucurus* em duas linhagens de glioma humano, U251 e U87. **Metodologia:** Trata-se de um estudo experimental *in vitro*. Células da linhagem U251 e U87 foram expostas a concentrações crescentes de veneno total de *Bothrops leucurus* durante 24h. A viabilidade celular foi avaliada através de experimentos de MTT. Para determinar variações significativas entre as condições foi utilizado o teste Kruskal-Wallis; os valores obtidos foram considerados significativos para valores de $p < 0,05$. Células U251 foram submetidas a uma marcação imunocitoquímica para GFAP. Avaliou-se o tipo de morte celular por citometria de fluxo através dos marcadores anexina V-FITC e iodeto de propídio. **Resultados:** Houve diminuição da viabilidade celular das linhagens de glioma humano, após exposição ao veneno. A EC50 foi de 3,34 $\mu\text{g/mL}$ para U251. O mecanismo de morte celular predominante foi necrose. Não foram realizados experimentos suficientes com U87. **Discussão:** A diminuição da viabilidade celular após exposição ao veneno está em consonância com trabalhos prévios. O principal tipo de morte induzido pela ação de veneno de *Bothrops* seria apoptose, devido a presença de lectinas e L-aminoácido oxidase no veneno de *Bothrops leucurus*; entretanto o mecanismo de morte celular predominante foi necrose, o que poderia estar associado à ação de metaloproteinases. **Conclusão:** Houve uma ação citotóxica do veneno em relação às células U251 principalmente através de necrose. São importantes estudos posteriores que elucidem os mecanismos de morte celular de gliomas tratados com frações desse veneno.

Palavras-chave: Anticarcinogênico, *Bothrops leucurus*, Glioma, Venenos de serpentes, Citotoxicidade

II – Objetivos

O presente estudo visou avaliar o efeito da ação do veneno total de *Bothrops leucurus* em duas linhagens de glioma humano, U251 e U87

Objetivos Secundários

1. Observar a viabilidade celular de linhagens celulares de gliomas U87 e U251 diante do tratamento com concentrações crescentes do veneno total de *Bothrops leucurus*.
2. Observar alterações morfológicas nas células de glioma tratadas com esse veneno.
3. Verificar o tipo de morte celular nas linhagens de gliomas causada pela ação do veneno total de *Bothrops leucurus*.

III - Fundamentação Teórica

De acordo com dados da Convenção da Diversidade Biológica (CDB), o Brasil hospeda entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo considerado o maior do planeta em número de espécies endêmicas (Barreiro e Bolzani, 2009). Essa biodiversidade apresenta alto potencial científico, tecnológico e conseqüentemente econômico e se configura como uma ferramenta para fomentar a pesquisa básica multidisciplinar e para o desenvolvimento de biotecnologia (Gomes, 2011; Barreiro e Bolzani, 2009) principalmente na área de desenvolvimento de novos medicamentos. A farmacologia moderna não teria sido possível sem o desenvolvimento de pesquisas sobre substâncias biologicamente ativas que podem ser extraídas de plantas, toxinas animais, fungos e micro-organismos. Inúmeros fármacos tiveram nos produtos naturais um ponto de partida (Barreiro e Bolzani, 2009). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapia atual vêm sendo desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo bastante notável a importância dessas fontes principalmente para antibióticos, assim como diversos agentes anticâncer com diferentes mecanismos de ação (Calixto, 2003; Barreiro e Bolzani, 2009).

Nesse contexto, as toxinas animais, contribuíram enormemente para a descoberta e desenvolvimento de compostos terapêuticos (Lameu et al., 2010). Toxinas ofídicas apresentam potencial de serem utilizadas em células humanas com propósitos terapêuticos uma vez que geram diversos efeitos biológicos por apresentarem em sua composição uma variedade de substâncias biologicamente ativas que variam a depender da espécie (de Vieira Santos et al., 2008). A literatura mostra que esse potencial vem sendo grandemente explorado através da realização de estudos experimentais que verificam a ação de toxinas ofídicas totais ou de suas frações no tratamento de tumores animais. O tratamento com o veneno de serpentes pode levar a alteração da morfologia e morte das células tumorais (Da Silva et al., 2002) e além disso foi relatado que diversas toxinas ofídicas são conhecidas por inibirem a adesão de células cancerosas, inibirem migração e crescimento tumoral além de metástases induzidas em modelos experimentais de ratos (Corrêa et al., 2002).

Há muito foi descrito atividade citotóxica ou lítica em células de carcinomas mamário, epidérmico, uterino cervical, de laringe e melanoma por ação de frações ou do veneno total de serpentes do gênero *Bothrops* (Barros et al., 1998). Em estudos *in vitro*, os efeitos descritos vão depender da concentração e do tempo de contato do veneno com o tumor (Da Silva et al., 2002), assim como variam a depender da espécie de serpente que produz o veneno e do tipo celular que está sendo exposto a ele (Oliveira et al., 2002).

Desde então, diversos estudos vêm sendo realizados *in vitro* ou *in vivo*, com frações ou venenos totais que demonstram cada vez mais o potencial das toxinas ofídicas de serpentes encontradas em território brasileiro como *Bothrops jararaca*, *B. leucurus*, *B. pauloensis* e *B. jararacussu* no desenvolvimento de drogas anticancerígenas (Barros et al., 1998; Rodrigues et al., 2009; Higuchi et al., 2011; Naumann et al., 2011; Nunes et al., 2012). Esses últimos trabalhos estudaram a ação desses venenos em neoplasias malignas como leucemia aguda de células T (Rodrigues et al., 2009), tumor ascítico de Ehrlich (Rodrigues et al., 2009; Higuchi et al., 2011), carcinoma gástrico humano (MKN-45), adenocarcinoma (HUTU), carcinoma de cólon (RKO) (Naumann et al., 2011), leucemia mielocítica crônica (K562) e carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano (Nunes et al., 2012) entre outros.

Está claramente demonstrado a toxicidade para as células tumorais de diversas linhagens *in vitro* (de Vieira Santos et al., 2008.). A literatura demonstra, ainda, atividade apoptótica em células tumorais (Nunes et al., 2012) e normais por parte de toxinas ofídicas (Da Silva et al., 2002).

Além de atividade citotóxica direta, estudos *in vivo* e *in vitro* apontam o potencial de toxinas ofídicas de *Bothrops atrox*, *B. jararacussu*, *B. jararaca*, *B. leucurus* e de *B. asper* em gerar um estímulo à secreção de citocinas como: TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12 criando um microambiente inflamatório que potencializaria respostas inespecíficas contra tumores (Moreira et al., 2012; de Vieira Santos et al., 2008; Zamuner et al., 2002; Carneiro et al., 2002; Nunes et al., 2011). A própria imunidade contra tumores mediada por linfócitos T pode ser aumentada pela ação de citocinas no ambiente tumoral. É importante ressaltar que os trabalhos citados anteriormente a respeito da toxicidade dos venenos e sua ação nas células normais utilizam uma concentração abaixo da que seria considerada tóxica em trabalhos feitos *in vitro* com células normais (Bustillo et al., 2009; Oliveira et al., 2002).

A serpente *Bothrops leucurus* é uma serpente endêmica da mata atlântica e comum em Salvador e Região Metropolitana. Atualmente vêm sendo realizados estudos *in vivo* e *in vitro* sobre o isolamento e mecanismo de ação de frações do veneno como leucorogina (Higuchi et al., 2011), L-amino ácido oxidase (Naumann et al., 2011) e lectina de *Bothrops leucurus* (Nunes et al., 2012) em tumores como tumor ascítico de Ehrlich (Higuchi et al., 2011), carcinoma gástrico humano (MKN-45), adenocarcinoma (HUTU), carcinoma de cólon (RKO) (Naumann et al., 2011), leucemia mielocítica crônica (K562) e carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano (Nunes et al., 2012).

O glioblastoma (GBM) acomete células gliais presentes no sistema nervoso central. Atualmente o tratamento considerado o mais efetivo seria a ressecção cirúrgica cerebral seguida de radioterapia associado ao tratamento adjuvante da temozolomida (Dunn et al., 2012). Apesar de esforços, a

mediana de sobrevivência dos pacientes com GBM raramente ultrapassa 14 meses (Brandes et al., 2008)

O conhecimento atual sugere que o crescimento continuado e sobrevivência dos glioblastomas ocorrem devido à falha de uma resposta imune efetiva (Dunn et al., 2012). Dessa forma, há a possibilidade de uma ação antitumoral dos venenos de *Bothrops* não só através de sua possível ação citotóxica já descrita em outras linhagens de células (Higuchi et al., 2011; Naumann et al., 2011; Nunes et al., 2012), mas também através da ativação de um microambiente inflamatório, aumentando a permeabilidade vascular e o influxo linfocitário. Citocinas como INF- γ IL-15, IL-12, IL-2, TNF- α têm potencial de aumentar respostas inflamatórias inespecíficas contra tumores além da imunidade mediada por linfócitos T, imunidade essa que vem sendo descrita como tendo um papel vital no sistema nervoso central em supressão tumoral (Kushen et al., 2007). Estudo realizado por Chiu e colaboradores (2012), em ratos Wistar, mostraram que o aumento da concentração intracerebral de IL-12 levou a uma maior infiltração de microglia ativada em glioblastomas levando a um crescimento menor dos tumores e uma sobrevida maior dos grupos em que a concentração de IL-12 cerebral era maior (Chiu et al., 2012).

Ainda que, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, os gliomas estejam apenas entre 1% de tumores com maior incidência no Brasil, eles apresentam um alto índice de morbidade e mortalidade e apresentam enormes desafios no seu tratamento. O glioblastoma é o mais comum e o mais agressivo tumor primário maligno cerebral e é considerado praticamente incurável (Bielamowicz et al., 2013).

Em um país como o Brasil, fonte de extensa biodiversidade, é extremamente importante o desenvolvimento de pesquisas no sentido de buscar, novas substâncias biologicamente ativas com poder antitumoral em tumores malignos do sistema nervoso central.

O presente estudo visou avaliar o efeito da ação do veneno total de *Bothrops leucurus* em duas linhagens de glioma humano, U251 e U87.

IV - Metodologia

IV.1 Manutenção das linhagens celulares

Neste trabalho foram utilizadas linhagens celulares U251 e U87 estabelecidas a partir de GBM. As células foram cultivadas com meio de cultura DMEM/F12 (Dubelcco's Modified Eagle Medium com a mistura de nutriente F-12) e 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em estufa sob atmosfera úmida com 5% de gás carbônico à temperatura de 37°C. Para o repique, as células foram lavadas duas vezes com meio e incubadas com tripsina 0,25% durante 3 minutos a 37°C. Após a incubação, as células foram recuperadas em um tubo e lavadas com meio e em seguida centrifugadas por 5 minutos a 400g. Em seguida, todas as células foram coradas com Azul de Tripán 0,25% e as células vivas foram contadas em câmara de Neubauer.

IV.2 Obtenção do veneno de Bothrops leucurus

O veneno de *Bothrops leucurus* foi coletado através da pressão manual das glândulas de serpentes e, em seguida, foi seco à vácuo, pesado em balança analítica e estocado a -20 °C. A extração foi realizada com as serpentes anestesiadas em atmosfera de CO₂, no NOAP (Núcleo de Ofiologia e Animais Peçonhentos), Instituto de Biologia, UFBA.

IV.3 Experimento de viabilidade celular (MTT)

Após o plaqueamento das células (10⁴/poço) em placas de 96 poços, estas foram mantidas por um período de 24 horas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após este período, as células foram tratadas durante 24 horas nas seguintes condições: células com meio de cultura (controle) ou células com veneno de *Bothrops leucurus* nas concentrações de 0,5 a 10 µg/mL

O método MTT consiste em um ensaio colorimétrico baseado na atividade de desidrogenases mitocondriais, as quais reduzem o sal brometo de 3-(4,5-di-metiliazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium no produto formazana. Considerando o intervalo de tempo de incubação de 24 horas, duas horas antes de terminar este tempo, foi retirado o sobrenadante e adicionou-se 20µL da solução de MTT/PBS (5mg/mL) com 80 µL de meio em todos os poços. Após a homogeneização completa para dissolução dos cristais de sal formados pelo metabolismo mitocondrial das células viáveis, a

coloração obtida foi lida pelo colorímetro (Beckman Coulter) no comprimento de onda de 550 nm. O percentual de viabilidade foi obtido através da seguinte fórmula:

$$[(\text{Densidade Óptica (D.O.) das células tratadas com o veneno/ mediana das D.O. das células controle}) \times 100].$$

Foram realizados 4 experimentos independentes em octuplicatas com a linhagem celular U251 e 2 experimentos em octuplicata com a linhagem celular U87.

Foram tiradas fotos de 5 poços aleatórios de cada condição das células U251, em contraste de fase com um aumento total de 200x.

IV.4 Análise estatística

Inicialmente os dados foram avaliados quanto à sua distribuição normal. Em seguida, os grupos foram comparados utilizando o teste Kruskal-Wallis para valores não paramétricos. Os valores obtidos foram considerados significativos quando o valor de p foi $< 0,05$. Os valores foram analisados através dos softwares estatísticos Excel (2007) e GraphPad Prisma 6 (Windows 7).

IV.5 Imunocitoquímica para marcação de proteína glial fibrilar ácida

Foram confeccionadas 16 lamínulas com células U251. Essas células foram tratadas durante 24 horas nas seguintes condições: quatro com meio de cultura (controles e controles-negativos) e oito com veneno de *Bothrops leucurus*; Quatro foram tratadas com concentração 2,5 $\mu\text{g/ml}$ e quatro com 5 $\mu\text{g/ml}$. Depois de 24h, as lamínulas foram fixadas com paraformaldeído a 16%, incubadas com PBS tween (PBS-T) a 0,3%. Em seguida, a peroxidase endógena foi inativada com solução a 3% de peróxido de hidrogênio e posteriormente as lamínulas foram submetidas a bloqueio com albumina do soro bovino dissolvida em PBS a 5%. O anticorpo primário utilizado foi anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP) humana de Santa Cruz 1/100 produzida em coelho e o anticorpo secundário utilizado foi o anticorpo biotilado anti coelho 1/100 do kit Sigma extra3-1kt100m4788extra31-14. O núcleo foi corado com diaminobenzidina (DAB) 1/50. Foram tiradas cinco fotos aleatórias em contraste de fase.

IV.6 Análise do tipo de morte celular

A anexina V é uma proteína dependente de cálcio que tem uma grande afinidade por fosfatidilserina, dessa forma pode ser utilizada para identificar células apoptóticas. O iodeto de propídio (PI) é usado para identificar células mortas por necrose. Células positivas para FITC-Anexina V e negativas para PI estariam em apoptose. Células positivas para FITC-Anexina V e PI estão no final do estágio de apoptose ou em estágio de necrose. Células negativas para FITC-Anexina V e PI estão viáveis. As células foram lavadas com PBS e ressuspensas em tampão. Foi adicionado 5µL de FITC-Anexina V e depois 10µL de PI. As células foram incubadas por 15 minutos e depois realizada a análise por citometria de fluxo com o programa Summit 4.3 para Windows.

V – Resultados

V.1 Experimento de viabilidade celular (MTT)

Ambas as linhagens foram tratadas com as mesmas concentrações do veneno de *Bothrops leucurus* durante 24h.

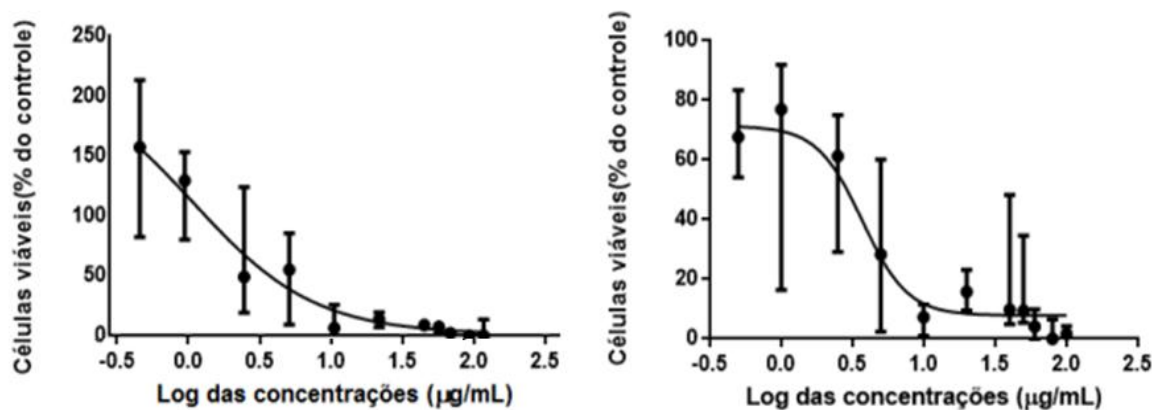
Através da técnica MTT foi observada diminuição da viabilidade celular das linhagens de glioma humano, através de um mecanismo dependente da concentração após 24 horas de exposição ao veneno de *Bothrops leucurus*. A concentração necessária para diminuir em 50% a viabilidade celular (EC50) variou ao se comparar as duas linhagens de glioma estudados, U87 e U251.

Quanto aos quatro experimentos realizados com a linhagem U251, foi obtido um valor mediano de 3,34 µg/mL para a EC50; houve variação entre 1,74 µg/mL e 5,63 µg/mL. Os gráficos 1 e 2 representam os valores mais próximo à mediana das EC50 calculadas para a linhagem U251. No gráfico 1 a EC50 encontrada foi de 3,68 µg/mL através da equação [1] em que V é a viabilidade celular e C é a concentração.

$$V = \{219,79/[1+10^{(-0,06 + 1,07\log C)}]\} + 1,41 \quad (R^2 = 0,86) \quad [1]$$

No gráfico 2 a EC50 encontrada foi de 3 µg/mL através da equação [2] em que V é a viabilidade celular e C é a concentração.

$$V = \{63,55/[1+ 10^{(-1,61 + 2,735 \log C)}]\} + 7,87 \quad (R^2 = 0,79) \quad [2]$$



Gráficos 1 e 2. Efeito da ação do veneno de *Bothrops leucurus* na viabilidade celular dos gliomas humanos U251 Foram realizados quatro experimentos de viabilidade celular (MTT) independentes com células da linhagem U251. Os gráficos 1 e 2 apresentam os valores de EC50 correspondendo a 3,68 µg/mL e 3 µg/mL, respectivamente. São a representação dos valores mais próximos à mediana das EC50 calculadas para a linhagem U251.

Houve dano celular relevante observado por microscopia em contraste de fase a partir da concentração 5 µg/mL em experimento realizado em linhagem de U251 (Figura 1). Até a concentração 2,5 µg/mL não foi possível observar em contraste de fase diferenças relevantes na confluência celular nem na morfologia das células. Na concentração 5 µg/mL é possível observar diminuição relevante da confluência, assim como, as células se apresentaram menores e com menos projeções do citoesqueleto. Na concentração 10 µg/mL não é possível observar células U251.

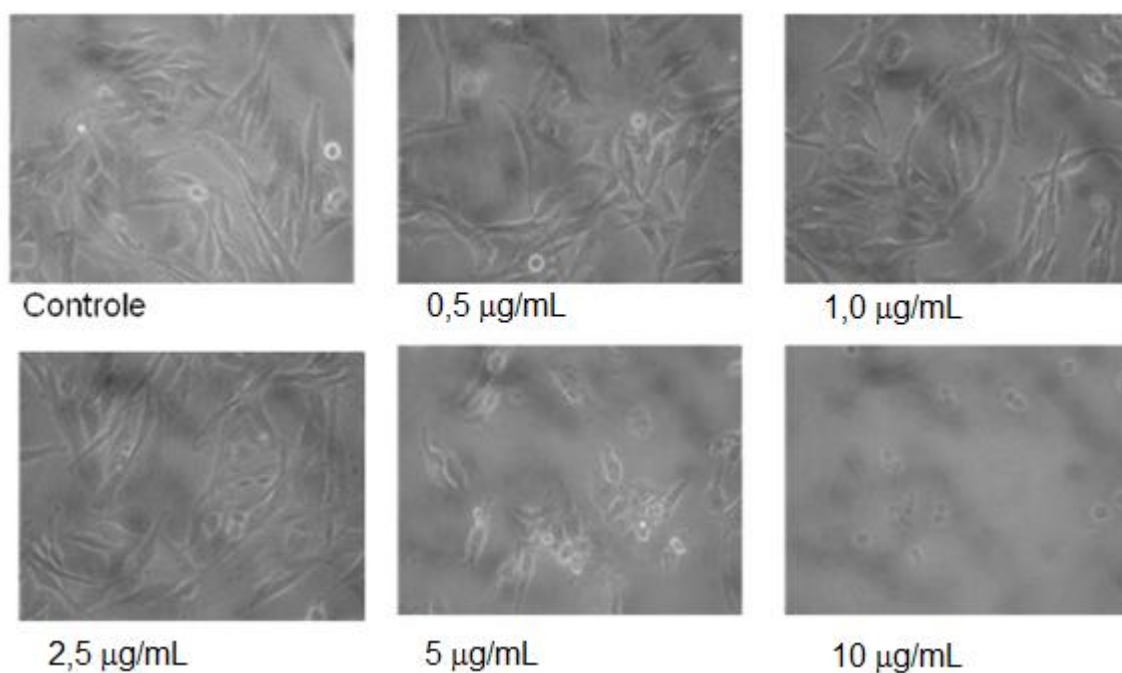


Figura 1. Efeito do veneno de *Bothrops leucurus* em células de glioma humano U251. As células foram tratadas em concentrações crescentes do veneno durante 24h. Micrografias em contraste de fase com um aumento total de 200x.

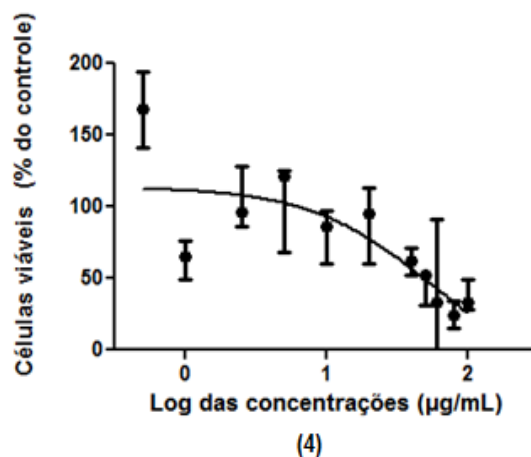
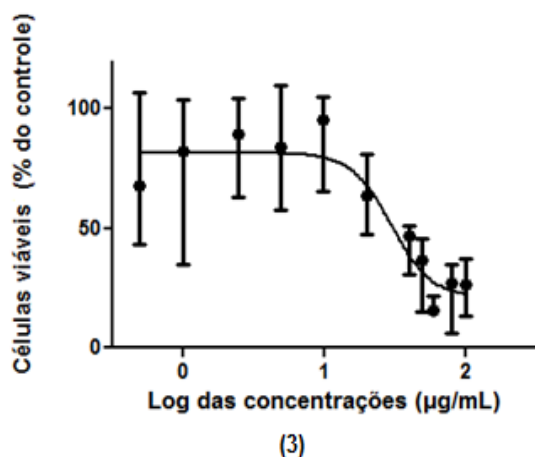
Foram realizados dois experimentos com a linhagem U87. Nesses experimentos as EC50 foram de 30,9 µg/mL calculada através da equação [4] em que V é a viabilidade celular e C é a concentração.

$$V = \{60,6/[1+10^{(-4,55 + 3,08\log C)}]\} + 21,01 \quad (R^2 = 0,74) \quad [4]$$

No segundo experimento a EC50 encontrada foi 49 µg/mL através da equação [5] em que V é a viabilidade celular e C é a concentração.

$$V = \{136,25/[1 + 10^{(\log C - 1,75)}]\} - 22,65 \quad (R^2 = 0,48) \quad [5]$$

Esses dados estão representados nos gráficos 3 e 4.



Gráficos 3 e 4. Efeito da ação do veneno de *Bothrops leucurus* na viabilidade celular dos gliomas humanos U87. Foram realizados dois experimentos independentes. O experimento representado no gráfico 3, apresentou uma EC50 de 30,9 µg/mL. O experimento representado no gráfico 4 apresentou uma EC50 de 49 µg/mL.

V.2 Imunocitoquímica para marcação de proteína glial fibrilar ácida

Células da linhagem U251 foram tratadas com veneno de *Bothrops leucurus* durante 24h nas concentrações 2,5 µg/mL e 5 µg/mL e através de imunocitoquímica, marcadas para proteína glial fibrilar ácida (GFAP) uma proteína monofilamentar expressa no citoesqueleto de células de gliomas.

Quando tratadas nessas duas concentrações de veneno é possível observar alterações morfológicas e diminuição da densidade celular, assim como da marcação para GFAP (Figura 2).

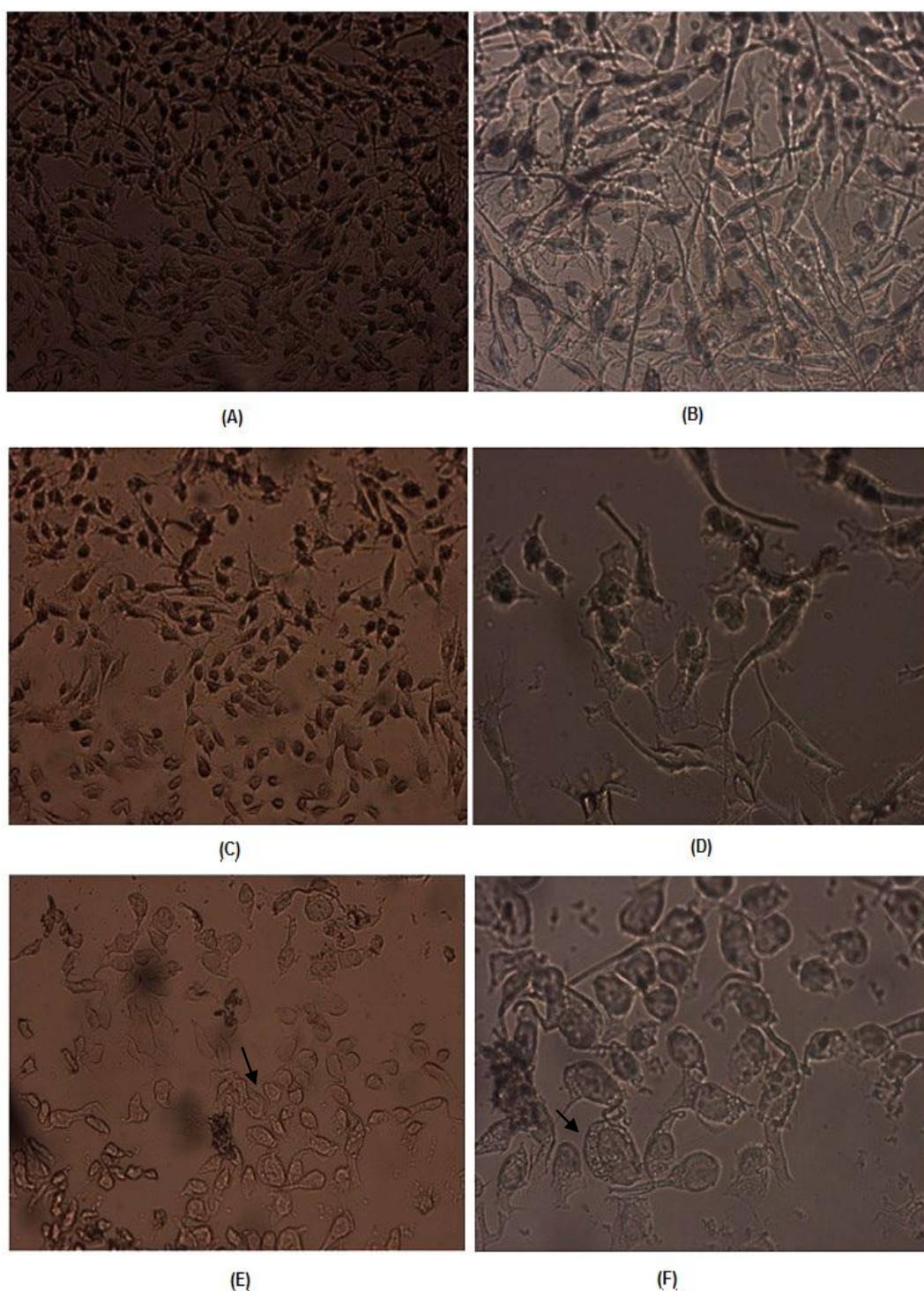


Figura 2. Imunocitoquímica de glioma humano da linhagem U51 para expressão de GFAP.

Fotos retiradas em microscopia em contraste de fase com um aumento total de 200x (2A,2C e 2E) e 400x (2B, 2D e 2F). Nas imagens das células não tratadas com veneno (2A e 2B) é possível observar marcação intensa para GFAP grande celularidade, e morfologia compatível com o tipo celular. As células tratadas com veneno na concentração de 2,5 µg/mL, apresentam uma menor marcação para GFAP associada a alterações morfológicas e uma diminuição relevante da celularidade (2C e 2D). Nas figuras 2E e 2F é possível observar as células tratadas com veneno na concentração 5 µg/mL, nas quais existe uma considerável diminuição da marcação para GFAP, assim como vacuolização das células como indicado nas setas em 2E e 2F.

V.3 Análise do tipo de morte celular

O envolvimento da apoptose na indução da morte das células da linhagem U251 foi avaliada utilizando-se o kit para marcação de anexina V-FITC e citometria de fluxo. Após o tratamento com veneno na concentração 10µg/mL foi possível observar que o percentual de células apoptóticas (anexina V positivas e PI negativas) correspondeu a 0,4% , sendo esse o valor mediano com variação entre 0,3% a 0,8%; 16,6% com variação até 14,4% corresponderam à células em apoptose tardia (anexina V e PI positivas) e 59,2% das células, com variação entre 54,6% e 78,7%, corresponderam a células em necrose (anexina V negativas e PI positivas); os valores do controle foram respectivamente 0,3% (com variação entre 0,2% e 1%), 0,8% (com variação entre 0,4% e 1%) e 1,25% (com variação entre 0,7% e 2,6%).como representado no Gráfico 5.

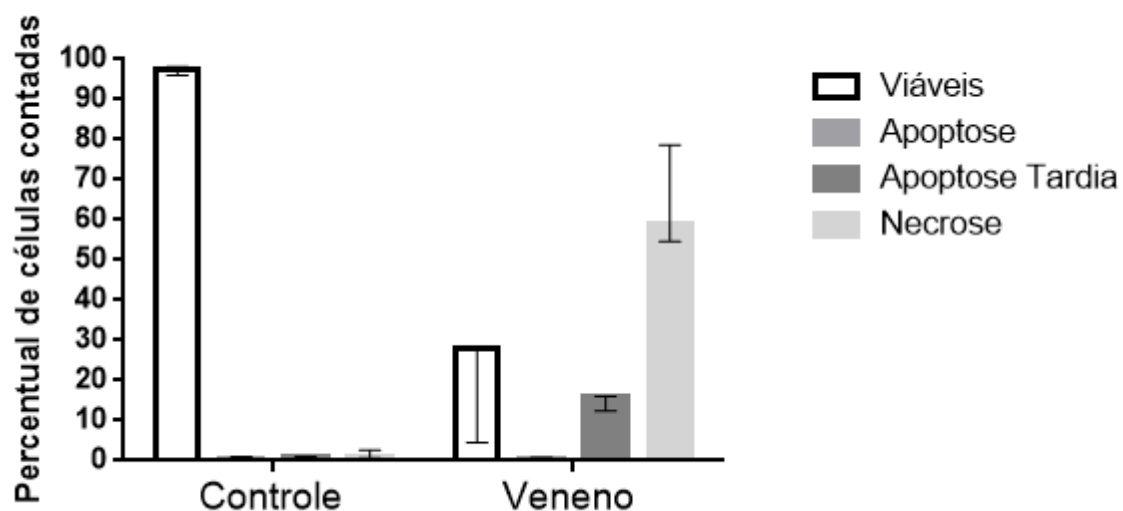


Gráfico 5. Tipo de morte celular induzida pelo veneno de *Bothrops leucurus*. Percentual de células vivas, em apoptose, apoptose tardia e necrose após tratamento durante 24h com veneno na concentração 10µg/mL. Os dados representam a mediana com variação pra cima e para baixo de três experimentos independentes.

VI - Discussão

Esse estudo avaliou a citotoxicidade sob a ação do veneno total de *Bothrops leucurus* em células de glioblastoma multiforme (U251) e o tipo de morte celular. O estudo através de ensaios de MTT demonstrou a citotoxicidade do veneno total de *Bothrops leucurus*. Também foram avaliadas alterações da morfologia celular através da observação em contraste de fase e de realização de imunocitoquímica. Além disso, foram avaliados os níveis de apoptose por citometria de fluxo através do marcador vital anexina V-FITC. Nas condições de cultivo adotadas nesse estudo, o veneno total permaneceu em contato direto com as células por 24h. A análise da linhagem U87 foi considerada apenas informação complementar, pois não foi possível a realização do experimento em triplicata.

A análise do ensaio de MTT demonstrou uma diminuição da viabilidade de células U251 cultivadas com o veneno, o que está em consonância com trabalhos prévios da ação de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* em células tumorais (Da Silva et al., 2002; Barros et al., 1998; Rodrigues et al., 2009; Higuchi et al., 2011; Naumann et al., 2011; Nunes et al., 2012).

O trabalho de Nunes et al. de 2012, utilizou a lectina isolada do veneno de *Bothrops leucurus* (BIL) durante 72h em linhagens humanas de carcinoma laríngeo (Hep-2), carcinoma pulmonar mucoepidermóide (NCI-H292) e de leucemia eritromieloblastoide (K562), nessas linhagens tumorais as EC50 encontradas foram de respectivamente $11,75 \pm 0,035$; $6,63 \pm 0,052$ e $15,42 \pm 0,060$ $\mu\text{g/mL}$ (Nunes et al., 2012). A EC50 do presente estudo se configurou como sendo mais baixa ($3,68 \mu\text{g/mL}$) o que pode ser atribuído às outras substâncias com potencial antitumoral ou citolítico encontradas no veneno total de *Bothrops leucurus*, tais como L-amino ácido oxidase (Naumann et al., 2011), desintegrinas (Higushi et al., 2011) e metaloproteínases (Wahby et al., 2011), assim como o tipo celular que está sendo exposto à substância interfere na EC50 (Oliveira et al., 2002).

O estudo de lectinas *in vitro* e *in vivo* já demonstraram seu potencial de ação antitumoral (De Mejía e Prisecaru, 2005). O estudo de Nunes e colaboradores de 2012 realizado a respeito da lectina isolada de veneno de *Bothrops leucurus* (Nunes et al., 2012), assim como estudos a respeito de lectina isolada de veneno de outras espécies de serpentes (Nolte et al., 2012; Gastma et al., 2004; Liu et al., 2009) sugerem que essa substância poderia combater progressão de diversos tipos de tumores como tumores gástricos (Nolte et al., 2012) e os já citados carcinoma laríngeo (Hep-2), carcinoma pulmonar mucoepidermoide (NCI-H292) e de leucemia eritromieloblastoide (K562) (Nunes et al., 2012) através da indução de apoptose e necrose em células tumorais (Nolte et al., 2011; Gastma et

al., 2004; Liu et al., 2009; Nunes et al., 2012). Além disso, essas substâncias teriam o potencial de inibir o crescimento de células endoteliais (Carvalho et al., 2001).

Acredita-se que o principal tipo de morte induzido pela ação de veneno de *Bothrops* seria por apoptose, por esse mecanismo ter relação com lectinas que estariam presentes no veneno de *Bothrops leucurus* (Nunes et al., 2012). Além das lectinas, as outras substâncias presentes no veneno de *Bothrops leucurus* e de todas outras serpentes do gênero *Bothrops*, tais como a enzima apoptótica L-amino ácido oxidase e desintegrinas, teriam o potencial de ação antitumoral principalmente através de mecanismos de indução da apoptose (Higushi et al., 2011; Naumann et al., 2011; Nolte et al., 2012; Pessatti et al., 1995; Tan e Ponndurai, 1991). É bem esclarecido que a L-amino ácido oxidase isolada de venenos de diversas espécies de serpente possui efeito antitumoral e apoptótico sobre diferentes tipos de células, incluindo gliomas (Suhr e Kim, 1996; Sun et al., 2003; De Vieira Santos et al., 2008).

A indução da apoptose é uma estratégia importante para terapia antitumoral (Nolte et al., 2012). Buscando avaliar o tipo de morte celular predominante nas células tratadas com o veneno total de *Bothrops leucurus* foi realizado uma avaliação dos níveis de apoptose por citometria de fluxo através da anexina V-FITC como marcador vital, que se associa aos resíduos de fosfatidilserina, externalizados no início do processo apoptótico. As células da linhagem U251 foram incubadas durante 24h com a concentração 10ug/mL de veneno total de *Bothrops leucurus*. Os resultados encontrados no presente estudo vão de encontro aos resultados de estudos utilizando frações do veneno de *Bothrops leucurus* em células normais e tumorais, que demonstravam predominância da apoptose nos mecanismos de morte celular (Higushi et al., 2011; Naumann et al., 2011) e em especial aos obtidos por Nunes e colaboradores em 2012, que avaliaram apoptose através da marcação com anexina V-FITC em células de leucemia eritromieloblastoide (K562) tratadas com BIL (15,42 µg/ mL) durante 72h. Nesse estudo foi observado que o número de células apoptóticas, o número de células em apoptose e o número de células em necrose correspondiam a 70,5%, menos de 1% e menos de 2% respectivamente (Nunes et al., 2012).

Os resultados encontrados no presente trabalho também divergem, quanto ao tipo de morte predominante (Nolte et al., 2011; Moura-da-Silva e Baldo, 2012; De Vieira Santos et al., 2008; Torii et al., 1997). Tendo isso em vista, é importante destacar a possibilidade de que a atividade citotóxica, quando é feito o experimento com o veneno total de *Bothrops leucurus*, seja principalmente pela ação de metaloproteinases, entre outras proteases existentes, substâncias abundantemente presentes em toxinas ofídicas (Wahby et al., 2011).

Uma das limitações desse trabalho foi justamente a impossibilidade de estudar a ação do veneno em células normais. É interessante ressaltar que enquanto trabalhos demonstram toxicidade maior de venenos integrais quando agindo na célula neoplásica em relação a células normais (Lipps et al., 1999; Bragança et al., 1967), outros demonstram justamente a maior toxicidade sobre a célula normal em relação à célula neoplásica (Rizzo e Tuchiya, 1972) e alguns afirmam ainda, que além das linhagens estudadas isso também depende quanto ao tempo de exposição ao veneno (Da Silva et al., 2002).

Quanto a estudos realizados com frações de veneno, o trabalho de Nunes e colaboradores de 2012, afirmam que BIL não induz apoptose em células humanas normais. Portanto é ideal que estudos futuros sejam feitos com linhagens glioma murino (C6) assim como em astrócitos de rato para avaliar a diferença entre as toxicidades. Além disso, é importante o estudo da ação em outras linhagens humanas de gliomas uma vez que os resultados apresentados na linhagem U87 aparentam divergir dos resultados da U251, sendo necessários novos experimentos para elucidar as questões.

VII – Conclusões

1. Os resultados em conjunto demonstraram uma ação citotóxica do veneno total de *Bothrops leucurus* em relação às células de U251, cuja a EC50 foi de 3,34 µg/mL no curso de 24h.
2. O mecanismo de morte celular preponderante é necrose.
3. São importantes estudos posteriores que elucidem os mecanismos de morte celular de gliomas tratados com frações desse veneno, assim como é importante o estudo da ação dessas frações em astrócitos normais, para explorar mais o potencial do veneno de *Bothrops leucurus* de gerar produtos antitumorais.

VIII – Summary

Introduction : The potential of animal toxins has been exploited in the development of anticancer drugs. Toxins of *Bothrops* may have antitumor action, however there are few reports on the action of these toxins in gliomas, which presents huge challenges in their treatment. **Objective :** This study aims to evaluate the effect of the action of *Bothrops leucurus*' crude venom in human gliomas (U251 and U87). **Methodology:** This is an experimental in vitro study. U251 and U87 cells were exposed to increasing concentrations of *Bothrops leucurus*' crude venom for 24h. Cell viability was assessed by MTT experiments. To determine significant differences between the conditions the test Kruskal-Wallis was used; the values were considered significant for p values < 0.05. U251 cells were subjected to immunocytochemical labeling for GFAP. We evaluated the type of cell death by flow cytometry using the annexin V-FITC. **Results:** There was a decrease in cell viability of human glioma lines after exposure to venom. The EC50 was 3.34 mg / mL for U251. The predominant mechanism of cell death is necrosis. Not enough experiments were performed with U87. **Discussion :** The decrease in cell viability after exposure to the poison is in line with previous studies. It is believed that the main type of death induced by the action of *Bothrops* apoptosis was due to the presence of lectins and L- amino acid oxidase in the venom of *Bothrops leucurus*; however, the predominant mechanism of cell death was necrosis, which could be associated to the action of metalloproteinase. **Conclusions :** There was a cytotoxic action of venom compared to U251 cells mainly through necrosis. Further studies are important to elucidate the mechanisms of cell death in gliomas treated with fractions of this poison.

Keywords: Anticarcinogenic, *Bothrops leucurus*, Glioma, Snake venoms, Cytotoxicity.

VIII - Referências Bibliográficas

1. Barreiro EJ, Bolzani VS. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Quim Nova* 2009;32:679-688.
2. Barros SF, Friedlanskaia I, Petricevich VL and Kipnis TL. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venoms. *Mediators Inflamm* 1998;7:339–346.
3. Bielałowicz K, Khawja S, Ahmed N. Adoptive cell therapies for glioblastoma. *Front Oncol* 2013;3:275.
4. Bragança BM, Patel NT, Bradinath PG. Isolation and properties of a cobra venom factor selectively cytotoxic to Yoshida sarcoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1967;136:508–520.
5. Brandes AA, Tosoni A, Spagnoli F, Frezza G, Leonardi M, Calucci F et al. Disease progression or pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy treatment: Pitfalls in neurooncology. *Neuro Oncol* 2008;10:361-367.
6. Bustillo S, Lucero H, Leiva LC, Acosta O, Kier Joffé EB, Gorodner JO. Cytotoxicity and morphological analysis of cell death induced by *Bothrops* venoms from the northeast of Argentina. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2009;15:28-42.
7. Calixto JB. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Cienc Cult* 2003;55:37-39.
8. Carneiro AS, Ribeiro OG, De Franco M, Cabrera WH, Vorraro F, Siqueira M et al. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxicon* 2002;40:1571-1579.
9. Carvalho DD, Schmitmeier S, Novello JC, Markland FS. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. *Toxicon* 2001;39:1471–1476.
10. Chiu TL, Wang MJ, Sum CC. The treatment of glioblastoma multiforme through activation of microglia and TrAIL induced by rAAV2-mediated-IL-12 in a syngeneic rat model. *J Biomed Sci* 2012;19:45.
11. Corrêa MC Jr, Maria DA, Moura-da-Silva AM, Pizzocaro KF, Ruiz IR. Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. *Toxicon* 2002;40:739-748.
12. Da Silva RJ, Da Silva MG, Vilela LC, Fecchio D. Antitumor effect of *Bothrops jararaca* venom. *Mediators Inflamm* 2002;11:99–104.
13. De Mejía EG, Prisecaru VI. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer Treatment. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005;45:425-445.
14. De Vieira Santos MM, Sant'Ana CD, Giglio JR, da Silva RJ, Sampaio SV, Soares AM et al. Antitumoral effect of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102:533-542.
15. Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, Genovese G, Quayle SN, Dunn IF et al. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev* 2012;26:756-784.
16. Gastman B, Wang K, Han J, Zhu ZY, Huang X, Wang GQ et al. A novel apoptotic pathway as defined by lectin cellular initiation. *Biochim Biophys Res Commun* 2004; 26:6263-6271.
17. Gomes GG. Biodiversidade como fonte de desenvolvimento para a indústria farmacêutica: Uma análise crítica ao atual marco regulatório de Acesso e Repartição de Benefícios. Rio de Janeiro. Monografia [Graduação em Curso de Altos Estudos de Política e Estratégia] – Escola Superior de Guerra; 2011.

18. Higuchi DA, Almeida MC, Barros CC, Sanchez EF, Pesquero PR, Lang EA et al. Leucurogin, a new recombinant disintegrin cloned from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) with potent activity upon platelet aggregation and tumor growth. *Toxicon* 2011;58:123-129.
19. Kushen MC, Sonabend AM, Lesniak MS. Current immunotherapeutic strategies for central nervous system tumors. *Surg Oncol Clin N Am* 2007;16:987-1004.
20. Lameu C, Pontieri V, Guerreiro JR, Oliveira EF, da Silva CA, Giglio JM et al. Brain nitric oxide production by a proline-rich decapeptide from *Bothrops jararaca* venom improves baroreflex sensitivity of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens* 2010;33:1283-1288.
21. Lipps BV. Novel snake venom proteins cytolytic to cancer cells in vitro and in vivo systems. *J Venom Anim Toxins* 1999;5:173-183.
22. Liu B, Min MW, Bao JK. Induction of apoptosis by Concanavalin A and its molecular mechanisms in cancer cells. *Autophagy* 2009;5:432-433.
23. Moreira V, Dos-Santos MC, Nascimento NG, Borges da Silva H, Fernandes CM, D'Império Lima MR et al. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. *Toxicon* 2012;60:125-129.
24. Moura-da-Silva AM, Baldo C. Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*. *Toxicon* 2012;60:280-289.
25. Naumann GB, Silva LF, Silva L, Faria G, Richardson M, Evangelista K et al. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. *Biochim Biophys Acta* 2011;1810:683-694.
26. Nolte S, de Castro Damasio D, Baréa AC, Gomes J, Magalhães A, Mello Zischler LF et al. BJcuL, a lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly. *Toxicon* 2012;59:81-85.
27. Nunes DC, Rodrigues RS, Lucena MN, Cologna CT, Oliveira AC, Hamaguchi A et al. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A2 from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2011;154:226-233.
28. Nunes ES, Souza MA, Vaz AF, Silva TG, Aguiar JS, Batista AM et al. Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. *Toxicon* 2012;59:667-671.
29. Oliveira JC, De Oca HM, Duarte MM, Diniz CR, Fortes-Dias CL. Toxicity of South American snake venoms measured by an in vitro cell culture assay. *Toxicon* 2002;40:321-325.
30. Pessatti M, Fontana JD, Furtado MF, Guimãraes MF, Zanette LR, Costa WT et al. Screening of *Bothrops* snake venoms for L-amino acid oxidase activity. *Appl Biochem Biotechnol* 1995;51:197-210.
31. Rizzo E, Tuchiya HN. Cytopathic effect by *Bothrops jararaca* venom on animal cell cultures. *Cienc Cult* 1972;24:184-189.
32. Rodrigues RS, da Silva JF, Boldrini França J, Fonseca FP, Otaviano AR, Henrique Silva F et al. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Biochimie* 2009;91:490-501.
33. Suhr SM, Kim DS. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Biochim Biophys* 1996;224:134-139.
34. Sun LK, Yoshii Y, Hyodo A, Tsurushima H, Saito A, Harakuni T et al. Apoptotic effect in the glioma cells induced by specific protein extracted from Okinawa Habu (*Trimeresurus flavo- viridis*) venom in relation to oxidative stress. *Toxicol In Vitro* 2003;17:169-177.

35. Tan NH, Ponndurai G. A comparative study of the biological properties of some venoms of snakes of the genus *Bothrops* (American lance-headed viper). *Comp Biochem Physiol* 1991;100:361–365.
36. Torii S, Naito M, Tsuruo T. Apoxin I a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom. *J Biol Chem* 1997;272:9539–9542.
37. Wahby AF, Abdel-Atya AM, El-Kady EM. Purification of hemorrhagic SVMPS from venoms of three vipers of Egypt. *Toxicon* 2011;59:329-327.
38. Zamuner SR, Teixeira CF. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. *Mediators Inflamm* 2002;11:351–357.