

**ALEXANDRE PEREIRA**

**TOXICIDADE SELETIVA DA CROTAMINA DO VENENO DE  
*Crotalus durissus terrificus* SOBRE AS CÉLULAS INDUTORAS DE  
TUMORES.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
Interunidades em Biotecnologia USP, Instituto  
Butantan IPT, para obtenção do título de Doutor  
em Biotecnologia. Área de concentração:  
Biotecnologia

São Paulo  
2011

**ALEXANDRE PEREIRA**

**TOXICIDADE SELETIVA DA CROTAMINA DO VENENO DE  
*Crotalus durissus terrificus* SOBRE AS CÉLULAS INDUTORAS DE  
TUMORES.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP, Instituto Butantane IPT, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Irina Kerkis

Versão corrigida

São Paulo  
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Pereira, Alexandre.

Toxicidade seletiva da crotamina do veneno de *Crotalus durissis terrificus* sobre as células indutoras de tumores / Alexandre Pereira. - São Paulo, 2011.

Orientador: Irina Kerkis.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Toxinologia Aplicada.

Versão do título para o inglês: Cancer Cells selective toxicity of crotamine, *Crotalus durissis terrificus*.

Descritores: 1. Citotoxinas 2. Venenos de origem animal 3. Peptídeo 4. Crotamina 5. Células B16-F10 6. Melanomas Murinos I. Kerkis, Irina II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0114/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Alexandre Pereira.

Título da Tese: Toxicidade seletiva da crotamina do veneno de *Crotalus durissis terrificus* sobre as células indutoras de tumores.

Orientador(a): Irina Kerkis.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO BUTANTAN

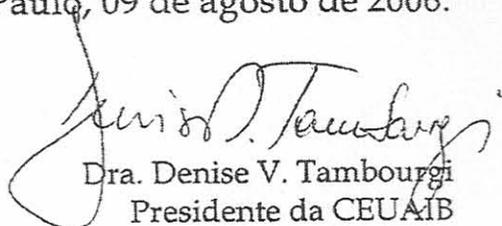
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil  
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

---

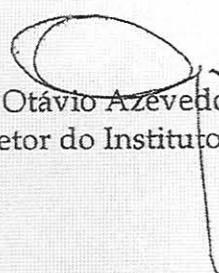
**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação n° 250/06, sobre o projeto intitulado "Estudo da plasticidade de células não diferenciadas: células-tronco adultas e células cancerígenas em modelo animal", sob a responsabilidade de Irina Kerkis está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 08/08/2006.

São Paulo, 09 de agosto de 2006.

  
Dra. Denise V. Tambourgi  
Presidente da CEUAIB

De acordo:

  
Dr. Otávio Azevedo Mercadante  
Diretor do Instituto Butantan

**Ao meu pai (*in memoriam*),  
À minha mãe,  
À minha sogra (*in memoriam*),  
Aos meus filhos Victor e Hector,  
Pelo estímulo que representam.**

**À Cida, pelo apoio na  
concretização de  
nossos ideais.**

## AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de registrar nosso respeito e agradecimento ao Programa de Pós-Graduação em Interunidades, pela oportunidade que nos deu para o desenvolvimento de nossa formação científica e cultural.

Somos imensamente gratos à Dra. Maria Luiza Beçak e ao Prof. Dr. Willy Beçak, por nos receber no Laboratório de Genética do Instituto Butantan, onde fomos bem orientados em desenvolvimento de projetos com publicações.

Somos igualmente gratos à Dra. Irina Kerkis e ao Prof. Dr. Alexandre Kerkis, por nos orientar e proporcionar as condições necessárias de pesquisa no Laboratório de Genética do Instituto Butantan, onde este trabalho foi executado.

Durante o período em que trabalhamos no Programa de Pós-Graduação, recebemos ensinamentos, compreensão e amizade de muitos colegas do corpo técnico científico e auxiliar de diversas divisões deste Programa. Esta tese é fruto deste ambiente amigo e cooperador no qual fui recebido. Somos especialmente gratos a todo o corpo Docente e Discente desta Unidade.

Não podemos deixar de exprimir nossos agradecimentos aos colegas Zenaide, Mirtes, Angelina, Nelson, Bruna, Lislei, Daltom, Rodrigo, Dener, Lisandro, Milena, Leandro, Alexandre do Laboratório de Genética.

Ao Paulo, Kleber, Ana Marisa, Durvanei, Ivo do Laboratório de Bioquímica.

Ao Gustavo, Angélica, Felipe, Jansen, Fábio, Miguel, Raquel, Daniele, Edison, Claudionor, Jéssica, Parada, Bete Vicente, Ana Clara Laboratório de Microbiologia ICB.

Ao Prof. Dr. Willy Beçak e Dra. Maria Luiza Beçak por nos receber e orientar no Laboratório de Genética.

Ao Dr. Álvaro por ter fornecido as imagens da estrutura da crotamina.

A Dra. Harumi, Dra. Irene e Dra Ana Moura por permitirem o uso de equipamentos do Laboratório de Imunopatologia.

A Dra Toshie Kawano (*in merorian*) por permitir o uso do microscópio Confocal e ao Alexandre pela aquisição e diagramação das imagens que ilustram este trabalho.

Ao Laboratório associado CAT- CEPID.

À Wilma, da Biblioteca IBu, que gentilmente nos forneceu referências bibliográficas.

Aos funcionários da Biblioteca do ICB pela correção das referências Bibliográficas.

## RESUMO

Pereira A. Toxicidade seletiva da crotamina do veneno de *Crotalus durissis terrificus* sobre as células indutoras de tumores. [Tese (Doutorado São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011)].

Crotamina é um peptídeo de baixo peso molecular composto de 42 resíduos de aminoácidos. A presença de nove resíduos de lisina e três pontes dissulfeto confere a crotamina compatibilidade elevada, estabilidade, carga positiva líquida, apresentando similaridade de estrutural com defensina, um peptídeo antimicrobiano do epitélio humano. Crotamina até 10,0  $\mu\text{M}$  é inócua para células normais (e.g., fibroblastos humanos e células-tronco embrionárias de murinos), mas letal para células tumorigênicas CHO-K1. Neste estudo, demonstramos que 1  $\mu\text{g}$  crotamina (0,2 $\mu\text{M}$ ) foi citotóxica para células B16-F10, Mia Paca-2 e SK-Mel-28 células *in vitro*, como se provou pelos ensaios de MTT, coloração com Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio. Adicionalmente, avaliamos o efeito citotóxico da crotamina sobre a invasão do melanoma cutâneo primário produzido pela implantação de células B16-F10 em camundongos C57BL/6J. O efeito da crotamina em melanoma cutâneo foi estudado em dois grupos de camundongos (tratados com crotamina e não tratados), sendo cada grupo composto por 35 camundongos. Cada animal do grupo, tratado com crotamina, recebeu diariamente 1,0  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  de crotamina (2  $\mu\text{M}$ ), enquanto aqueles não tratados receberam apenas placebo. O tratamento com crotamina durou 21 dias. O atraso da implantação do tumor e redução da mortalidade foi observado para o grupo tratado com crotamina quando comparados ao grupo controle não tratados. O peso médio do tumor no grupo não tratado foi 4,60 g, enquanto nos tratados com crotamina foi de apenas 0,27 g, quando detectados. O cálculo de sobrevida estimado de Kaplan Meier indicou que o grupo tratado com crotamina apresentou diferenças significativas, número de sobreviventes ( $n = 28/35$ ), em comparação ao grupo não tratado ( $n = 7/35$ ). Os dados de nossa pesquisa demonstram que a crotamina possui *in vitro* e *in vivo* uma atividade citotóxica específica e seletiva contra tipos de tumores de crescimento rápido e agressivo.

Palavras-chave: *Crotalus*. Crotamina. Peptídeo. Citotoxicidade. Melanoma Murino. Células B16-F10. Peptídeo Célula Penetrante (CPP).

## ABSTRACT

Pereira A. Cancer Cells selective toxicity of crotamine, *Crotalus durissis terrificus*. [Tese (Doutorado São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011)].

Crotamine is a low molecular weight peptide composed of 42 amino acid residues. The presence of nine lysine residues and three disulfide bonds confers to crotamine high compactness, stability, net positive charge, and overall structural similarity to  $\beta$ -defensin 2, an antimicrobial peptide from the human epithelia. Crotamine, up to 10.0  $\mu$ M, is innocuous to normal cells (e.g., human fibroblasts and murine embryonic stem cells), but lethal for tumorigenic CHO-K1 cells. Herein, we demonstrated that 1  $\mu$ g of crotamine (0,2  $\mu$ M) was cytotoxic for B16-F10, Mic PaCa-2 and SK-Mel-28 cells *in vitro*, as proved by MTT assay, Hoechst 33342 and Propidium iodide staining. Additionally, we evaluate the cytotoxic effect of crotamine on primary invasion of cutaneous melanoma produced by injection of B16-F10 cells into C57Bl/6J mice. The effect of crotamine on cutaneous melanoma was studied on two groups of mice (crotamine-treated and non-treated), each composed by 35 mice. Each animal in crotamine-treated group received daily 1  $\mu$ g/100  $\mu$ L of crotamine (2  $\mu$ M), while those non-treated received placebo. Crotamine treatment lasted for 21 days. The delay of tumor implantation and reduction of death was observed for crotamine-treated group when compared to control non-treated group. Average weight of tumor in non-treated group was 4.60 g, while in crotamine-treated, was only about 0.27g, if detectable. The Kaplan Meier estimator indicated that crotamine-treated group present significant survival number (n=28/35) in comparison with non-treated group (n=7/35). Data from our research demonstrate that crotamine possesses *in vitro* and *in vivo* specific and selective cytotoxic activity against aggressive and fast growing types of tumor.

Key-words: *Crotalus*. Crotamine. Peptide. Cytotoxic. Melanoma Murino. Cell B16-F10. Cell Penetrating Peptide (CPP).

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**EDTA – etileno-diamino-tetracético**

**HE – hematoxicilina eosina**

**BSA – soro albumina bovina**

**DAPI - do inglês “4’6-Diamidino-2-phenylindol”**

**DMEM –Dulbecco’s meio modificado Eagle’s**

**PBS – tampão fosfato salina**

**RT-PCR – transcriptase-reversa - reação em cadeia da polimerase**

**SFB – Soro Fetal Bovino**

**NMR – nuclear magnetic resonance**

**TBS – tampão tris salina**

**HBD-2 –  $\beta$ - defensina-2 humana**

**CPP – Peptídeo célula penetrante**

**DNA – Ácido desoxinucleico - RNA ácido ribonucleico**

**Antp – Homeodomínio de antenas de Drosophila**

**TAT – Fator de ativação de transcrição do vírus HIV**

**VP22 – Proteína do vírus Herpes simples tipo I**

**R<sub>(8)</sub> – Octa-arginina**

**$\mu$ S/G2 e G2/M do ciclo celular. fase G1 fase M S**

**PGHS – Proteoglicanos de heparan sulfato**

**HS – Heparan sulfato**

**GAG – glicosaminoglicanos**

**CHO – Células de ovário de hamster chinês CHO-K1 e CHO-745**

**EGFP– do inglês “Enhanced Green Fluorescent Protein”**

**CAPs – do inglês “Cationic antimicrobial peptides”**

**CAPs – peptídeos catiônicos antimicrobianos**

**PAMs – Peptídeos antimicrobianos**

**NaCl – Cloreto de sódio**

**Tris-HCl – Trisma e ácido clorídrico**

**ATCC – do inglês “*Cell Biology Collection*”**

**MTT – do inglês “3-(4,5-dimethylazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide”**

**CO<sub>2</sub> – Dioxido de carbono**

**FITC – isotiocianato de fluoresceína**

**Cy3-reativa “Fluorolink™”**

**kDa– Peso molecular em quilo Daltons**

**FACS – Ensaio de Citometria de fluxo**

**H – Hoechst 33342**

**(PI) – iodeto de propídio**

**EDTA – ácido etilenodiamino tetracético**

**ELISA– do inglês “*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*”**

**% – porcentagem**

**g – grama**

**mg – miligrama**

**M – molar, μM – micro molar**

**mL – mililitro**

**°C – graus Celsius**

**x – vezes**

**μ – micron**

**μL – microlitro**

**μg – micrograma**

**50x – aumento de 50 vezes**

**100x – aumento de 100 vezes**

**400x – aumento de 400 vezes**

## LISTA DAS FIGURAS

Figura 1. <i>Cratalus durissus terrificus</i> .....	19
Figura 2. Modelo tridimensional da crotamina.....	22
Figura 3. Seqüência de aminoácidos que compõem a molécula de crotamina comparada com outras proteínas pertencentes à famílias das miotoxinas.....	24
Figura 4. Potencial eletrostático da superfície da crotamina.....	26
Figura 5. Mapa de distribuição, das diferenças dos venenos de <i>Cratalus</i> .....	27
Figura 6. Camundongo paralisado por crotamina.....	29
Figura 7. Podemos observar a progressão da crotamina conjugada com Cy-3, no ciclo celular, usando-se sinais fluorescentes, analisadas em microscopia confocal.....	33
Figura 8. Mecanismo de penetração da crotamina em células por endocitose ou macropinocitose.....	35
Figura 9. Fluxograma.....	41
Figura 10. Ensaio de viabilidade celular - Ensaio MTT.....	53
Figura 11. Ensaio de viabilidade celular, utilizando-se o método Hoechst e Iodeto de propídeo.....	54
Figura 12. Efeito seletivo citotóxico da crotamina em células cancerosas, dose-dependente.....	55
Figura 13. Internalização <i>in vitro</i> de crotamina em células B16-F10.....	57
Figura 14. Crotamina marcada com FITC e antitubulina beta.....	58
Figura 15. Análise da fragmentação do DNA por PCR.....	59
Figura 16. Ensaio de Citometria de fluxo.....	61
Figura 17. Crotamina conjugada Cy3 (2,5 µg/animal) foi confirmada em células de melanoma murino, 24 horas após a injeção. Prova <i>in vivo</i> .....	63
Figura 18. Ganho de peso em camundongos.....	66
Figure 19. Análise de mononucleares e polimorfosnucleares durante o tratamento dos camundongos implantados com células B16-F10.....	67
Figura 20. Soros antiveneno bruto <i>C. d. terrificus</i> e anticrotamina analisados por ELISA.....	69

<b>Figura 21. Estudos histopatológicos dos tecidos dos camundongos dos grupos controle e tratados com 1 µg diária de crotamina.....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 22. Efeito da Crotamina em camundongos implantados com células B16-F10, peso efeito.....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 23. Teste de probabilidade de sobrevida de Kaplan-Meier.....</b>	<b>74</b>
<b>Figura 24. Ganho de peso dos animais durante o tratamento com crotamina.....</b>	<b>75</b>

## **LISTA DAS TABELAS**

**Tabela 1 – Peptídeos células penetrantes usados para entrega de materiais.....30**

**Tabela 2. Efeito de 1 µg/mL de crotamina sobre a progressão do tumor.....73**

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1 Características do gênero <i>Crotalus</i> .....	18
1.2 Veneno e suas frações.....	19
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
2.2 Variação geográfica do veneno de cascavéis <i>Crotalus durissus</i> .....	26
2.3 O efeito farmacológico da crotamina.....	28
2.4 A crotamina é um peptídeo célula penetrante (CPP).....	29
2.5 Mecanismo de penetração celular da crotamina.....	34
2.6 Distribuição da crotamina e seus derivados nos compartimentos celulares.....	36
2.7 Crotamina como agente de transfecção.....	37
2.8 Crotamina é um peptídeo-cisteína estabilizado com atividade antimicrobiana.....	37
<b>OBJETIVO GERAL DO PROJETO.....</b>	<b>39</b>
<b>FLUXOGRAMA.....</b>	<b>41</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
3.1 Purificação da crotamina.....	42
3.2 Cultura de células.....	42
3.3 Ensaio de viabilidade celular - Ensaio de MTT.....	43
3.4 Ensaio de viabilidade celular – Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo.....	43
3.5 Análise de fragmentação de ácidos nucléicos.....	44
3.6 Extração de ácidos nucléicos.....	44
3.7 Análise de DNA genômico.....	44
3.8 Síntese de cDNA por RT-PCR a partir do RNA total.....	44
3.9 Microscopia Confocal.....	45

3.10	Marcação covalente de crotamina com o corante fluorescente.....	45
3.11	Translocação da crotamina marcada com Cy3.....	46
3.12	Translocação da crotamina revelada por imunocitoquímica.....	46
3.13	Ensaio de Citometria de fluxo FACS.....	47
3.14	Animais Utilizados para Crescimento <i>in vivo</i> das Células B 16 F10 indutoras de melanomas murinos.....	47
3.15	Localização intratumoral da crotamina marcada Cy3, ensaio <i>in vivo</i> .....	47
3.16	Efeito da Crotamina em controlar o crescimento de células cancerígenas <i>in vivo</i> .....	48
3.17	Teste de probabilidade de sobrevivência de Kaplan Meier.....	48
3.18	Respostas hematológicas e imunológicas dos camundongos implantados com B16- F10, tratados ou não com crotamina.....	49
3.19	A análise histológica dos tecidos de camundongos C57/Bl/6.....	49
3.20	Análise Histológica em Cortes congelados.....	49
3.21	Prova de ganho de peso em camundongos.....	49
3.22	Produção de anticorpos em camundongos anti-Crotamina.....	50
3.23	Ensaio Enzimático Imuno Absorção (ELISA).....	50
3.24	Estatística.....	51
4.	RESULTADOS .....	52
4.1	Efeito citotóxico da crotamina <i>In vitro</i> .....	52
4.2	Translocação <i>in vitro</i> B16-F10 e localização intracelular da crotamina.....	56
4.3	Fragmentação do DNA.....	58
4.4	Ensaio de Citometria de fluxo.....	60
4.5	Localização <i>in vivo</i> de crotamina em melanomas murinos.....	61
4.6	Prova de ganho de peso (Toxicidade Específica).....	64
4.7	Análise de sangue periférico dos camundongos tratados ou não com crotamina.....	67
4.8	Avaliação de anticorpos contra a crotamina e veneno bruto <i>Crotálico</i> .....	68

<b>4.9 Exame histopatológico.....</b>	<b>69</b>
<b>4.10 Efeito da crotamina <i>in vivo</i> em células B16-F10.....</b>	<b>71</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Os venenos de animais normalmente englobam numerosas famílias de polipeptídeos biologicamente ativos, que divergem consideravelmente entre si, no que diz respeito a sequências primárias, arquitetura estrutural, especificidade, toxicidade e alvo celular. (Birrell et al., 2007; Estrada et al., 2007; Becker et al., 2008; Fry, 2005; Mackessy, 2009). As toxinas, por possuírem grande diversidade molecular, representam uma fonte atraente de moléculas naturais de grande interesse para o desenvolvimento de novos biofármacos. Para melhor compreensão da ação farmacológica das toxinas, tem sido feitas investigações sobre a composição de um determinado veneno e o mecanismo de ação de um componente tóxico individual, seja em seu receptor alvo, grupo de células, tecidos ou organismo inteiro. (Fry, 2005; Ulrich H, et al., 2008). Além disso, o constante desenvolvimento nas metodologias utilizadas em biologia celular e molecular, em termos de refinamento, qualidade e precisão, tem oferecido oportunidades que possibilitam descobrir novas e inesperadas atividades biológicas das toxinas e biomoléculas derivadas das mesmas.

O presente projeto, neste contexto, centra-se na crotamina, uma miotoxina presente no veneno da cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus*, isolada e purificada há mais de 50 anos (Gonçalves e Vieira 1951; Gonçalves e Arantes, 1956). Desde então, surgiram vários trabalhos sobre esse tema, que muito contribuíram para a compreensão da crotamina frente suas propriedades estruturais, genéticas, moleculares e de seus efeitos farmacológicos e terapêuticos. Neste estudo, iniciado em 2004, obtivemos dados originais sobre as propriedades biológicas da crotamina e suas funcionalidades (Kerkis et al., 2004; Oguiura et al., 2005; Nascimento et al., 2007; Rádis-Baptista et al., 2008; Hayashi et al., 2008).

## 1.1 Características do gênero *Crotalus*

As serpentes do gênero *Crotalus* atingem aproximadamente um metro e vinte a um metro e cinquenta centímetros, sendo identificadas com facilidade pela presença de um guizo terminal na cauda. Preferem as regiões secas e pedregosas, como campos e cerrados, não sendo encontradas em florestas tropicais úmidas. No Brasil são encontradas seis subespécies que, mesmo distribuídas geograficamente em diferentes regiões e possuindo pequenas diferenças morfológicas, e, os acidentes apresentam a

mesma sintomatologia e quadro clínico grave. Sendo descritas como: *Crotalus durissus terrificus*, encontrada na região do Rio Grande do Sul até Minas Gerais; *Crotalus durissus collineatus*, natural da zona centro oeste compreendendo Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Norte do Estado de São Paulo e Minas Gerais; *Crotalus durissus cascavella* típica da Caatinga do Nordeste, sendo ainda encontrada no Maranhão e Minas Gerais; *Crotalus durissus ruruima*, aparece no norte do país, nos campos abertos do cerrado do Pará e Amazonas; *Crotalus durissus marajoensi* natural da ilha de Marajó e *Crotalus durissus trigonicus* habitando em Roraima (Auto; 2008).

**Figura 1.** *Crotalus durissus terrificus* FONTE: (Fotografia Giuseppe Puerto).



## 1.2 Venenos e suas frações

O veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* é um concentrado complexo incluindo proteínas biologicamente ativas, que em conjunto causam a morte ou lesões graves na presa ou indivíduo por ela picado (Dal Pai e Neto, 1994). Sua peçonha extremamente ativa é neurotóxica, determinando sempre um quadro grave. Apesar de totalizarem apenas 8% dos acidentes, são responsáveis por 70% dos óbitos nos casos não tratados e 11,8% nos casos devidamente assistidos no Hospital Vital Brasil.

Dados estatísticos recentes mostram que, entre 2000 e 2007, foram notificados 192.703 acidentes causados por serpentes dos quatro gêneros de importância em Saúde Pública: *Bothrops* (87%), *Crotalus* (9%), *Lachesis* (3%) e *Micrurus* (1%). Sendo 32.244 casos em 2000, e aumentando a cada ano, chegando a 100.316 em 2007.

No entanto, essas proporções variam de maneira importante de acordo com a região, onde os acidentes laquéticos passam a representar quase 10% das notificações no Norte do Brasil, os envenenamentos crotálicos são responsáveis por 13% dos casos no Sudeste e 12% no Nordeste e Centro-Oeste, enquanto no Sul quase 95% dos acidentes ofídicos foram notificados como botrópicos.

Foram notificados 799 óbitos, indicando uma letalidade de 0,4%. Quando analisado por tipo de acidente, os óbitos mostraram-se mais frequentes nos acidentes crotálicos (1,1%), seguido do laquético (0,9%) e botrópico (0,4%), não havendo notificações de morte devido ao envenenamento elapídico (Cardoso et al., 2009).

O veneno crotálico exerce três atividades com importância clínica conhecida: neurotóxica, com ações central e periférica, causando paralisia flácida das musculaturas esquelética e facial, paralisia do globo ocular e às vezes, paralisia dos músculos respiratórios podendo ocasionar insuficiência respiratória (Vital Brazil, 1972; Amaral et al, 1991; Jorge e Ribeiro, 1990); coagulante, relacionada ao conjunto de fibrinogênio e incoagulabilidade sanguínea (Amaral et al., 1988); miotóxica sistêmica, causando lesões de fibras musculares esqueléticas, evidenciadas por dores musculares ou rbdomiolise generalizadas, podendo ocasionar, como complicação secundária, insuficiência renal aguda (Amaral et al., 1986; Azevedo Marques, et al., 1985), além da hemolítica *in vitro* (Rosenfeld et al., 1960-62; Kelen et al., 1960-62). O quadro clínico causado pelo veneno crotálico, habitualmente tem manifestações locais discretas, como dor e eritema. Nishioka et al., (2000) relataram o aparecimento de abscesso no local da picada, porém esta complicação é rara. Os efeitos de maior importância clínica e gravidade são os sistêmicos incluindo os neurotóxicos, miotóxicos, nefrotóxicos, hepatotóxicos, além de alterações na coagulação sanguínea (Pinho e Pereira, 2001; Floriano, 2008), e também pela elevação sérica da creatinofosfoquinase (CPK), da desidrogenase láctica (DLH) e da transaminase glutâmico-oxalacética (GOT).

Quando o veneno de *Crotalus* é fracionado, em cromatografia de exclusão molecular, se encontram quatro frações principais: a crotoxina, crotamina, giroxina e convulxina (referências abaixo). Cerca de 50% da fração do veneno é um complexo constituído por uma fração básica e uma ácida na proporção 1:1 denominadas crotoxinas A e B, sendo que a fração crotoxina A não tem atividade fosfolipásica A2, e a fração crotoxina B com

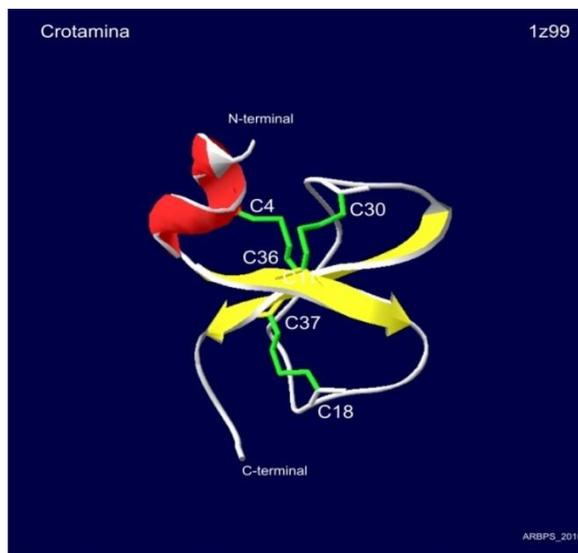
atividade fosfolipásica A2 (PLA<sub>2</sub>) Vital Brazil, 1972; Okamoto et al., 1983; Puig et al, 1995; Roodet et al., 1996).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Crotamina

Na natureza as serpentes *Crotalus durissus terrificus* podem ou não apresentar na peçonha a fração crotamina, sendo assim os venenos dos animais são classificados como crotamina positiva e crotamina negativa. Um fator determinante deste fenômeno é a distribuição geográfica das serpentes. O primeiro relatório sobre a crotamina, originalmente isolada do veneno de serpente cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus*, é da década de 50. (Gonçalves e Vieira 1950; Gonçalves e Arantes, 1956; Habermann, 1957). A estrutura primária da crotamina purificada foi determinada em 1975 por Laure. (Laure, 1975). Crotamina é um polipeptídeo composto por 42 aminoácidos, rica em aminoácidos básicos, sendo nove lisinas e duas argininas, com uma carga líquida positiva com  $PI > 9,5$ . Seu peso molecular é de 4.889,81 Daltons. Estruturalmente, a crotamina é estabilizada por seis cisteínas envolvidas em três pontes dissulfetos nas posições, Cys4-Cys36, Cys11-Cys30 e Cys18-Cys37. (Laure, 1975; Nicastro et al., 2003; Fadel et al., 2005).

**Figura 2. Modelo tridimensional da crotamina.**

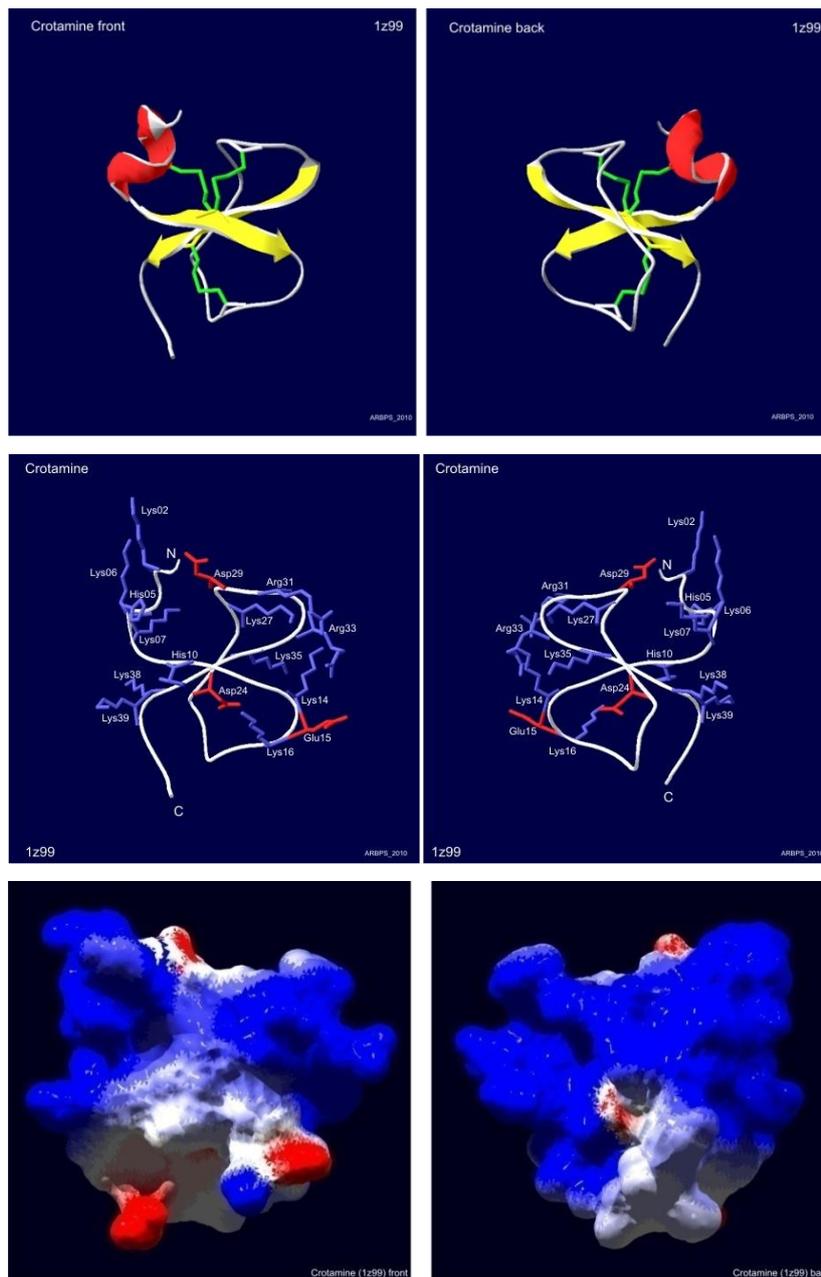


Na figura é mostrada em branco a estrutura secundária do esqueleto dos carbonos alfa da cadeia polipeptídica da crotamina baseada no modelo de ressonância nuclear magnética da estrutura da crotamina (PDB # 1z99). Em vermelho é representada a alfa-hélice e em amarelo as folhas beta-pregueadas. Em verde são mostradas as pontes dissulfeto entre as cisteínas indicadas de acordo com a posição ocupada na cadeia: C4-C36; C30-C11 e C37-C18. O amino e o carboxi terminal estão indicados na figura. FONTE: Pereira (2011)

A estrutura secundária compreende uma pequena  $\alpha$ -helix N-terminal (resíduos 1-7) e duas fitas -  $\beta$  antiparalelas conferindo uma topologia do tipo  $\alpha\beta_1\beta_2$ . (Nicastro et al., 2003; Fadel et al., 2005). A estrutura tridimensional da crotamina é similar a apresentada por peptídeos pertencentes à família das  $\beta$ -defensinas, uma classe de peptídeos catiônicos ricos em lisina e arginina, apesar da baixa similaridade de sequência primária. (Nicastro et al., 2005). A crotamina apresenta uma grande área positiva na superfície da molécula devido à carga positiva dos seus aminoácidos básicos. A carga negativa se delimita a pequenas regiões, figura 4 abaixo. Portanto, crotamina é uma molécula muito compacta, com uma superfície líquida positiva e uma alta capacidade de interação com carga negativa de diversas membranas de células. Nos anos subsequentes, isoformas de crotamina e peptídeos crotamina *like* foram isoladas e caracterizadas a partir do veneno de diversas espécies de *Crotalus*. (Cameron e Tu, 1978; Bieber et al., 1987; Samejima et al., 1991; Nedelkov e Bieber et al., 1997; Toyama et al., 2003; Ponce-Soto et al., 2010).



**Figura 4. Potencial eletrostático da superfície da crotamina.**

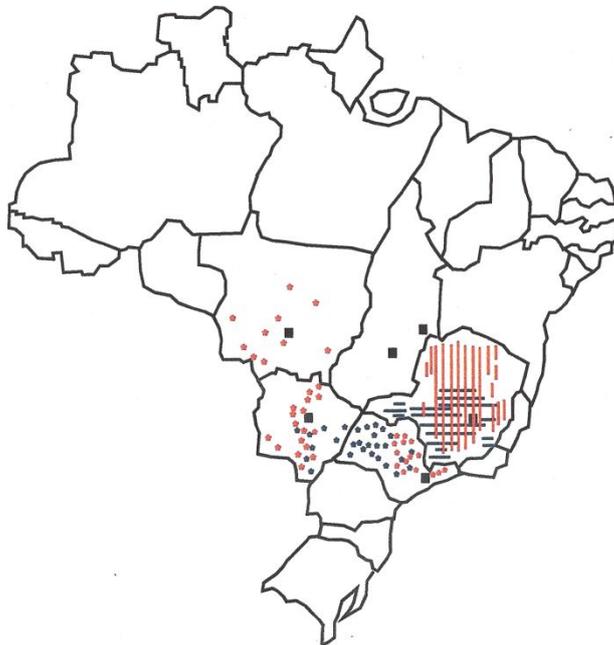


Representação do potencial eletrostático associado a superfície acessível ao solvente da crotamina com base no NMR modelo 'pdb 1z99'. A figura mostra em azul o potencial eletrostático positivo. Em vermelho o potencial negativo. Em branco a superfície neutra, quando girada a 180°. FONTE: Siqueira (2002)

## 2.2 Variação geográfica do veneno de cascaveis *Crotalus durissus*

Gonçalves (1956) já havia observado, através de análises eletroforéticas, a variação da presença de crotamina nas amostras individuais de venenos de *Crotalus durissus terrificus*. As serpentes que produziram a crotamina apresentaram uma grande variação na quantidade da mesma. Schenberg (1959a; 1959b) mostrou que havia um padrão geográfico em São Paulo quanto às populações de cascaveis crotamina positiva (produzem crotamina) e crotamina negativa (não produzem crotamina) observando a paralisia dos membros posteriores de camundongos com venenos injetados intraperitonealmente. Posteriormente, essas observações foram confirmadas no que se refere aos estados de Minas Gerais (Bicalho et al., 1989), Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Silveira et al., 1990), mas não ao estado de Goiás (Batista, 1996), **Figura 5**. Variação geográfica semelhante foi observada em outras espécies de cascaveis como *Crotalus viridis viridis*, *C. adamanteus*, *C. horridus*, *C. scutulatus scutulatus* (Straight et al., 1991).

**Figura 5. Mapa de distribuição, das diferenças dos venenos de *Crotalus***



Mapa de distribuição, das diferenças dos venenos de *Crotalus*, crotoamina positivo (■) e veneno crotoamina negativo (■), nas regiões Sudoeste e Sudeste do Brasil.

FONTE: Oguiura (1998)

### 2.3 O efeito farmacológico da crotamina

A crotamina, neurotoxina e miotoxina isolada da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, foi a primeira proteína estudada no Brasil sob o aspecto bioquímico e farmacológico. O quadro clínico mais evidente e característico, por ela induzido, é a intensa paralisação dos membros posteriores, quando injetada por via i.v. (5µg/25g) ou i.p. (20 µg/25 g), induzindo também paralisia flácida dos membros posteriores em aproximadamente 10 minutos quando injetada por via i.p. (20µg/25g), ou menos de 1 minuto quando injetada por via i.v. (5µg/25g). Vários fármacos, inclusive aqueles descritos como antagonistas da crotamina em diafragma isolado de rato, não foram eficientes em reverter seu efeito *in vivo* (Vieira et al., 2006).

Os primeiros relatos sobre as atividades farmacológicas da crotamina foram realizadas no músculo de diafragma em ratos. Este estudo sugeriu que a crotamina age influenciada por potássio extracelular sobre canais de sódio, controlando a permeabilidade de sódio pelo sarcolema. A crotamina induz contratura do músculo esquelético de gatos, ratos e camundongos, mas não de aves Moussatche et al., 1956; Gonçalves 1956; Cheymol, Bourrillet e Roch-Arveiller, 1966; Pellegrini Filho, Vital Brazil e Laure, 1976. No diafragma isolado de rato, desencadeia uma contratura imediata, seguida de contrações espontâneas irregulares. Esse efeito é inibido por tetrodotoxina,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e  $K^+$  (Cheymol et al, 1971; Brazil, 1971). Esses e outros dados experimentais indicam que a célula muscular são as primeiras a responder a ação da crotamina no músculo do organismo. O potencial de repouso da membrana é sensivelmente reduzido pela crotamina e essa despolarização é antagonizada por tetrodotoxina ou por concentração reduzida de  $Na^+$ , sugerindo que a crotamina pode atuar no canal de sódio e agir na membrana de células musculares de mamíferos, alterando a permeabilidade dos íons  $Na^+$  ou  $Ca^+$  aumentando o influxo desses íons (Cheymol et al., 1971). O influxo de  $Na^+$  causa despolarização da membrana e forte contração muscular, induzindo lesão e necrose caracterizadas pela extensa vacuolização do retículo sarcoplasmático e ruptura dos filamentos de actina e miosina.

O grande fluxo de  $Na^+$  foi responsável pela despolarização e contração do músculo esquelético, bem como pela vacuolização do retículo sarcoplasmático, efeito que é típico nas miotoxinas, peptídeos básicos do veneno de serpente, (Chang et al., 1978; Gutiérrez e Cerdas, 1984; Ownby et al., 1988). Em oposição a essa visão, Rizzi e colaboradores, (Rizzi et al., 2007) demonstram através de estudos “Patch clamp” que a

crotamina não atua em canal de sódio dependente de voltagem (Na(v)), porém exerce sua ação farmacológica preferencialmente provocando espasmos rápidos do tipo muscular, sugerindo que os canais de sódio não são o principal alvo da crotamina ou que os mesmos não estão envolvidos na sua ação. Esta contradição sobre o mecanismo molecular de ação farmacológica da crotamina continua sendo uma questão em aberto. No entanto, Yount e colaboradores publicaram recentemente um trabalho em que realizaram estudos de modelagem, comparando interação da crotamina e  $\beta$ - defensina-2 humana (hBD-2, *human  $\beta$ -defensin 2*), com canais de potássio dependentes de voltagem (Kv) em procariontes e eucariotes. Eles concluíram que a crotamina obstrui os canais Kv em células eucarióticas, mas não procarióticas (Yount et al., 2009). hBD-2 foi escolhida por ser um peptídeo antimicrobiano que se encontra nas células epiteliais e que compartilha com a crotamina emparelhamento de cisteína e topologia estrutural semelhante. Como a crotamina e hBD-2 tem um motivo principal estrutural denominado  $\gamma$ -core ancestral encontrado em vários peptídeos que possuem atividade de defesa primária do hospedeiro. (Yeaman et al., 2007).

**Figura 6. Camundongo paralisado por crotamina.**



Efeito paralisante induzido por 5  $\mu$ g de crotamina por via intraperitoneal em camundongos de 18 g, efeito observado 15 minutos após a inoculação da peçonha.  
FONTE: Vieira (2006)

#### **2.4 A crotamina é um peptídeo célula penetrante (CPP)**

Peptídeos que mostram a capacidade de se translocar em membranas celulares e entrar nas células são chamados peptídeos célula penetrantes (*Cell penetrating peptides* - CPPs). Eles também são muitas vezes referidos como domínios de transdução de proteínas (DPT), peptídeos Tróia ou sequências de translocação de membrana (STM). (Järver e Langel, 2006). Os CPPs variam em relação ao tamanho da sequência de aminoácidos e da carga de superfície, que geralmente incluem sequências curtas e catiônicas ou anfipáticas, ricas em resíduos de aminoácidos básicos, tais como a arginina e lisina. Na maioria dos casos CPPs contêm um domínio de translocação de

membrana, e/ou uma sequência de compartimentalização celular ou ambos. (Futaki, 2006; Joliot e Prochiantz, 2004; Kerkis et al., 2006). Estas características estruturais permitem aos CPPs translocarem-se rapidamente através da membrana celular localizando-se em organelas específicas e/ou núcleo, (Järver e Langel, 2006; Pouton et al., 2007; Foged e Nielsen, 2008). Devido a estas propriedades, que incluem a entrega intracelular de compostos bioativos, tem sido descritas várias utilidades quanto ao seu uso, tais como: fármacos, biomoléculas ativas, ácidos nucleicos DNA e RNA de interferência, peptídeos e proteínas, nanopartículas e os fluoróforos, utilizados para captação de imagens, os quais demonstram a localização dos CPPs no interior das células quando analisados através de Microscopia Confocal, (Kabouridis, 2003; Mäe e Langel, 2006; Mäe e Langel, 2006; Mäe e Langel, 2008; Futaki, 2008; Stewart et al., 2008). Consequentemente, as tecnologias que utilizam CPPs estão sendo testadas como transportadoras de vacinas terapêuticas antivirais e antitumorais, bem como de outras drogas, para dentro das células, sendo também utilizadas em estudos dos mecanismos epigenéticos de diferentes doenças, (Stewart KM et al., 2008; Patel et al., 2007; Irvine et al., 2000; Harada et al., 2006; Brooks et al., 2010; Ford et al., 2000). Exemplos de alguns CPPs mais estudados estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1 – Peptídeos célula penetrantes usados para entregas de materiais**

Nome	Sequência
<b>Antp</b>	RQIKIWFQNRRMKWKK
<b>Tat</b>	YGRKKRRQRRR
<b>VP22</b>	DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVE
<b>R<sub>(8)</sub></b>	RRRRRRRR
<b>Crotamina</b>	YKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWRWKCKKGGSG
<b>Fragmentos Crotamina</b>	YKQCHKKGGKKGSG; YKQCHKKGGXKKGSG

**Antp:** Homeodomínio de antenas de *Drosophila*. **TAT:** Fator de ativação de transcrição do vírus HIV; **VP22:** Proteína do vírus Herpes simples tipo I. **R<sub>(8)</sub>:** Octa-arginina. Sequências sintéticas derivadas de Crotamina: peptídeos curtos de 14 ou 15 aminoácidos compostos por ambas as extremidades N- e C-terminal da crotamina. A posição denotada por "X" em um dos fragmentos corresponde ao ácido 6-amino-hexanoico. FONTE Kerkis (2010)

Os primeiros CPPs foram isolados a partir de sequências de dois fatores de transcrição, um do ativador da transcrição de proteína de ação trans do vírus HIV-1 (Tat

– “*trans-acting transcriptional activator*) e o outro do homeodomínio *Antennapedia* (ANTP) da mosca de fruta *Drosophila* (Frank et al e Pabo, 1988; Joliot et al., 1991). Os fragmentos mais curtos dos peptídeos derivados de Tat (por exemplo, Tat 47-57 e Tat 48-60) e de ANTP (Antp 43-58, denominado "*Penetrantín*") foram posteriormente considerados suficientes em se translocarem através da membrana plasmática no interior da célula (Derossi et al., 1994; Vivès et al., 1997; Joliot e Prochiantz, 2008; Nagahara et al., 1998; Zhao e Weissleder, 2004; Elliott. e O'Hare, 1997; Phelan et al., 1998; Dilber et al., 1999; Zorko e Langel, 2005; Kosuge et al., 2008; Chuah, et al., 2003; Torchilin et al., 2001). Foi demonstrado que CPPs são capazes de mediar a translocação de compostos de tamanhos variáveis através das membranas eucarióticas. Por exemplo, a penetratina *Penetrantín* (Antp 43-58) foi capaz de transportar polipeptídeos curtos com até 100 aminoácidos para dentro das células (Joliot e Prochiantz, 2008). Já o polipeptídeo estrutural do vírus Herpes simplex tipo I (HSV-1), chamado VP22, transloca polipeptídeos maiores, tais como, enzimas  $\beta$ -galactosidase, timidina quinase e proteína p53 (Nagahara et al., 1998; Zhao e Weissleder, 2004; Elliott e O'Hare, 1997; Phelan et al., 1998; Dilber et al., 1999). CPPs conhecidos, como octa-arginina (RRRRRRRR) e PAM (KLALKLALKALKAALKLA), também tem sido eficientes na translocação através da membrana celular (Zorko e Langel, 2005; Kosuge et al., 2008). Portanto, em comparação com outras moléculas transportadoras ou sistemas de transporte celular, os CPPs possuem características mais atraentes, como a translocação intracelular eficaz *in vivo*, localização nuclear e flexibilidade de aplicação nos vários tipos de células, cujas vantagens em relação aos outros CPPs são verificadas na entrega de moléculas, sem restrição ao tamanho da molécula que deve ser translocada, ausência de antigenicidade, imunogenicidade, desencadeamento da resposta inflamatória e toxicidade para a célula. A partícula viral é portadora de um sistema de entrega de gene comparável em transduzibilidade e eficiência ao CPP, bem como na sua distribuição *in vivo* e compartimentalização celular. Contudo, os sistemas virais apresentam desvantagens pela seletividade na célula alvo, com a probabilidade de sua transformação no genoma da célula hospedeira, tal como a integração em oncogene. Além disso, vetores virais tem capacidade de induzir indesejável resposta imunológica (Chuah, et al., 2003).

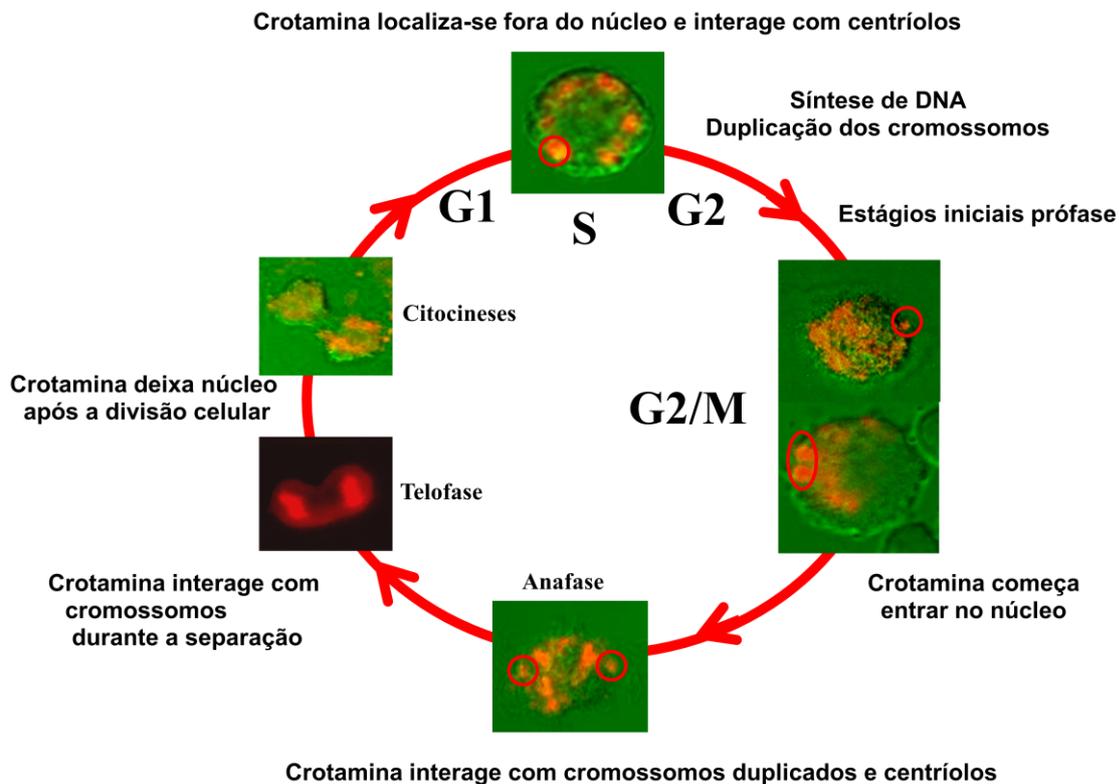
Nosso grupo mostrou que a crotamina possui propriedades intrínsecas funcionais que caracterizam um CPP, ou seja, penetração intracelular eficaz, localização nuclear e

flexibilidade de aplicação nos vários tipos de células, etc. Além disso, possui propriedades adicionais, tais como, eficiência e seletividade em penetrar nas células em proliferação ativa, interação dentro de células com estruturas celulares, compartimentos vesiculares, subnucleares, centríolos e cromossomos (Kerkis et al., 2004; Nascimento et al., 2007).

Estudos em microscopia confocal, sobre a distribuição da crotamina conjugada com um composto fluorescente, permitiram descobrir que esse peptídeo é capaz de penetrar nas células cinco minutos após sua adição ao meio de cultura com fibroblastos primários, linfoblastos humanos e células-tronco embrionárias (Kerkis et al., 2004). No mesmo trabalho demonstramos que *in vivo*, após a administração intraperitoneal em camundongos, a crotamina foi encontrada em células do líquido peritoneal e na medula óssea, demonstrando preferência pela localização perinuclear e nuclear. Na divisão celular, na fase de mitose, a crotamina interage com o DNA dos cromossomos metafásicos. Esta interação produz coloração diferencial de bandas cromossômicas, que é diferente da banda-G (banda de coloração Giemsa) ou qualquer outro cromossomo padrão convencional de bandas. Kerkis et al. 2004, demonstraram que a crotamina interage com cromossomos entre as fases S/G2 e G2/M do ciclo celular. (Kerkis et al., 2004; Kerkis et al., 2006). Mais recentemente, pudemos definir com precisão o momento da penetração da crotamina no núcleo. Conforme mostrado na Figura 7, inicialmente, durante a fase G1 do ciclo celular, a crotamina está dispersa no citoplasma. No citoplasma, a crotamina está associada aos centríolos. Na fase S, quando a duplicação dos centríolos ocorre, a crotamina tem sua localização limitada na região perinuclear. Na fase M, a crotamina conjugada com composto fluorescente, pode ser visualizada através da sua interação com centríolos que se duplicam e separam neste momento. Na fase inicial da prófase, podemos observar sinal fluorescente intenso da crotamina nos cromossomos. Nesta fase, a separação de cromossomos também pode ser seguida por crotamina fluorescente que acompanha a progressão da mitose. Durante a citocinese a localização da crotamina está restrita ao citoplasma. Este achado permitiu qualificar a crotamina como um marcador dos centríolos e, conseqüentemente, como um marcador específico do ciclo celular. (Kerkis et al., 2004; Hayashi et al., 2008; Kerkis et al., 2006). Após 16-24 horas a crotamina não foi mais detectada nas células, sendo nesse ponto provavelmente degradada e/ou exocitada pelas mesmas. Estes resultados indicam o potencial da crotamina como marcador das células tumorais, uma

vez que estas células apresentam frequentemente número anormal de centríolos e cromossomos.

**Figura 7. Podemos observar a progressão da crotamina conjugada com Cy-3, no ciclo celular, usando-se sinais fluorescentes. Analisadas em microscopia confocal.**



A crotamina fluorescente translocada por endocitose, em células embrionárias de camundongo, durante a fase G1, apresenta uma localização dispersa no citoplasma e interage com centríolos. Na fase-S a crotamina apresenta-se num local restrito perinuclear. Quando uma célula entra em mitose, a separação dos centríolos torna-se evidente (prófase) com a crotamina aparecendo no núcleo. A crotamina se localiza em torno dos cromossomos, e é mais evidente na metáfase, quando os cromossomos estão condensados. Durante a anáfase e telófase, os cromossomos e a separação dos centríolos são marcados com crotamina Cy3. Durante a citocinese a localização da crotamina é restrita no citoplasma. Os centríolos estão marcados com círculos vermelhos. FONTE: Kerkis (2010)

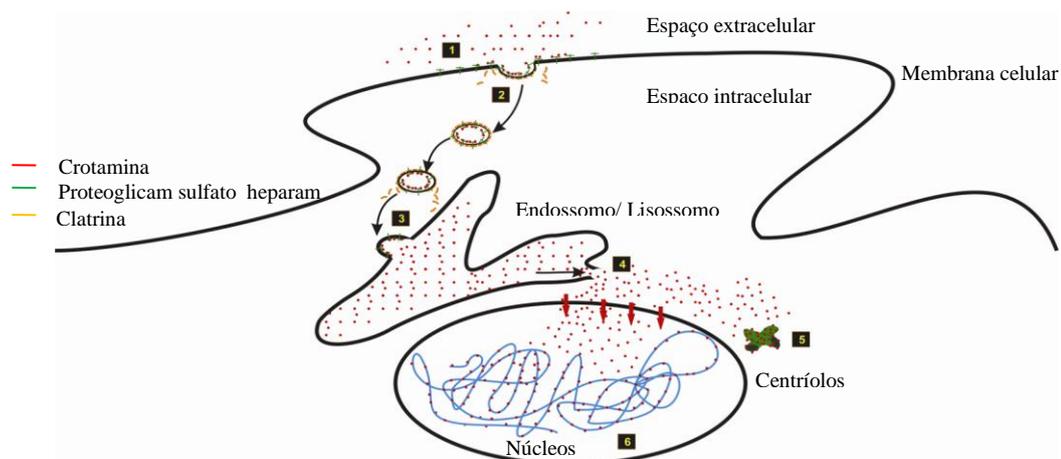
## 2.5 Mecanismo de penetração celular da crotamina

Demonstramos que o mecanismo de translocação da crotamina é semelhante aos apresentados por alguns outros CPPs (Nascimento et al., 2007). Além disso, demonstramos também que a crotamina possui características biológicas próprias quando comparada com outras CPPs, as quais são, a seletividade e especificidade por células proliferativamente ativas e a interação de centríolos, em determinadas fases do ciclo celular, com proteínas negativamente carregadas. Isso nos levou a hipótese de que a crotamina pode possuir uma ação citotóxica específica contra células tumorais, mas não contra células normais. A investigação da translocação e internalização através da membrana celular da maioria dos CPPs estudados, como o HIV-1 Tat, ANTP e VP22, indicou que o mecanismo celular de absorção desses peptídeos foi independente de energia, receptores de membrana e transportadores (Kerkis et al., 2006). Estes primeiros estudos sugeriram que a endocitose não está envolvida no processo de penetração (Derossi et al., 1994; Vivès et al., 1997; Elliott. e O'Hare, 1997; Torchilin et al., 2001; Martin et al., 2002; Suzuki et al., 2002). No entanto, outros estudos tem demonstrado o envolvimento da endocitose em fase fluida como o principal mecanismo de translocação de CPPs (Drin et al., 2003; Richard et al., 2003), como foi demonstrado para TAT-CPP e domínios de transdução de algumas outras CPPs (Gump e Dowdy, 2007). A análise da literatura mostrou que a penetração dos CPPs nas células não obedece a nenhum mecanismo comum. Consequentemente os CPPs podem entrar nas células por caminhos distintos, dependendo das propriedades biofísicas, bioquímicas e a carga da molécula de cada um dos CPPs. (Fischer et al., 2002; Räägel et al., 2010; Yesylevskyy et al., 2009).

O heparan sulfato (HS) é uma molécula da família de glucosaminoglicanas (GAG) conhecida por ser amplamente difundida sobre a superfície das células de origem animal (Kosuge., 2008; Ziegler et al., 2003; Pujals et al., 2006; Console et al., 2003; Poon et al., 2007). Em vários casos, a ligação inicial de CPP com a célula ocorre através de proteoglicanos de heparan sulfato (PGHS), seguida por endocitose ou macropinocitose. A interação iônica que ocorre entre os resíduos de arginina de CPP (positivamente carregada) e PGHS da membrana plasmática (de carga negativa) permite que seja estabelecido um contato eletrostático entre os peptídeos e a superfície de célula (Ziegler 2003). A crotamina conjugada com fluorocromo foi visualizada na superfície celular de células CHO-K1 ricas em GAG. O uso de anticorpos anti-PGHS confirmou

esse resultado. No entanto, as células mutantes que eram deficientes em GAGs (CHO-745) não demonstraram a ligação de crotamina com a membrana celular destas células deficientes. A análise desses dados, juntamente com os obtidos por outros ensaios de competição e inibição, tais como ensaios com heparinase, confirmaram convincentemente a interação da crotamina com os HSPGs na superfície da membrana celular (Nascimento FD et al., 2007; Kerkis et al., 2010) (Figura 9).

**Figura 8. Mecanismo de penetração da crotamina em células por endocitose ou macropinocitose.**



Uma vez que a crotamina entra em contato com a matriz extracelular, podem ocorrer: (1) A crotamina tendo carga positiva pode interagir na superfície da membrana com as cadeias de cargas negativas dos proteoglicans heparam sulfato (HSPG); (2) Formando um complexo de crotamina com HSPG que são endocitados em vesículas e transportados para a célula com a ajuda de clatrina; (3) Essas vesículas se fundem com os endossomos/lisossomos; (4) A crotamina se acumula dentro do lisossomo até ser liberada para o citosol (ainda não é conhecido se o conteúdo dos lisossomos é lançado pela ruptura da membrana lisossomal, ou por formação de poros, ou outros mecanismos). Deste ponto, não está claro se a crotamina permanece ligada ao heparam sulfato. Uma vez a crotamina presente no citoplasma, ela interage com os centríolos (5) e vai para o núcleo (6) interagindo com os cromossomas FONTE: Kerkis, (2010)

A utilização de inibidores farmacológicos e de baixa temperatura confirmou que a internalização da crotamina também depende de endocitose. A crotamina entra nas células através da via endocítica, portanto com o uso de cloroquina a sua penetração foi reduzida em 92,3%, (Nascimento et al., 2007; SorkineVon Zastrow et al., 2002). Mais especificamente, foi demonstrado que a crotamina, usa a via clatrina-dependente da absorção celular, uma vez que a clorpromazina (um inibidor da endocitose mediada por clatrina) inibiu a penetração de crotamina em 65%. Também foi mostrado que a inibição de “jangadas lipídicas” (*lipid rafts* - domínios ricos em colesterol, esfingolípídeos e

aglomerados de proteínas da membrana) endocitose e macropinocitose não interferiram na internalização da crotamina pelas células. A temperatura baixa (4°C) afetou a absorção da crotamina na superfície celular, uma vez que a eficiência de penetração de crotamina no interior das células foi drasticamente reduzida (Nascimento et al., 2007).

Utilização de um marcador de vesículas ácidas (Lyso Tracker RedDND 99 Invitrogen) e crotamina marcada com fluorocromo demonstrou que a mesma foi acumulada em vesículas lisossômicas colocalizando-se com transferrina, um ligante específico de endocitose mediada por clatrina. A crotamina se acumulou em endossomos, vesículas lisossômicas, e a medida que estes compartimentos foram rompidos a mesma foi liberada no citosol promovendo a distribuição de crotamina em compartimentos citoplasmáticos. Como a próxima etapa crotamina entra no interior do núcleo (Kerkis et al., 2004; Nascimento et al., 2007). (Figura 7,8). Curiosamente, esta via endossomal, pela qual a crotamina entra no citoplasma da célula, é outra característica relevante desse peptídeo natural, uma vez que esta via tem sido explorada para a efetiva entrega de medicamentos (Lundberg P et al., 2007).

## **2.6 Distribuição da crotamina e seus derivados nos compartimentos celulares**

CPPs penetram no núcleo devido as sequências de localização nuclear (SLNs), que são grupos de arranjo de sequências de aminoácidos básicos, por exemplo: KKKRK, como em Tat: YGRKKRRQRRR, ANTP: RQIKIWFQNRRMKWKK, octo-arginina e outros peptídeos similares. A crotamina apresenta duas supostas sequências sintéticas de aminoácidos SLN, compostas por aminoácidos nas posições (1-9) - (38-42) (YKQCHKKGGKKGSG) e (1-9) –Ahx- (38-42) (YKQCHKKGGXKKKGSG), que podem ser individuais ou sinergicamente responsáveis por sua atividade de penetração nuclear, isto é, os dois juntos podem constituir um domínio bipartido de penetração nuclear (Kerkis et al., 2004; Rádis-Baptista et al., 2008).

Visando a produção de pequenas moléculas com atividades biológicas da crotamina, através da identificação das sequências mínimas essenciais para sua penetração, Rádis-Baptista e colaboradores (Rádis-Baptista et al., 2008) sintetizaram peptídeos mais curtos derivados da crotamina. Ao utilizar essa estratégia “minimalista”, foram sintetizados os peptídeos de 14-15 aminoácidos (isto é, um terço do tamanho da crotamina original) ricos em lisina e glicina. (Tabela 1). Os estudos, utilizando diferentes culturas celulares, demonstraram que estes pequenos peptídeos podem imitar,

em vários aspectos, a mesma atividade intrínseca da molécula de crotamina não minimizada (Rádis-Baptista et al., 2008).

## **2.7 Crotamina como agente de transfecção.**

Demonstramos que a crotamina pode facilmente formar um complexo com DNA misturando moléculas de crotamina com, por exemplo, um plasmídeo contendo um gene repórter (pEGFP, *Enhanced Green Fluorescent Protein* -EGFP) em uma determinada concentração de solução salina. A formação de complexo ocorre através de interação eletrostática entre DNA e crotamina. Para o ensaio com a transfecção do plasmídeo pEGFP, o complexo entre o DNA e a crotamina foi colocado e incubado nos diferentes tipos de células. A microscopia confocal revelou um forte sinal de fluorescência verde nas células, sugerindo a alta eficiência de transfecção, a qual variou de acordo com o tipo celular utilizado, de 30% a 90% (Nascimento et al., 2007).

A crotamina foi ainda mais eficiente na entrega de genes para as células *in vivo*. A injeção intraperitoneal em camundongos C57BL/J6 com complexos crotamina/plasmídeo pEGFP revelou que 10 a 20% das células da medula óssea (MO), foram transfectadas *in vivo* e emitiam sinal de fluorescência verde forte em microscopia confocal. Mesmo em tecidos cerebrais foram detectados sinais de fluorescência, o que significa que os complexos de crotamina-pEGFP foram capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica (Nascimento et al., 2007; Hayashi et al., 2008). A capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica pode ser explorada de forma distinta para a entrega de drogas, mediada por crotamina, ao sistema nervoso central (SNC).

## **2.8 Crotamina é um peptídeo estabilizado com atividade antimicrobiana.**

Polipeptídeos catiônicos antimicrobianos (*cationic antimicrobial peptides*-CAPs) são compostos por cisteínas, as quais conferem estabilidade ao peptídeo formando pontes disulfeto, assim conhecidos como componentes da imunidade inata, atuando na primeira linha de defesa do hospedeiro contra microorganismos invasores. CAPs são isolados de espécies altamente divergentes, tais como, invertebrados, plantas e animais, representando grupos de moléculas antigas do sistema imunológico (Zasloff, 2002). Peptídeos antimicrobianos foram classificados em famílias distintas com base em sua sequência de aminoácidos e a estrutura secundária, (CAP helicoidal e linear).

Assim, Rhesus-defensina (RTDs) é um peptídeo linear cíclico, ou interligado por uma, duas, três, ou mais pontes dissulfeto internas, comumente encontrado na natureza. Defensinas de mamíferos constituem o grupo dos CAPs (peptídeos catiônicos antimicrobianos, também conhecidos como peptídeos antimicrobianos – PAMs), cujos membros são estruturados por três pontes dissulfeto (Rádis-Baptista et al., 2008). O grupo das  $\beta$ -defensinas é um dos mais estudados e abrange os peptídeos, que são encontrados em tecidos epiteliais e mielóides (Lehrer e Ganz 2004; Ganz, 2003; Ouellette, 2004; Yount e Yeaman, 2004).

A maioria das famílias de serpentes contem frações de toxinas com três, quatro ou cinco pontes dissulfeto, que conferem a cada polipeptídeo alta estabilidade e rigidez estrutural, propriedades que são necessárias para proteínas destinadas a serem segregadas ao veneno. A  $\beta$ -defensina é um desses peptídeos cisteína estabilizados presente em tecidos de diversos organismos, que inclui anêmonas do mar, cobras, ornitorrincos e seres humanos. Membros desta família de peptídeos cisteína estabilizados demonstraram atividades multifuncionais farmacológicas e implicações de seu uso como agentes terapêuticos. (Torres e Kuchel, 2004; Taylor et al., 2008; Mancinet al., 1998).

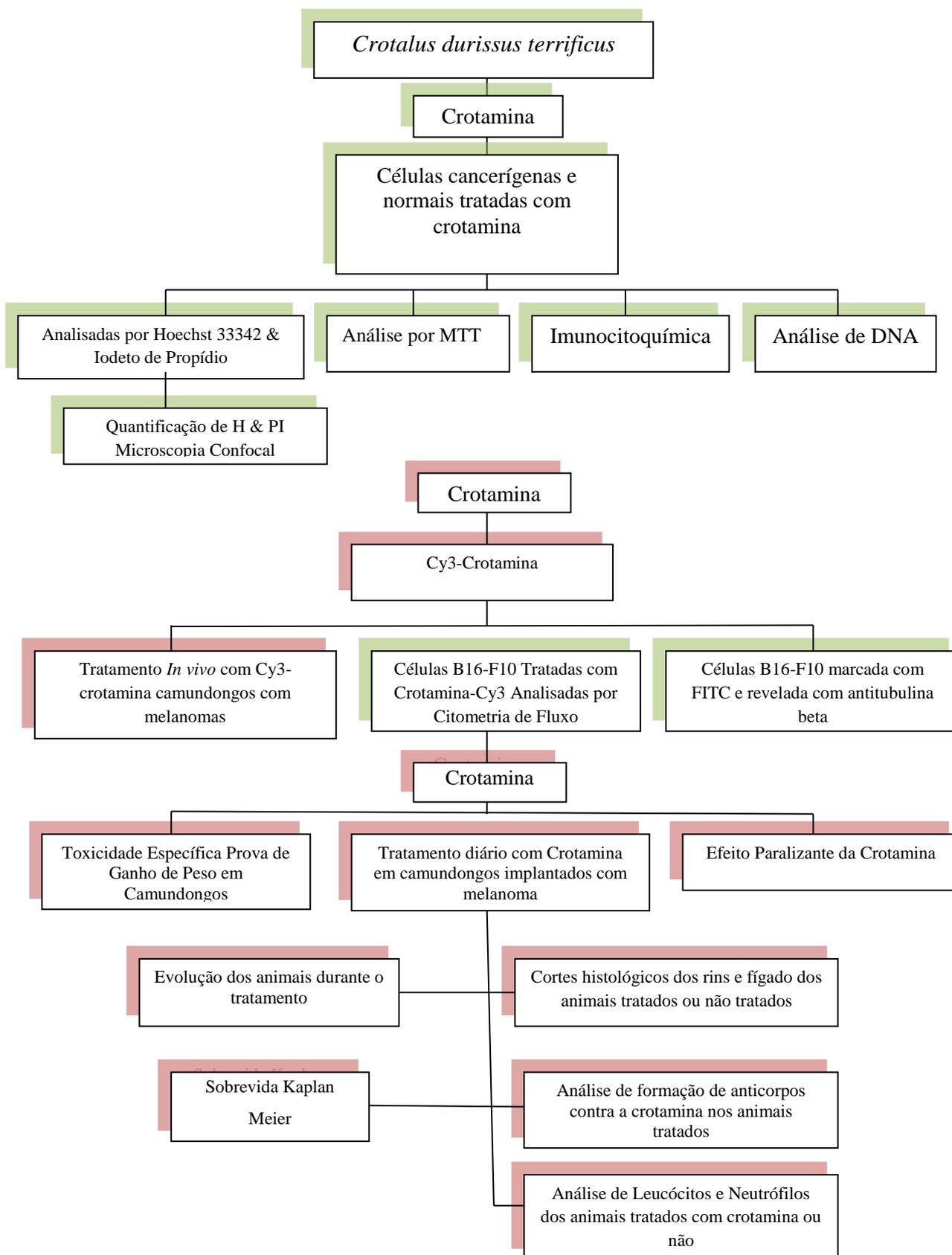
## OBJETIVO GERAL DO PROJETO

O objetivo do presente projeto visa estudar a capacidade da translocação de crotamina, que é um peptídeo catiônico de baixo peso molecular, para interior dos diferentes tipos celulares tumorais humanos, murino e de camundongos normais. Estudar a ação de crotamina *in vivo* na progressão do desenvolvimento dos tumores de melanoma murino subcutâneo em modelo de camundongo. Tais objetivos são justificados pela versatilidade biológica da crotamina demonstrada pelo nosso grupo nos últimos anos.

### *Objetivos específicos*

- Estudar *in vitro* a ação citotóxica da crotamina sobre células cancerígenas quando comparadas com células normais utilizando ensaios de viabilidade celular.
- Realizar o estudo comparativo de penetração e de localização intracelular deste peptídeo em células tumorais e normais humanas e de camundongo *in vitro*.
- Realisar o estudo *in vivo* de penetração e de localização intracelular deste peptídeo em células tumorais (linhagem B16-F10 de melanoma murino) implantadas subcutaneamente em camundongos e em células normais deste animal.
- Avaliar o efeito citotóxico da crotamina no desenvolvimento dos melanomas *in vivo* após sua aplicação diária por 21 dias, com a dose escolhida baseado na Prova de Toxicidade Específica realizada em camundongos.
- Avaliar a ação tóxica prolongada da crotamina nos animais tratados em comparação com os não tratados, através de hemograma, produção de anticorpos contra a crotamina e análises histopatológicas dos rins e fígado.
- Avaliar o efeito pós tratamento da crotamina *in vivo* (formação de novo de tumores), 20 dias após o encerramento do tratamento.

Figura 9. Fluxograma.



## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Purificação da crotamina

O veneno foi obtido das serpentes *Crotalus durissus terrificus* mantidas no serpentário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo – Brasil. Uma fração de crotamina foi obtida após a secagem sob vácuo de 600 mg de veneno total dissolvido em 5 mL de tampão 0,25 M formato de amônio (pH 3,5), e a crotoxina, que constitui o maior componente do veneno, foi precipitada através da adição lenta de 20 mL de água gelada e centrifugação. O tampão Tris-base 1M foi adicionado gota a gota ao sobrenadante, até atingir pH 8,8. Esta solução foi aplicada numa coluna de CM-Sephrose FF (1,5 x 4,5 cm; Amersham-Pharmacia) que foi equilibrada com o tampão 0,04 M Tris-HCl, pH 8,8 contendo 0,064 M NaCl. Após lavar a coluna com 100 mL do mesmo tampão, a fração crotamina foi coletada através de elevação da concentração de NaCl para 0,64 M. A fração coletada foi dialisada usando membrana benzoilada (*benzoylated membrane*) com um corte molecular de 3.000 (*cutoff de MW 3.000*), e liofilizada. Quando a crotamina foi purificada utilizando este método, a análise de aminoácidos após hidrólise ácida da amostra (4N MeSO<sub>3</sub>H em 0,1% triptamina; 24h a 115 °C) apresentou um rendimento de 72 mg com a pureza maior que 98%, aliqüotadas e armazenadas a -20 °C (Kerkis et al., 2004).

### 3.2 Cultura de células.

As células cancerígenas de melanoma murino, B16-F10 (ATCC CRL-6475), SK-Mel-28 células de melanoma humano (ATCC HTB-72) e Mia Paca-2 (ATCC CRL-1420) adenocarcinoma primário de pâncreas humano foram obtidas do American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) e cultivadas em RPMI (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, E.U.A.), suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS, LGC, Biotecnologia, São Paulo, Brasil) sem antibióticos. O meio de cultura foi trocado a cada três dias. As culturas de células foram mantidas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Uma linhagem das células 3T3 imortalizadas (fibroblastos embrionários de camundongo) e que, ao contrário de quase todas as linhagens de células imortalizadas, não gera tumores quando injetada em camundongos. (<http://www.bioinfo.org.cn/book/Great%20Experiments/great22.htm>) foi utilizada como

o controle para as células cancerígenas neste trabalho.

### 3.3 Ensaio de viabilidade celular - Ensaio de MTT

As células foram plaqueadas em triplicata, em poços individuais, em uma placas de 96 poços (Nunc, Rochester, NY), na concentração aproximada de  $3 \times 10^4$  células/poço e incubadas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, até atingirem 75% de confluência. A crotamina, nas concentrações de 1 µg/mL e 5 µg/mL, correspondendo a 0.2 µM e 1 µM, foi adicionada, e as células foram incubadas por mais 3 e 24 horas, após esse período o meio foi descartado e meio novo foi adicionado. Posteriormente, 10µL de MTT (3-(4,5-dimethylazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), (Sigma, Steinheim, Alemanha) na concentração de 5 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffer Saline*-PBS) foram adicionados e a mistura foi incubada por mais 4 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Por fim, foi adicionado solvente para MTT (150 µl) em conformidade com as instruções do fabricante Sigma. Medidas ópticas foram realizadas em 540 nm utilizando um leitor Thermo Scientific Multiskan EX, (Waltham, MA, E.U.A.). Os valores representam a média e desvios padrões. A significância entre os resultados obtidos nos grupos controle, quando comparado com o grupo tratado, foi determinada pelo teste *t* de Student. Para tal foi utilizado o Software GraphPad Prism 5.0.

### 3.4 Ensaio de viabilidade celular – Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo

As lamínulas de vidro foram colocadas em cada poço de uma placas de cultura com 6 poços e a células foram plaqueadas em cima destas lamínulas em uma concentração de  $10^6$  células/ mL), e incubadas por 16 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado, e após uma hora, 1 e 5 µg/mL de crotamina foram adicionados em cada poço e células foram incubadas por 3 e 24 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, o meio foi removido, e 1 mL de meio de cultura fresco contendo 10 mg/mL Hoechst 33342 (H) e 1 mg/mL de iodeto de propídeo (PI), Vector Laboratories, Burlingame, CA, E.U.A.) foi adicionado por 20 min. a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, lamínulas com as células foram lavadas com PBS e fixadas com 2% de paraformaldeído em PBS por 30 minutos. As células foram lavadas duas vezes com PBS e, finalmente lavadas em água

destilada. Após o que, as lamínulas, foram montadas em cima das lâminas de microscopia com Vectashield (solução de montagem, Vector Laboratories). Foi realizada análise por microscopia de fluorescência usando um microscópio Eclipse Nikon E1000 (Nikon, Kanagawa, Japão), as imagens digitais foram obtidas com uma câmera modelo CCD (Applied Imaging modelo ER nº 339, Santa Clara, CA, E.U.A.) e o sistema de documentação utilizado foi Cytovision v.2.8 (Imaging Corp Aplicada).

### **3.5 Análise de fragmentação de ácidos nucléicos**

#### **3.6 Extração de ácidos nucléicos**

Células B16-F10 na concentração de  $10^5$ /mL) foram semeadas em placas de cultura com 6 poços, e incubadas por 16 horas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, o meio foi trocado e, após uma hora de incubação em meio fresco, foi adicionado 2, 5, 10, 15 e 20 µg de crotamina correspondendo ao intervalo de 0,1 a 10 µM em triplicatas. As células foram então incubadas por 24 horas, a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, o isolamento e o processo de purificação de ácidos nucléicos (DNA genômico e RNA total) foram realizados, alíquotas de 250 µl de cada amostra foram adicionadas a 750 µl de trizol-LS (Invitrogen). A extração total do RNA/DNA seguiu as instruções da Invitrogen.

#### **3.7 Análise de DNA genômico**

A análise do DNA genômico foi verificada por eletroforese em gel de agarose de 0,8% e 2%, de forma a verificar a integridade do DNA de alto peso molecular. Posteriormente, 1 µL de DNA genômico foi amplificado por PCR convencional utilizando-se primers de oligonucleotídeos previamente descritos na literatura para gene constitutivo ribossomal 16S. O produto da amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2% com 0,25% de Brometo de Etídio.

#### **3.8 Síntese de cDNA por RT-PCR a partir do RNA total**

O RNA total extraído e o precipitado foram diluídos em 50 µl de água livre de nucleases (Ultra Pure, Gibco-BRL) contendo inibidores de RNase (RNA guard-Applied Biosystems) em uma concentração final de 1 unidade/µl. O RNA total foi imediatamente amplificado por transcrição reversa (RT-PCR) ou armazenado a -70 °C, para síntese de primeira fita de cDNA.

As RT-PCRs, foram realizadas com kit comercial High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, E.U.A.). RNA total (20  $\mu$ L) de cada amostra foi incubado por 10 minutos a temperatura de 25 °C na presença de 50 pmoles de primers aleatórios (*random primers*) e 50 mM Tris HCl (pH = 8,3), KCl 75 mM, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 25 U/ $\mu$ l multiscribe RT enzima, 1,5 mM de dNTP e em 40  $\mu$ L de água livre de RNase. A reação foi realizada durante 10 minutos a 25 °C, seguida de 120 minutos incubação a 37 °C. O cDNA foi armazenado a -70 °C. A seguir, para cada amostra, 3  $\mu$ l de cDNA foram distribuídos em uma coluna da placa com 96 poços contendo solução tampão 1x PCR, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 25 pM de primers específicos para a subunidade de RNA 16S constitutivo como descrito em literatura e água UltraPure para 25  $\mu$ l de volume final. A ciclagem térmica foi 94 °C por 2 minutos para a amplificação e 5 minutos a 72 °C para a extensão final do fragmento amplificado. PBS estéril foi utilizado como controle negativo em cada reação. Os produtos de amplificação do cDNA da subunidade ribossomal 16S foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado por Brometo de Etídio.

### **3.9 Microscopia Confocal**

Foi utilizado um “laser” de argônio fixado em 488 nm para FluoReporter<sup>TM</sup> FITC (isotiocianato de fluoresceína) e em 494 nm para excitação para Iodeto de Propídeo (PI). A luz emitida foi filtrada em um comprimento de 505 nm para FITC e 617 nm para IP em filtro de passe longo em um microscópio de varredura por “laser” (LSM 510 META, Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Seções de imagens foram levadas aproximadamente ao nível médio de altura das células em estudo neste trabalho.

### **3.10 Marcação covalente de crotamina com o corante fluorescente**

A crotamina foi marcada usando o corante Fluorolink<sup>TM</sup> Cy3-reativa (GE Healthcare) ou o FluoReporter<sup>TM</sup> FITC (isotiocianato de fluoresceína), kit de marcação de proteínas (Molecular Probes, Life Technology Corporation, Carlsbad, CA, E.U.A.), segundo as instruções dos respectivos fabricantes. Após a marcação, o excesso de corante fluorescente livre foi eliminado com um filtro de centrifugação 3 kDa (Centricon, Amicon, Millipore Corp, Billerica, MA, E.U.A.). O rendimento da marcação foi estimado por medidas de absorbância em acordo com o protocolo do produtor e confirmado por espectrometria de massa (ToFSpec-E, Micromass, UK). Para verificar se a Cy3-crotamina manteve a atividade biológica após a marcação, uma dose sub-letal

de 50 µg do conjugado (correspondente a 2,5 mg de toxina/Kg) foi injetada intraperitonealmente em camundongos de 26 g. Crotamina Cy3 conjugada demonstrou uma resposta típica de paralisia das patas traseiras em camundongo, em menos de 15 minutos após a injeção, confirmando desta forma que a sua atividade tóxica não se alterou.

### **3.11 Translocação da crotamina marcada com Cy3**

Células ( $10^6$ /mL) foram semeadas em placas de cultura com seis poços contendo lamínulas de vidro e incubadas por 24 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado, e após uma hora e 2,5 µg/mL de crotamina marcada com Cy3 ou crotamina não marcada, foram adicionadas de forma independente em cada poço, e incubadas por 24 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. As lamínulas com as células foram lavadas com PBS e fixadas com 2% de paraformaldeído em PBS por 30 minutos, e novamente lavadas duas vezes com PBS, e por fim lavadas com água deionizada. Em seguida, as lamínulas, foram colocadas em lâminas de microscopia com Vectashield meio de montagem (Vector Laboratories).

### **3.12 Translocação da crotamina revelada por imunocitoquímica**

As lamínulas com as células que receberam apenas crotamina foram permeabilizadas com 0,2% de Triton X100, em PBS por 5 min. em banho de gelo, e bloqueadas com PBS contendo 5% de BSA (Sigma), e após 1 hora de incubação em temperatura ambiente foram lavadas com PBS, e adicionado o anticorpo primário anticrotamina diluído 1/100 em PBS 1% de BSA, como controle foi utilizado soro normal, e incubadas por duas horas a temperatura ambiente e lavadas duas vezes com PBS 0,05 % Tween 20. Os anticorpos secundários marcados com Cy3(Santa Cruz, California, U.S.A.) e Peroxidase (KPL, Gatherburg, Meryland, U.S.A.) foram diluídos de acordo com as instruções dos fabricantes em PBS 1% de BSA e 0,05% Tween, e aplicado sobre as lamínulas as quais foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente e lavadas duas vezes com PBS 0,05% Tween. Para a revelação da peroxidase, foi utilizado o substrato cromógeno 4-alfa-cloro-1-naftol (Sigma). Finalmente, as lamínulas contendo as células, foram lavadas com água deionizada, e colocadas em lâminas de microscopia com Vectashield meio de montagem (Vector Laboratories). Foram realizadas as análises, por microscopia de fluorescência e microscopia de luz e em microscopia

confocal, como acima mencionado.

### **3.13 Ensaio de Citometria de fluxo FACS**

Células B16-F10( $10^5$ /mL) foram semeadas em placas de cultura com seis poços, e incubadas uma noite a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado, e após uma hora 2.5 µg/mL de crotamina marcada com Cy3 foi adicionado em poços independentes, onde as células controle não receberam crotamina, sendo incubadas 24 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram dissociadas enzimaticamente utilizando-se tripsina 0,025% contendo 0,1 mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetracético), lavadas e diluídas em tampão de FACS (Bekson Dickson FACSSFlow Sheath Fluid, BD Biosciences) para a análise quantitativa da média de intensidade de fluorescência de crotamina-Cy3 internalizada através de Citometria de fluxo, FACS Calibur, Becton Dickinson. Os experimentos foram realizados em duplicatas.

### **3.14 Animais Utilizados para Crescimento *in vivo* das Células B 16 F10 indutoras de melanomas murinos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil (protocolo n.º. 250/06 de 8 de agosto de 2006). Camundongos isogênicos da linhagem C57BL/J6, machos e fêmeas com idade entre 4 e 5 semanas e peso entre de 16-18 g, foram utilizados para a avaliação da atividade antimelanoma *in vivo* da crotamina. Camundongos Swiss Webster NHI com 4 semanas de vida e do mesmo sexo, pesando entre 14 a 16 gramas, foram utilizados para a prova de toxicidade específica. Os animais provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan, foram mantidos em temperatura controlada (24 °C), com livre acesso a alimentação e água e ciclos claro/escuro de 12 horas. Os grupos controle e tratados foram formados, e alojados 5 animais em cada caixa, no máximo.

### **3.15 Localização intratumoral da crotamina marcada Cy3, ensaio *in vivo***

Células B16-F10 indutoras de melanomas murinos ( $10^5$  células/mL) contidas em 200 µL foram implantadas por via subcutânea em camundongos C57/Bl/J6 machos, de cinco semanas de vida, pesando 16-18 g. Após 12 a 14 dias período de surgimento dos

tumores palpáveis, foi injetada por via intraperitoneal (ip), crotamina conjugada com Cy3 (2,5  $\mu\text{g}$ /por animal), 24 horas após a injeção os animais com tumor foram eutanasiados e dissecados. As secções dos tecidos de melanoma e órgãos foram preparadas utilizando um cryomicrotome (Leica, CM 1100).

### **3.16 Efeito da Crotamina em controlar o crescimento de células cancerígenas *in vivo***

Três grupos experimentais foram estabelecidos. O primeiro grupo recebeu 200  $\mu\text{L}$  de células B16-F10 ( $10^5$  células/mL) por via subcutânea em camundongos C57/Bl/6 machos, de 5 semanas de vida, pesando 16-18 g. e tratados diariamente com crotamina 1  $\mu\text{g}$ /animal (grupo crotamina-tratados), durante 21 dias a partir do primeiro dia após a inoculação das células. O segundo grupo recebeu 200  $\mu\text{L}$  de células B16-F10 ( $10^5$  células/mL) e recebeu 100  $\mu\text{L}$  de placebo (solução salina) em vez de crotamina (grupo não tratado). O terceiro grupo recebeu apenas 100  $\mu\text{L}$  de placebo. Dez animais de cada grupo foram pesados antes das inoculações e diariamente até o vigésimo quarto dia. Após a última injeção (crotamina ou placebo), os animais dos grupos tratados e não tratados, foram eutanasiados e os tumores removidos e pesados. Os animais saudáveis, dos grupos que foram pesados diariamente, foram mantidos vivos por mais 40 dias, a fim de analisar os efeitos de longa duração de parada do crescimento tumoral induzido pela crotamina. Em seguida os animais foram eutanasiados e amostras de tumor e tecido normal foram preparadas como descrito acima.

### **3.17 Teste de probabilidade de sobrevivência de Kaplan-Meier**

As análises estatísticas foram realizadas para comparar os grupos experimentais e controle, realizados em camundongos. Os dados obtidos foram configurados em dias, e utilizados para desenhar um gráfico. Foi utilizado o Software Graph Pad Prism 5.0. O teste probabilístico de sobrevivência global por Kaplan-Meier, que avalia o número de animais sobreviventes quando comparados com o grupo controle, sendo assim foi possível verificar a qualidade de vida ou não dos animais tratados.

### **3.18 Respostas hematológicas e imunológicas dos camundongos implantados com B16-F10, tratados ou não com crotamina**

A análise incluiu a contagem de células do sangue, mononucleares e polimorfosnucleares, de 5 camundongos selecionados aleatoriamente de cada grupo, após 24 e 72 horas, bem como após 7, 14 e 21 dias. Os soros referentes a estes períodos foram avaliados, pelo (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ensaio enzimático imunoabsorvente ELISA, para a detecção de taxas de anticorpos contra a crotamina.

### **3.19 A análise histológica dos tecidos de camundongos C57/Bl/6**

Após 21 dias de tratamento com crotamina os camundongos foram eutanasiados e os órgãos removidos fixados em PBS contendo 4% de formalina. Os cortes de tecido (5-7  $\mu\text{m}$  de espessura) foram obtidos a partir de blocos incluídos em parafina e montados em lâminas de microscopia adesiva com água quente (40°C). Coloração histológica de hematoxilina e eosina (HE), foi utilizada para análise por microscopia de luz por histopatologistas.

### **3.20 Análise Histológica em Cortes congelados**

Os melanomas subcutâneos e os órgãos internos foram fixados em PBS contendo 4% de formalina, o material foi lavado em PBS por 1 hora, os tecidos foram preservados com banhos de PBS sacarose 30, 50 e 75%, e incluídos em Tissue-Tek (SAKURA finetechnical Co., Ltd., Tokyo, 103, Japan) por uma noite e congelados a -20 °C. Foram realizados cortes de 5 a 6  $\mu\text{m}$  em micrótomo Kriostat a -20 °C.

### **3.21 Prova de ganho de peso em camundongos**

Grupos de 10 animais Swiss Webster NIH, do mesmo sexo, com 4 semanas de vida e peso entre 14 a 16 gramas. O primeiro grupo recebeu por via intraperitoneal 2  $\mu\text{g}$  de crotamina por animal, o segundo grupo recebeu por via subcutânea 2  $\mu\text{g}$  de crotamina por animal, o terceiro grupo recebeu por via subcutânea 2  $\mu\text{g}$  de crotamina por animal aquecida a 56°C por 30 min., o quarto grupo recebeu por via subcutânea 2  $\mu\text{g}$  de crotamina por animal aquecida a 80°C por 30 min e o quinto grupo recebeu por via subcutânea 2  $\mu\text{g}$  de crotamina por animal aquecida a 100°C por 10 min. Os grupos controles, receberam por via subcutânea PBS. Antes e após as inoculações os grupos

foram pesados diariamente e tiveram seus pesos registrados durante 7 dias. A dose de crotamina para ser considerada atóxica nos animais em teste após três dias da inoculação devem alcançar o mesmo peso inicial (primeiro dia) não podendo ocorrer mortes durante o teste, sendo que ao final do sétimo dia os animais em teste devem ganhar no mínimo 60% do peso ganho pelo grupo controle.

### **3.22 Produção de anticorpos em camundongos anti-Crotamina**

Três grupos de camundongos Balb/c machos de 6 semanas de idade e pesando entre 16-18 gramas foram utilizados. Os animais foram imunizados por via subcutânea, com intervalos de 90 dias, os antígenos em capsulados/adsorvidos em sílica mesoporosa (SBA-15). No primeiro grupo, cada animal recebeu 1 µg de crotamina, no segundo grupo, cada animal recebeu 0,5 µg de veneno bruto crotálico de diversas serpentes, fornecido pelo Instituto Butantan, e finalmente o terceiro grupo, denominado grupo controle recebeu apenas adjuvante. Para resposta primária os animais foram sangrados 7, 14, 21 e 28 dias. Para a resposta secundária os animais receberam uma dose de reforço após 90 dias e foram sangrados 7, 14, 21, 28 e 36 dias.

### **3.23 Ensaio Enzimático Imuno Absorção (ELISA)**

Os ELISAs foram realizados para a detecção do IgG anticrotamina, na concentração de 0.5 µg/poço, de crotamina em tampão carbonato bicarbonato pH 9.6, em placas de 96 poços (PolySorp™, Nunc – EUA). Incubados à temperatura ambiente durante 1 hora e, em seguida, a 4 °C durante uma noite. Os poços foram lavados três vezes com o tampão 1X PBS. Após as lavagens, 50 µL da solução de bloqueio, tampão PBS com 5% BSA, foi adicionado a cada poço e incubados por 2 horas a 37 °C. Depois de 3 lavagens com tampão 1X PBS, 50 µL de soros de camundongos diluídos a partir de 1/100 na razão 2, em tampão PBS com 1% BSA, foram incubados durante 2 horas a 37 °C e, em seguida, lavados três vezes com PBS/Tween20 (0,05%). Anticorpo secundário IgG anti-camundongo marcado com fosfatase alcalina (Sigma-são Francisco, EUA) foi adicionado diluído a 1/4000 em PBS/BSA 1% contendo 0,05% Tween 20 e incubada durante 1 hora a 37 °C. Depois de 3 lavagens com PBS/Tween, a reação foi revelada pela adição de 50 µL de substrato, 1 mg/mL de nitrofenil fosfato de sódio (pNPP – Sigma, EUA). A reação foi interrompida após 20 minutos com a adição de 50µl de 3 M

NaOH. A densidade óptica (D.O.) foi lida a 405 nm em um Multiskan MS da Labsystems.

### **3.24 Estatística**

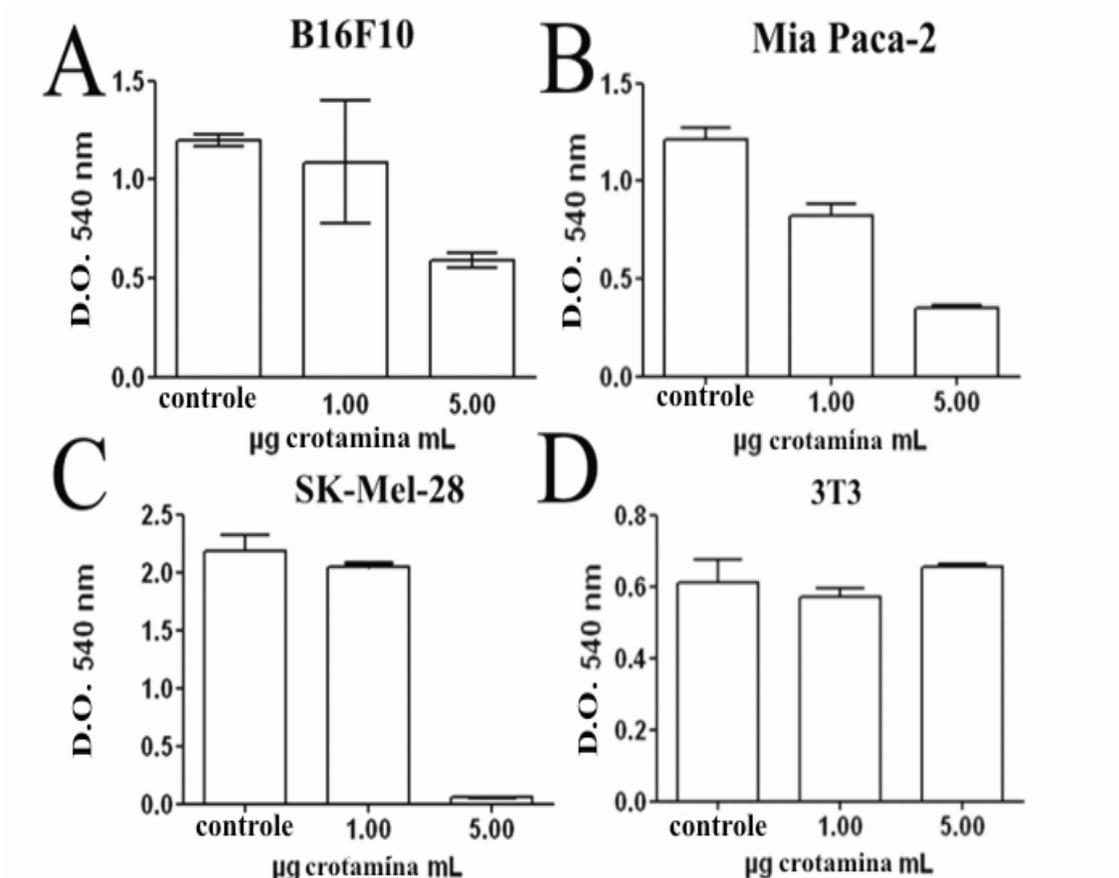
O desvio Padrão, foi determinada pelo teste  $t$  de Student. Para tal foi utilizado o Software GraphPad Prism 5.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeito citotóxico da crotamina *In vitro*

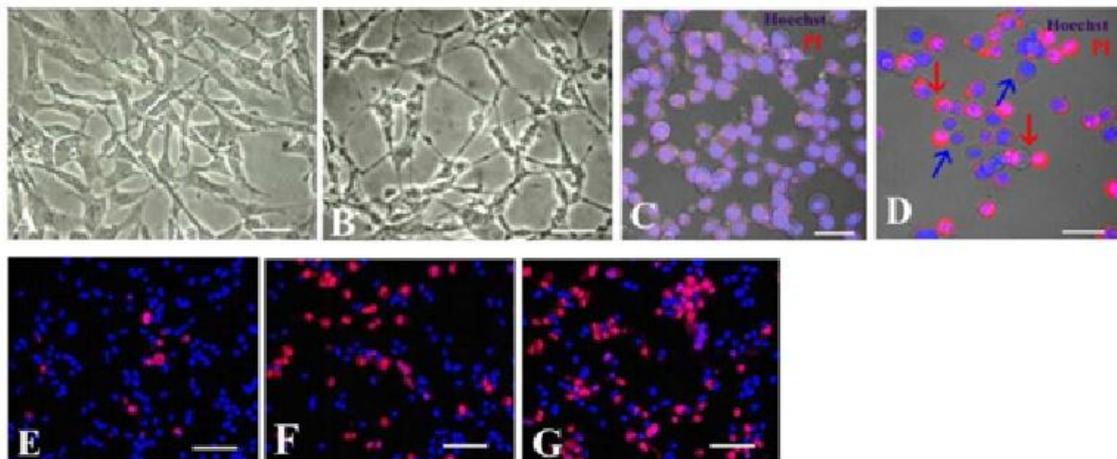
Afim de se determinar a concentração citotóxica da crotamina para células de melanoma murino B16-F10, células de melanoma humano SK-Mel-28 e Mia Paca-2, adenocarcinoma primário de pâncreas humano, foram incubadas com 1 µg/ml e 5 µg/ml concentrações da toxina durante 24 horas. Em seguida, foi adicionada uma solução de MTT por quatro horas, o MTT é metabolizado pela succinato desidrogenase mitocondrial, originando cristais insolúveis denominados cristais de formazan, os quais são dissolvidos com um solvente apropriado. O produto colorido formazan foi medido quantitativamente. Os valores de densidade óptica em 540 nm, indicando células metabolicamente ativas, foram significativamente reduzidos, demonstrando baixa viabilidade das células em relação ao controle de células não tratadas. E como controle foi utilizado uma linhagem de células normais 3T3 (fibroblastos embrionários de camundongo). A Figura 10 A-C mostra diminuição da viabilidade em algumas linhagens de células cancerígenas, mesmo após o tratamento com baixa concentração de crotamina, enquanto que em concentrações mais altas a crotamina se mostrou tóxica para todas as células tumorais. No entanto, as mesmas concentrações de crotamina não induziram a morte celular nas células 3T3 imortalizadas, mas não cancerígenas (Figura 10 D). Pode-se também observar que diferentes linhagens de células cancerígenas respondem diferencialmente ao tratamento com crotamina. A viabilidade das células B16F10 varia significativamente quando tratadas com a toxina na concentração de 1 µg/ml, porém a mesma cai pela metade quando se aumenta a concentração para 5 µg/ml (Figura 10A). Mia-Paca 2 responde gradualmente ao tratamento, apresentando uma sensibilidade mais alta para ambas concentrações, assim como menor variabilidade na resposta (Figura 10B). Não há diminuição da viabilidade das células SK-MEL-28 da toxina na concentração de 1 µg/ml, porém a mesma cai drasticamente na concentração de 5 µg/ml (Figura 10C). As células normais 3T3, utilizadas como controle, não apresentaram nenhuma variação na sua atividade metabólica após o tratamento com a crotamina (Figura 10D). Alterações morfológicas, não foram observadas nas células controle (**Figura 10 E**), porém foram evidentes nas células B10F10 tratadas com 5 µg/ml de crotamina (**Figura 10 F**).

Figura 10. Ensaio de viabilidade celular - Ensaio MTT.



Alterações na viabilidade celular observadas em células tumorais, após incubação de 1 ou 5 µg/mL de crotonina durante 24 horas, em triplicata. A) B16-F10, B) Mia Paca-2, C), SK-MEL-28 e D) 3T3 linhagens celulares. FONTE: Pereira (2011)

**Figura 11. Ensaios de viabilidade celular, utilizando-se o método Hoechst e Iodeto de propídeo.**

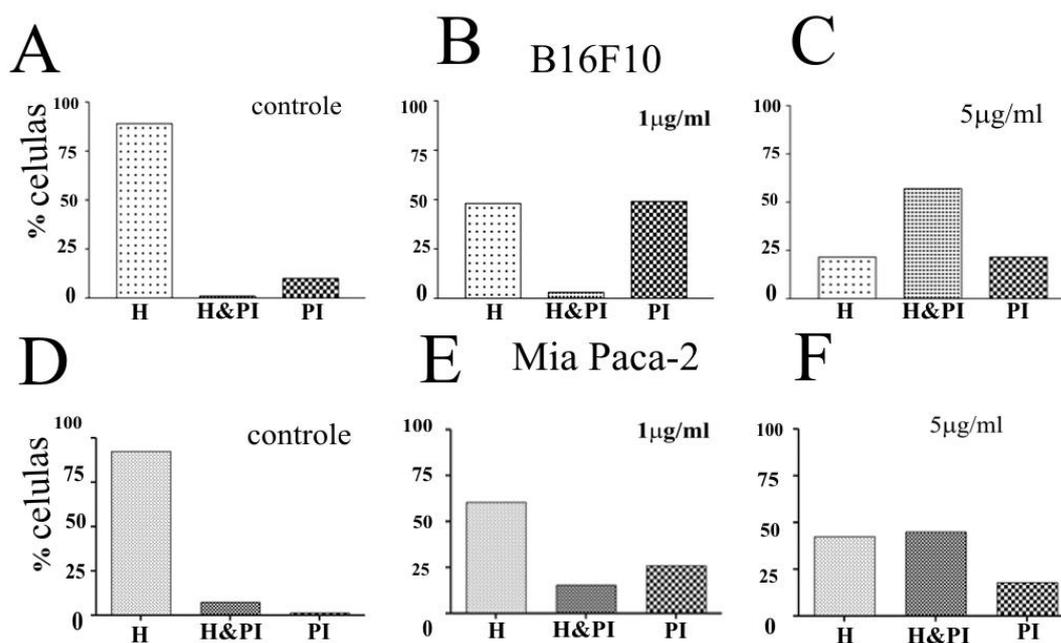


A) Morfologia Normal das células B16-F10. B) Mudanças morfológicas observadas nas células B16-F10, após incubação com 5 µg/mL de crotamina por 24 horas. C) Controle de cultura de células B16-F10 apresentam células vivas com Hoechst núcleos corados azul pálido. D) Células B16-F10, após incubação com 5 µg/mL crotamina (24 horas), mostrando as células mortas coradas com um núcleo brilhante condensado em vermelho. E) Células Mia Paca-2 incubadas sem crotamina. F) e G) Mia Paca-2 após incubação das células com 1 µg/mL e 5 µg/mL de crotamina (24 horas), respectivamente. Barra branca corresponde à escala de 10µm. FONTE: Pereira (2011)

Além disso, a viabilidade das células, B16-F10 e Mia Paca-2, foi avaliada através da técnica de coloração IP e H (**Figura 11 C-G**). Os dados obtidos foram quantificados (**Figura 12 A-F**), células viáveis com as membranas intactas não apresentaram fluorescência vermelha no núcleo (**Figura 11 C, E**), enquanto que as células não viáveis foram manchadas de vermelho brilhante (**Figura 11 D, F, G**). Hoechst 33342 é um corante capaz de penetrar nas células com as membranas intactas determinando um núcleo de coloração azul-claro (**Figura 11 C**). Esta tintura também atravessa membranas danificadas, se condensando no núcleo de células mortas, visualizadas em azul (**Figura 11 D**). A análise quantitativa dos dados demonstrou que três horas de tratamento com crotamina, tanto em concentrações baixas ou altas, não foram significativamente tóxicas para células B16-F10 e Mia Paca-2, quando comparadas com os grupos controles. Dados não mostrados. O tratamento com crotamina prolongado por 24 horas mostrou citotoxicidade para as células em estudo, quando comparados com os grupos controles. A análise quantitativa dos dados está apresentada na **Figura 12 A-F**. A sobrevivência de células B16-F10 e Mia Paca-2 após 24 horas de tratamento com

crotamina foi diminuída significativamente e pareceu ser mais pronunciada quando foi utilizada maior concentração de crotamina (**Figura 12 B, E com 1  $\mu\text{g/mL}$  e C, F com 5  $\mu\text{g/mL}$** ). Observando estes resultados como um todo, sugere-se que o efeito tóxico da crotamina é um processo de concentração-dependente, e uma boa correlação foi observada nos resultados obtidos usando H ou IP em comparação aos observados para o ensaio de MTT (**Figura 10**).

**Figura 12. Efeito seletivo citotóxico da crotamina em células cancerígenas, dose-dependente.**



**A)** Controle: células B16-F10 mantidas sem crotamina. **B)** Células B16-F10 tratadas com 1  $\mu\text{g/mL}$  durante 24 horas. **C)** Células B16-F10 observadas após incubação com 5  $\mu\text{g/mL}$  de crotamina, durante 24 horas. **D)** Controle: Células Mia Paca-2 mantidas sem crotamina. **E)** Células Mia-Paca-2 tratadas com 1  $\mu\text{g/mL}$  durante 24 horas **F)** Células Mia-Paca-2 tratadas com 5  $\mu\text{g/mL}$  durante 24 horas. H-Hoechst 33342; IP-Iodeto de Propídio, H&IP – Hoechst mais Iodeto de Propídio. FONTE: Pereira (2011)

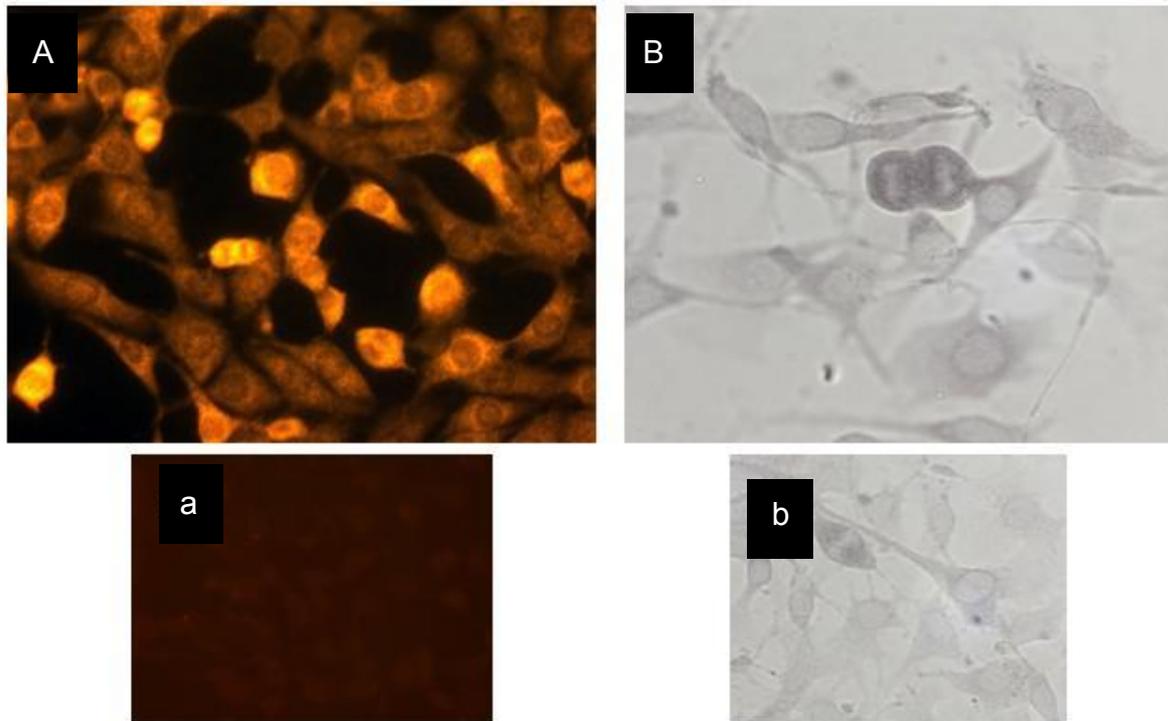
A **Figura 10** apresenta a viabilidade celular, das células B16-F10, avaliada por MTT, onde as D.Os. foram transformadas em porcentagens de células mortas, sendo assim possível o cálculo da  $IC_{50}$  da crotamina estimada em 7.44  $\mu\text{g/mL}$ . A **Figura 11** apresenta a viabilidade, das células B16-F10, celular avaliada por Hoechst e IP, onde o número de células mortas foi registrado para cada diluição, sendo assim possível o cálculo da  $IC_{50}$  da crotamina estimada em 5.11  $\mu\text{g/mL}$ . Embora os métodos utilizados sejam muito diferentes, quando comparados entre si, os valores das  $IC_{50}$ , apresentados pelos dois métodos, foram muito próximos, indicando assim que a média entre essas doses poderá matar aproximadamente 50% de uma população de células B16-F10, cultivadas nas condições acima mencionadas. Esses valores podem variar de acordo com as preparações de crotamina, bem como sua atividade biológica do lote correspondente.

#### **4.2 Translocação *in vitro* B16-F10 e localização intracelular da crotamina**

Dois métodos diferentes de imunocitoquímica foram utilizados para avaliar a absorção da crotamina pelas células B16-F10, a fim de confirmar a translocação da crotamina em células cancerígenas.

A molécula natural da crotamina ou conjugada com fluorocromos FITC ou Cy3 consegue entrar em células. A presença do pepitídeo dentro das células e núcleos é visualizada por microscopia fluorescente. Para visualizar a crotamina não conjugada dentro das células, utilizamos um soro anticrotamina primário, e dois tipos de secundários marcados com rodamina (vermelho) e peroxidase. Na figura 13 podemos observar que a crotamina marca células em divisão quando conjugada ou revelada por peroxidase. Com essa metodologia pretendemos tentar localizar a crotamina em outras estruturas celulares.

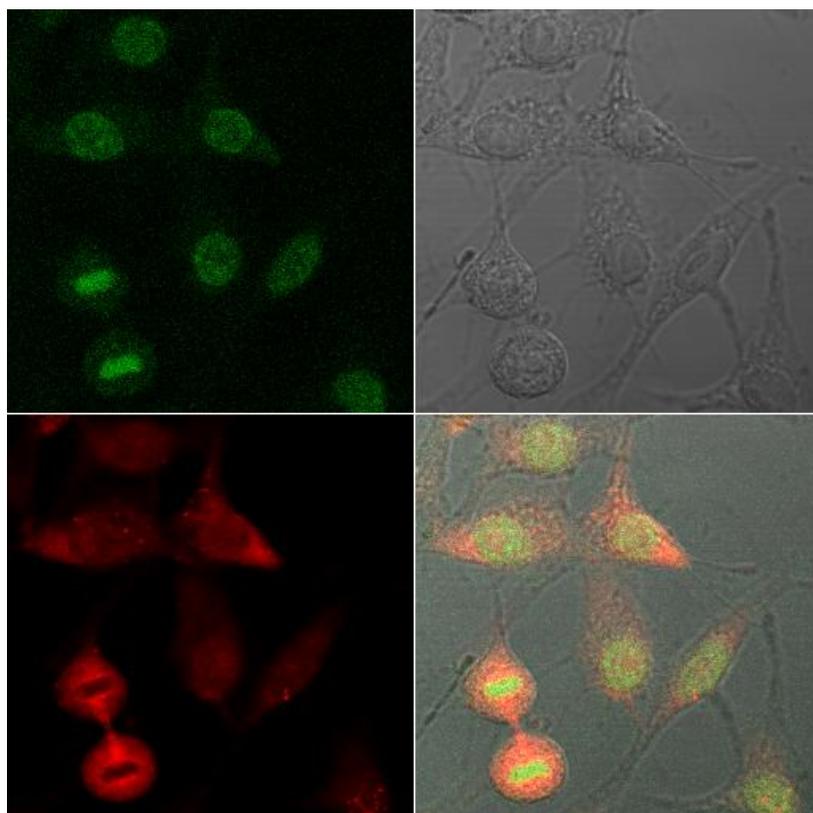
**Figura 13. Internalização *in vitro* de crotamina em células B16-F10.**



Podemos analisar a captação e visualização da crotamina *in vitro* através do uso de anticorpos anticrotamina, **A)** revelado com anticorpo secundário marcado com fluorocromo Cy3, fluorescência forte observada em células em divisão (vermelha) e em células quiescentes **a)** controle. **B)** da mesma forma anterior, anticorpo secundário marcado com peroxidase, observada em células em divisão (escura). **b)** controle. Escala 10  $\mu$ m. FONTE: Pereira (2011)

Trabalhos anteriores, demonstrando que a crotamina é um peptídeo célula penetrante, realizados pelo Laboratório de Genética do Instituto Butantan, demonstraram que a crotamina tem preferência por células em divisão, onde nesta fase a célula apresenta na membrana um pico elevado de expressão de HSPG e a crotamina depois que entrou na célula ela é atraída pela carga negativa do DNA. Sendo assim nas fases mitose e anáfase observamos a crotamina marcando os centríolos e núcleo. Baseados nesses relatos pesquisamos se a crotamina marcaria também microtúbulos, assim após tratamento de células B16-F10, com crotamina marcada com FITC (verde) por 24 horas, as células foram analisadas pela técnica de imunocitoquímica com antitubulina beta, revelada com anticorpo secundário marcado com rodamina (vermelho), sendo assim observamos a crotamina dentro dos núcleos marcados em verde e não pudemos observar a marcação dos túbulos das células em estudo, porém notamos uma fraca marcação de centríolos, **Figura 14 A**. Em vermelho observamos a marcação dos túbulos, **Figura 14 C**.

**Figura 14. Crotamina marcada com FITC e antitubulina beta.**



**A)** Crotamina conjugada com FITC observada em cromossomos metafásicos corados em verde. **C)** O citoesqueleto das células foi revelado com anticorpo primário antitubulina e revelado com anticorpo secundário marcado com rodamina em vermelho. **D)** Sobreposição FITC e anti-tubulina beta. **B)** Contraste de interferência diferencial (DIC). Escala 10  $\mu\text{m}$ . FONTE: Pereira (2011)

### 4.3 Fragmentação do DNA.

Os pesquisadores (Kerkis et al 2004), mostraram que a crotamina interage com grupos fosfatídicos nos cromossomos, sem intercalar no cromossomo, e neste estudo pesquisamos se a crotamina poderia exercer degradação no DNA em células tumorais.

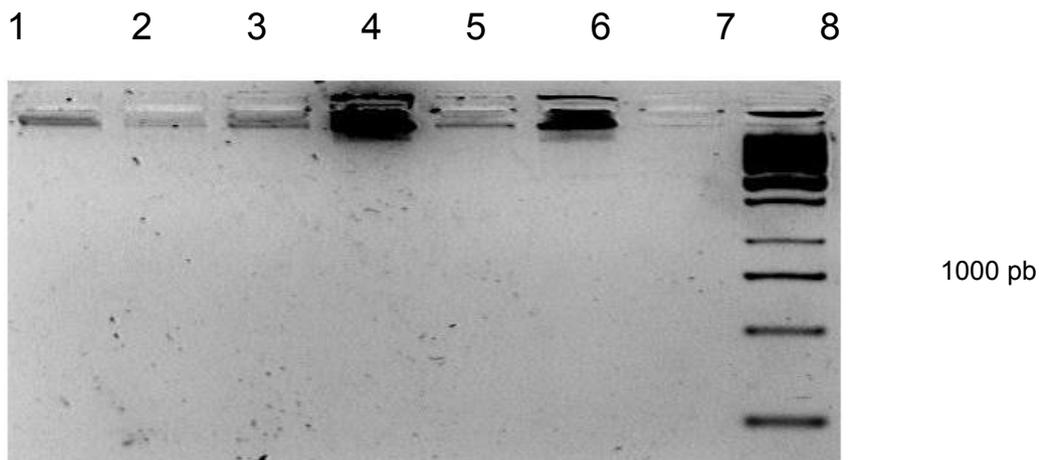
A citotoxicidade da crotamina foi avaliada em diferentes concentrações a fim de verificar se a mesma poderia iniciar a morte celular através de sua interação com DNA.

A integridade do DNA genômico foi confirmada por análises de eletroforese em gel de agarose, não apresentando qualquer degradação do DNA (**Figura 15 A**). Análise de PCR convencional ribossomal 16S RNA foi realizada, utilizando crotamina. (**Figura 15 B**). Observamos que a crotamina nas concentrações entre 2–20  $\mu\text{g/mL}$ , correspondendo a 0,4 a 4  $\mu\text{M}$ , não induziram a fragmentação do DNA em células B16-F10. (**Figura 15 A e B**).

Estes resultados são muito importantes, pois se pretendemos estudar a ação da crotamina sobre melanomas *in vivo*, e cientes de que a crotamina, dependendo da dose, pode ser tóxica para camundongos e aliada ao fato da mesma não alterar o DNA das células tumorais *in vitro*, a crotamina talvez não modifique o material genético dos animais hospedeiros.

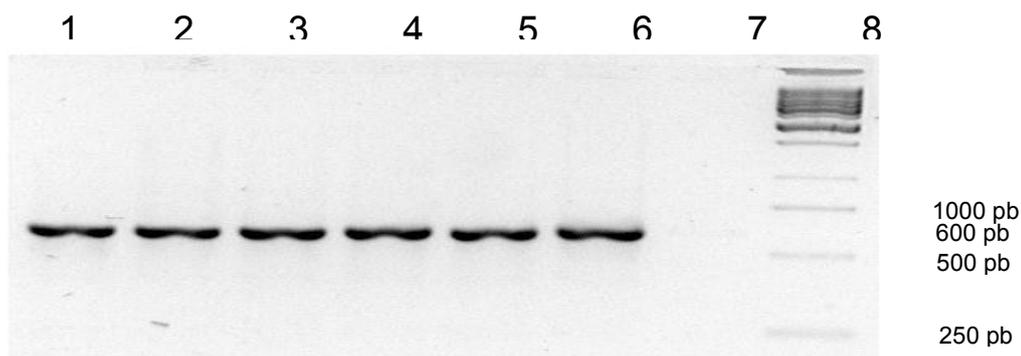
**Figura 15. Análise da fragmentação do DNA por PCR.**

**A) DNA genômico de células B16-F10 tratadas com crotamina**



Gel 2 % DNA genômico 25 µL

**B) PCR do DNA com o gen ribossomal 16S de células B16-F10 tratadas com crotamina**



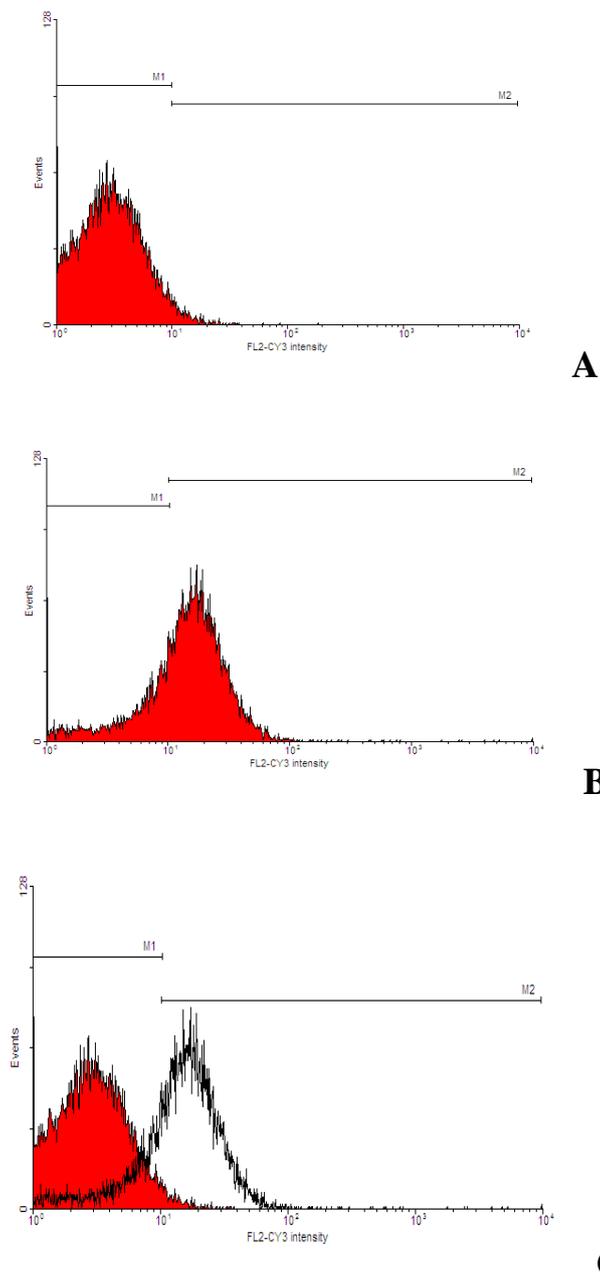
Gel 2 % 25 µL

Coluna 1) Células B16-F10 sem crotamina, Coluna 2. Crotamina 2 µg /mL, Coluna 3. Crotamina 5 µg /mL, Coluna 4. Crotamina 10 µg /mL, Coluna 5. Crotamina 15 µg /mL, Coluna 6. Crotamina 20 µg /mL, Coluna 7. A) DNA genômico, tampão de amostra. Coluna 7. B) PCR do DNA, tampão de reação. Coluna 8. Marcador de pares de bases. FONTE: Pereira (2011)

#### 4.4 Ensaio de Citometria de fluxo.

Foram adicionados 2,5  $\mu\text{g/mL}$  de crotamina marcada com crotamina-Cy3 em cultivos de células B16-F10 ( $10^5$  células/mL) os quais foram analisados através de ensaios de citometria de fluxo após 24 horas. Como controle negativo, usamos células que não foram incubadas com a crotamina marcada **Figura 16 A**. A **Figura 16 B** apresenta, em porcentagens, as células marcadas com crotamina-Cy3, onde 70,44% das células apresentaram marcação com a crotamina-Cy3. A **Figura 16 C** apresenta os dois eventos onde o preenchimento em vermelho representa o controle e o preenchimento em branco representa as células tratadas com crotamina-Cy3. Para correção do experimento, as células do controle que apresentaram “falsa” marcação (2,69% das células contidas na área M2) foram subtraídas das células que apresentaram marcação positiva (73,13% das células contidas na área M2), Número total de eventos analisados 10000. Estes resultados comprovam de forma contundente a presença da crotamina dentro das células B16-F10, mostradas anteriormente em microscopia confocal e imunocitoquímica. Através deste experimento podemos confirmar a presença da crotamina dentro das células. Este resultado será importante para estabelecermos uma metodologia de tratamento em animais implantados com melanomas.

**Figura 16. Ensaio de Citometria de fluxo.**



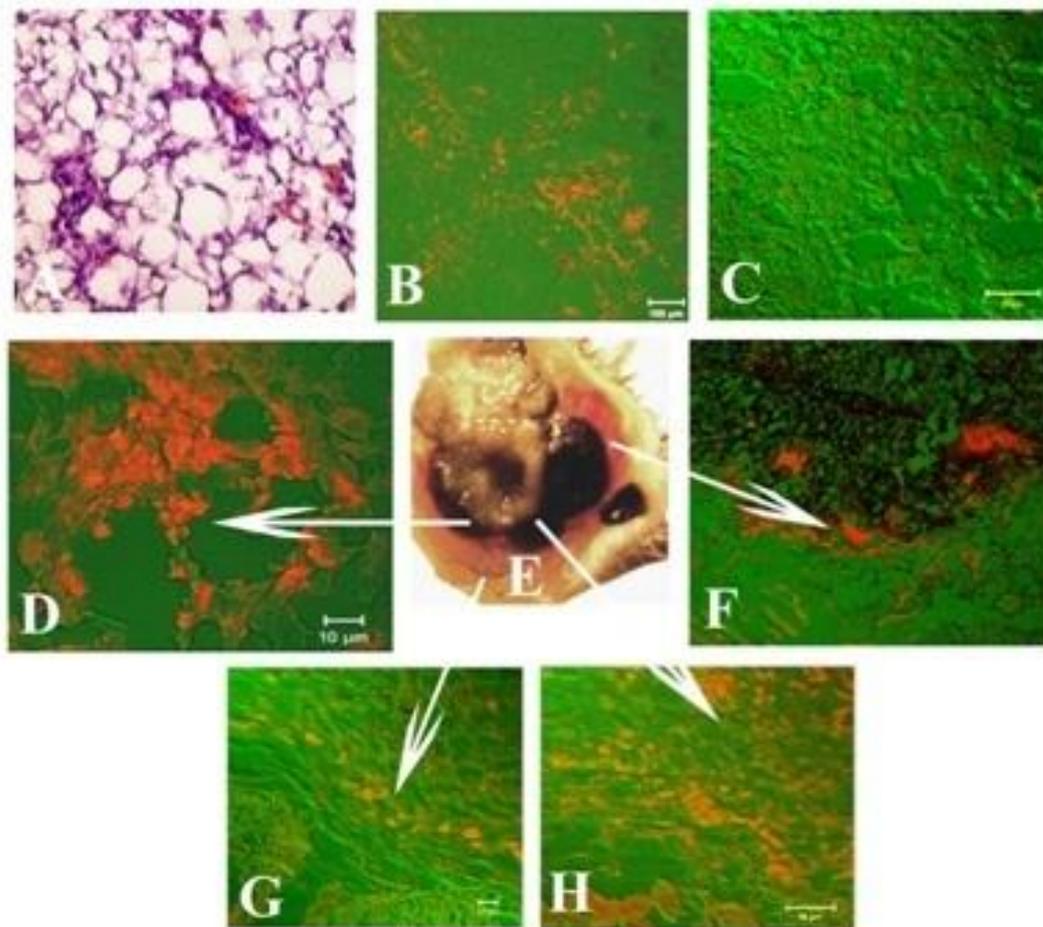
**A)** Como controle negativo, usamos células B16-F10 que não foram incubadas com a crotamina marcada. **B)** Células B16-F10, incubadas com crotamina marcada com Cy3 por 24 horas. **C)** Sobreposição das imagens onde crotamina marcada (preenchimento em branco) e crotamina não marcada (preenchimento em vermelho). Número total de eventos 10000. FONTE: Pereira (2011)

#### **4.4 Localização *in vivo* de crotamina em melanomas murinos**

Os melanomas cutâneos primários foram implantados por injeções subcutâneas de células B16-F10 ( $10^5$ /mL). Após 12 dias dos implantes, os animais receberam por via

intraperitoneal 100  $\mu$ L de crotamina conjugada Cy3 (2,5  $\mu$ g/animal), os quais após 24 horas foram eutanasiados, sendo os melanomas removidos e utilizados em cortes histológicos, em criostato, para verificar, através de microscopia confocal, onde foi possível observar a presença da crotamina marcada com Cy3 nas células tumorais, a qual nunca tinha sido observada a translocação da crotamina em tecidos animais *in vivo*. Cortes histológicos dos tumores corados por HE mostraram a formação das células de melanoma (**Figura 17A**). Sinal fluorescente forte foi observado predominantemente no interior da massa tumoral (**Figura 17B**), as células normais em torno do tumor não apresentaram sinais de fluorescência (**Figura 17C**), acúmulo expressivo de crotamina foi observado nas células tumorais (**Figura 17D, E**), áreas de necrose tumoral (**Figura 17 E, F**), bem como, em rápida multiplicação de células metastáticas (**Figura 17 E, G, H**). Estes dados sugerem que a crotamina marcada apropriadamente, pode ser usada em análise de diagnóstico por imagem latente de células tumorais em organismos vivos.

**Figura 17. Crotamina conjugada-Cy3 (2,5 µg/mL) foi confirmada em células de melanoma murino, 24 horas após a injeção, prova *in vivo*.**



**A)** Cortes histológicos de células tumorais coloridos por HE. **B)** Sinal fluorescente forte (vermelho) localizado dentro da massa tumoral. **C)** As células normais sem crotamina conjugada com Cy3 **D)** As células tumorais apresentaram forte acúmulo de crotamina no citoplasma. **E)** Apresentação morfológica do tumor sob a pele do animal. **F)** Sinal fluorescente em células B16-F10 detectado em torno das áreas de necrose (seta branca). **(G-H)** Células metastáticas (setas brancas). A, E - microscopia de luz. A microscopia confocal: (B, D, F, H) = DIC + Fm. barras de Escala: A-D = 10µm; G, H = 20 µm, B, C, F = 100 µm. FONTE: Pereira (2011)

Através dos resultados observados nesta tese, podemos afirmar que a crotamina tem afinidade pelas células tumorais, fato este não observado nas células normais. Baseados nestas evidências, resolvemos verificar a ação da crotamina, em animais implantados com tumores induzidos pela célula B16-F10. Uma vez que a crotamina, dependendo da concentração, pode ser tóxica para camundongos, tomamos alguns cuidados para estabelecermos um tipo de tratamento o qual não interferisse no bem estar dos animais e que ao longo do mesmo não apresentasse efeitos colaterais ou morte. Para tanto avaliamos a toxicidade específica da crotamina em camundongos, com o intuito de encontrarmos a dose ideal em µg a ser utilizada diariamente. Após o início do

tratamento os leucócitos, mononucleares e polimorfonucleares foram avaliados após 24 e 72 horas e 7, 14, 21 e 28 dias, e durante esse período foi também avaliado o peso dos grupos de camundongos tratados, não tratados e um terceiro grupo que recebeu apenas placebo. Também nos períodos acima mencionados foram realizados testes nos soros dos animais não tratados e tratados com crotamina, a fim de avaliar se a crotamina, nesse tipo de tratamento, seria capaz de induzir anticorpos contra a própria crotamina. Ao final do tratamento, o qual durou 21 dias, foram avaliados os rins e fígados dos animais tratados, não tratados e grupo que recebeu apenas placebo.

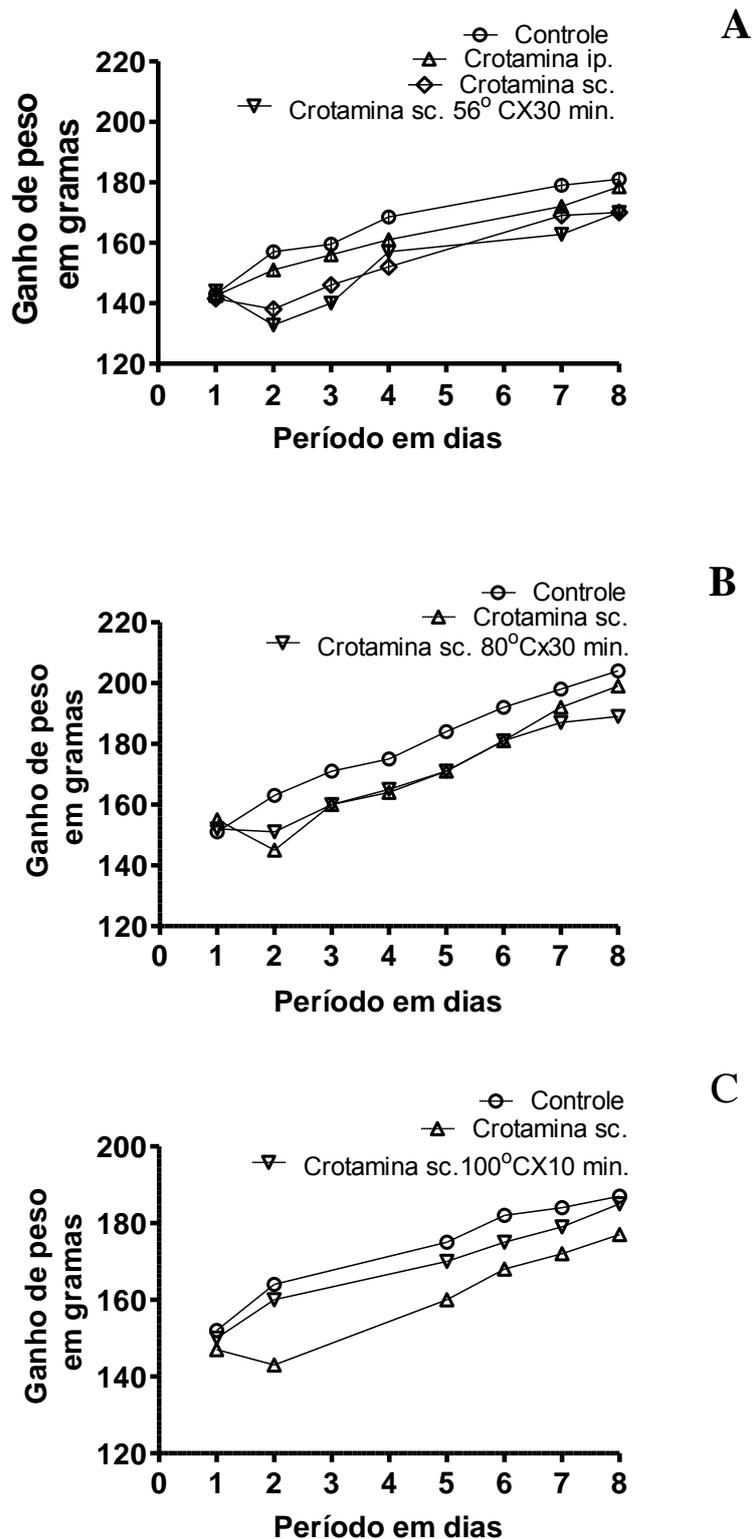
Em seguida apresentaremos os resultados dos experimentos, acima mencionados, para posteriormente apresentarmos os resultados do tratamento em si.

#### **4.6 Prova de ganho de peso (Toxicidade Específica)**

Devido ao poder tóxico da crotamina, principalmente para camundongos, a prova de ganho de peso foi de fundamental importância para estabelecermos a dose de tratamento com a crotamina. Grupos de 10 animais Swiss Webster NHI, do mesmo sexo, com 4 semanas de vida e peso entre 14 a 16 gramas. O primeiro grupo recebeu 100  $\mu$ L de PBS contendo 2  $\mu$ g de crotamina por animal (i.p.), o segundo grupo recebeu 100  $\mu$ L de PBS contendo 2  $\mu$ g de crotamina por animal (s.c), o terceiro grupo recebeu 100  $\mu$ L de PBS contendo 2  $\mu$ g de crotamina (s.c) por animal aquecida a 56°C por 30 min., o quarto grupo recebeu por 100  $\mu$ L de PBS contendo 2  $\mu$ g de crotamina (s.c) por animal aquecida a 80°C por 30 min., o quinto grupo recebeu 100  $\mu$ L de PBS contendo 2  $\mu$ g de crotamina (s.c) por animal aquecida a 100°C por 10 min. Os grupos controles, receberam por via subcutânea apenas PBS. Antes e após as inoculações os grupos foram pesados diariamente e tiveram seus pesos registrados durante 7 dias, após 24 e 48 horas da inoculação, observamos uma diminuição do peso dos animais exceto para os animais inoculados por via intraperitoneal, animais que receberam crotamina aquecida a 100 °C e animais controle, ver **Figura 18**. A diminuição do peso dos animais indica atividade tóxica da crotamina até o terceiro dia quando os animais atingem o peso inicial. No final da prova todos os grupos apresentaram um ganho de peso acima de 60 % quando comparado com o peso ganho pelo grupo controle, não havendo mortes quando utilizada a dose de 2  $\mu$ g/animal, onde a crotamina se mostrou atóxica em todos os ensaios, tal como mostrado na **Figura 18**. A crotamina aquecida a 100 °C por 10 minutos se mostrou atóxica quando comparada com a crotamina nativa (Figura 23 C).

Nosso interesse em destoxificar a crotamina é investigar se ela continuará com sua atividade CPP e continuará atuando no retardamento na formação de tumores *in vivo*, onde poderemos administrar doses mais elevadas de 1 µg por animal, objetivando uma melhor eficácia neste tipo de tratamento.

Figura 18. Ganho de peso em camundongos.



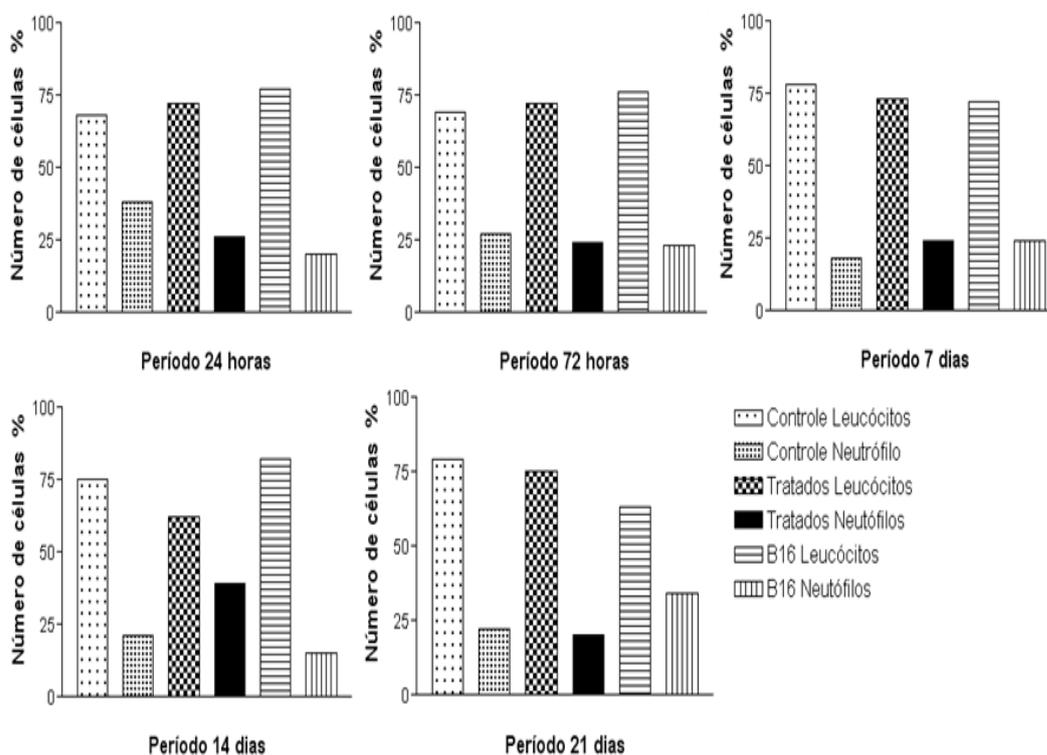
A) 2  $\mu$ g de crotamina inoculadas por via ip ( $\Delta$ ), sc ( $\diamond$ ) e sc aquecida 56°C por 30 min. ( $\nabla$ ) e controle ( $\circ$ ). B) 2  $\mu$ g de crotamina inoculadas por via sc ( $\Delta$ ) e sc aquecida 80°C por 30 min. ( $\nabla$ ) e controle ( $\circ$ ). C) 2  $\mu$ g de crotamina inoculadas por

via sc ( $\Delta$ ) e sc aquecida 100°C por 10 min. ( $\nabla$ ) e controle ( $\circ$ ). FONTE: Pereira (2011)

#### 4.7 Análise de sangue periférico dos camundongos tratados ou não com crotamina

Elementos sanguíneos não apresentaram qualquer alteração estatisticamente significativa nos camundongos de ambos os grupos tratados com crotamina ou não tratados, após 24 e 72 horas, bem como 7, 14 e 21 dias. Os soros, referentes a estes períodos, e a partir do sétimo dia, foram avaliados por ELISA e não apresentaram taxas de anticorpos (dados não mostrados). Ambos resultados mostraram que a crotamina na dose utilizada não interferiu nos elementos do sistema sanguíneo, ou seja nas células mononucleares e polimorfosnucleares bem como no sistema imunológico.

**Figura 19. Análise de mononucleares e polimorfosnucleares durante o tratamento dos camundongos implantados com células B16-F10.**



Contagem diferencial de mononucleares e polimorfosnucleares. Durante o tratamento com crotamina onde após a primeira dose de crotamina, 1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , os animais foram sangrados 24 e 72 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias, e a contagem diferencial de leucócitos e neutrófilos foram realizadas, em sangue periférico. FONTE: Pereira (2011)

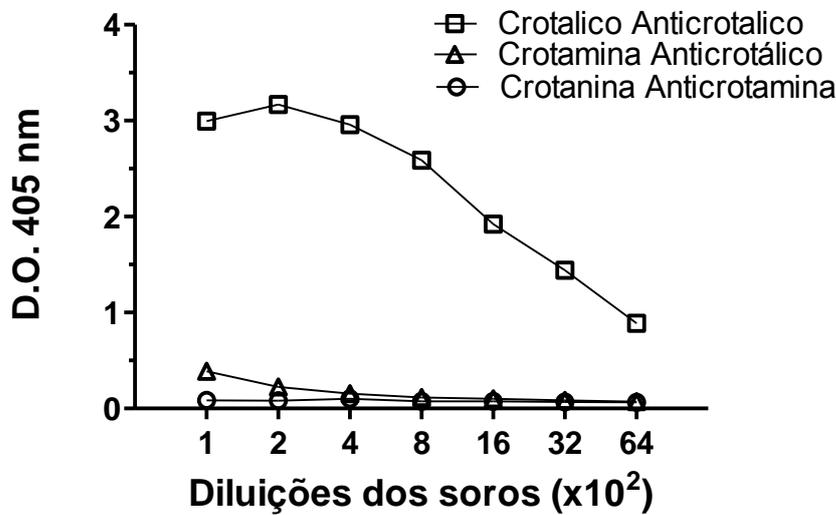
Durante o tratamento com crotamina, onde após a primeira dose os animais foram sangrados 24 e 72 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias, e a contagem diferencial de leucócitos e neutrófilos foram realizadas, em sangue periférico, observamos que até o 7º dia, após as inoculações, o número de leucócitos e neutrófilos, no grupo de camundongos que receberam apenas crotamina e no grupo que foram implantados células B16 F10 e ainda tratados com crotamina diariamente, não apresentaram diferenças entre os números de leucócitos e neutrófilos, quando comparados com os animais controle, tratados apenas com PBS. No 14º dia houve uma diminuição no número de leucócitos e um aumento do número de neutrófilos, para os animais tratados com crotamina, neste mesmo período observamos um aumento do número de leucócitos e uma redução no número de neutrófilos, nos animais implantados com B16-F10. Para o 21º dia o número de leucócitos estava próximo do normal e neutrófilos ainda um pouco abaixo do normal, para os animais tratados com crotamina. Para os animais implantados os leucócitos diminuíram abaixo do normal e o número de neutrófilos ultrapassou os níveis normais.

**Figura 19.**

#### **4.8 Avaliação de anticorpos contra a crotamina e veneno bruto *Crotálico*.**

Tomamos o cuidado de avaliarmos a formação de anticorpos contra a crotamina, nos animais tratados por 21 dias, onde percebemos que os mesmos não possuíam anticorpos. Baseados nesses resultados, resolvemos induzir anticorpos contra a crotamina, utilizando-se protocolos clássicos de imunizações e sangrias. Em paralelo, e da mesma forma imunizamos camundongos com o veneno bruto de *C. d. terrificus* extraídos de várias serpentes. A **Figura 20** mostra a resposta imunológica contra os antígenos utilizados frente aos seus respectivos antissoros. Avaliamos também o antissoro anticrotálico contra o antígeno crotamina. Podemos observar a formação de anticorpos contra o veneno bruto crotálico, mas não anticorpos contra a crotamina. O antissoro anticrotálico reconheceu a antígeno crotamina **Figura 20**. Após a utilização de fármacos derivados de origem animal, estes podem ao longo do tempo induzir formação de anticorpos contra a própria droga, sendo assim o organismo reduz a ação desses fármacos, para impedir que o mesmo atinja o seu alvo e ser rapidamente eliminado do organismo. Um dos problemas de drogas anticâncer, são os efeitos colaterais pouca permanência dentro das células e indução de anticorpos.

Figura 20. Soros antiveneno bruto de *C. d. terrificus* e anticrotamina, analisados por ELISA.



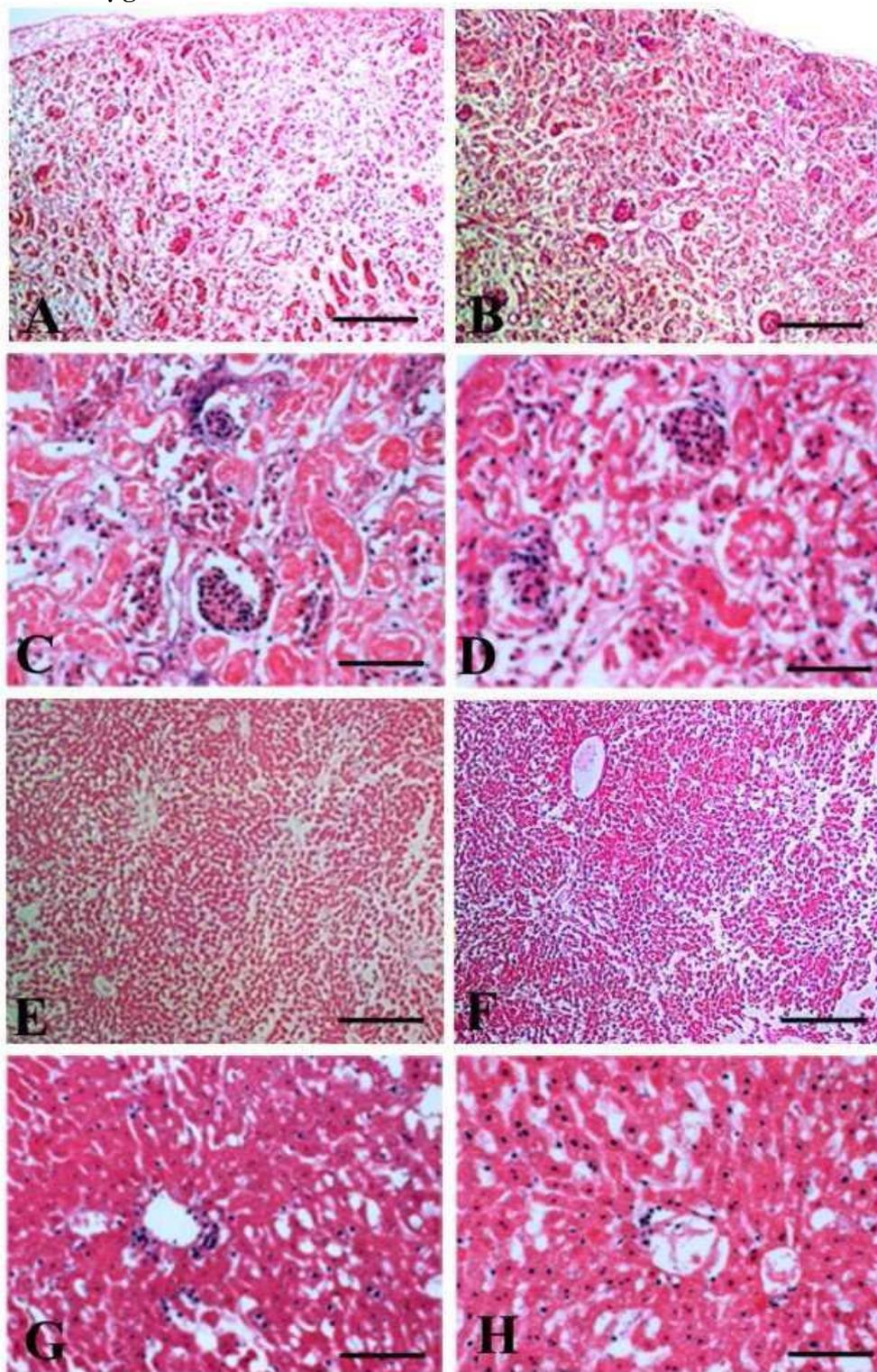
Mostra a análise por ELISA dos soros de camundongos imunizados com veneno bruto crotálico (□) e fração crotamina (○) frente aos respectivos antígenos. Soro anticrotálico analisado frente ao antígeno fração de crotamina (△) diluídos a partir de 1:100 na razão 2. Como controles foram utilizados soros negativos. FONTE: Pereira (2011)

#### 4.9 Exame histopatológico

A fim de avaliar os possíveis efeitos colaterais, inerentes ao tratamento com crotamina a longo prazo, cortes histológicos dos tecidos destes camundongos foram avaliados e nenhuma alteração patológica foi observada, nos rins e fígados dos animais do grupo tratado com crotamina (**Figura 21**).

Não foram observadas diferenças morfológicas entre os tecidos isolados de camundongos normais e tratados com crotamina.

Figura 21. Estudos histopatológicos dos tecidos dos camundongos dos grupos controle e tratados com 1 µg diária de crotamina.



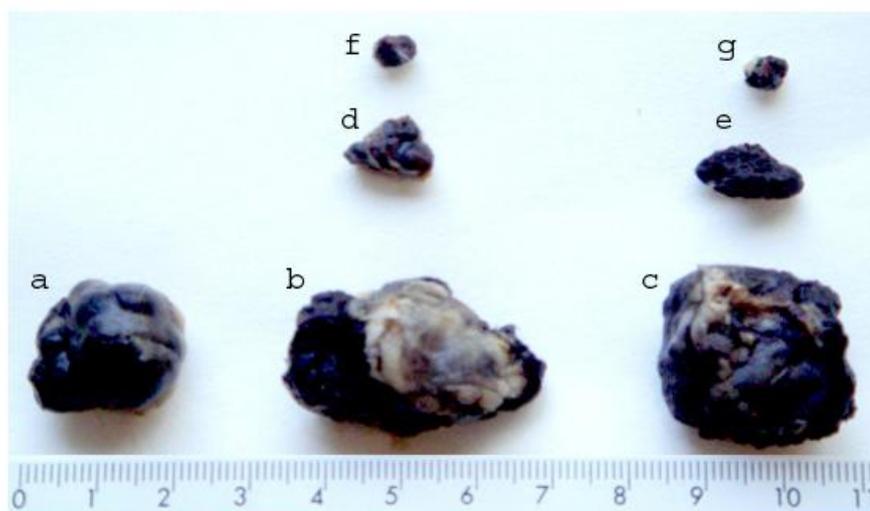
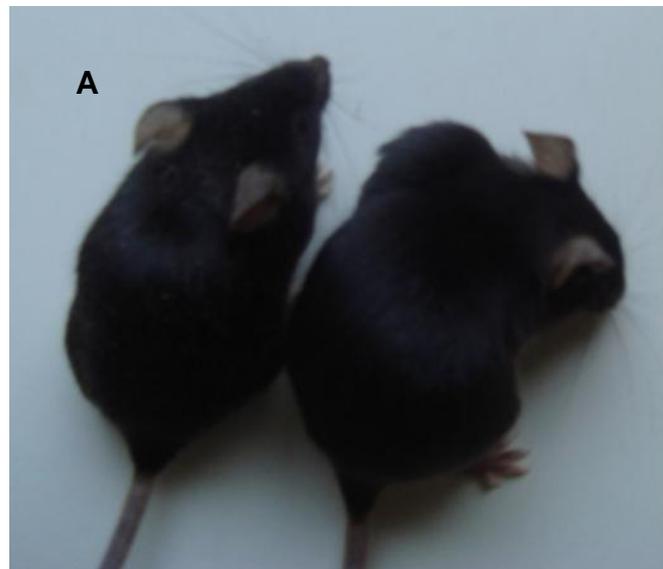
Cortes histológicos corados com HE, em microscopia de luz. **A)** Tecido renal normal, 200 µm; **B)** tecidos renais tratados com crotamina, 200 µm. **C, D)** mesmo que em **(A, B)** apresentados em escala, 50 µm. **E)** Tecido hepático normal, 200 µm; **F)** tecidos hepáticos tratados com crotamina, 200 µm. **G, H)** o mesmo que em **(E, F)** apresentado em escala, 50 µm. Escala em bars. FONTE: Pereira (2011)

#### 4.10 Efeito da crotamina *in vivo* em células B16-F10

O efeito da crotamina, sobre o crescimento *in vivo* das células B16-F10, também foi estudado. Os resultados obtidos nos dois grupos experimentais estão apresentados na Tabela 2. Cada grupo foi composto por 35 animais e ambos os grupos receberam por via subcutânea, ( $10^5$ /mL) células de B16 F10, sendo iniciado o tratamento com crotamina. Além disso, o tratamento começou no mesmo dia após a implantação das células B16 F10 sendo que cada camundongo no grupo tratado recebeu, por via subcutânea, doses diárias de crotamina contendo  $1 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  PBS ( $2 \mu\text{M}$ ) durante 21 dias. No grupo não tratado, que recebeu apenas placebo, os tumores começam a se desenvolver entre 14 e 16 dias após a inoculação e, no 24º dia, os tumores apresentavam-se maiores quando comparados com o grupo tratado com crotamina (**Figura 22 A**, **Tabela 2**). Dez camundongos morreram nos dias 18-19, 18 camundongos morreram nos dias 23-24 e 7 camundongos do mesmo grupo permaneceram vivos no 25º dia (Tabela 2). O peso médio do tumor, no grupo não tratado, foi de aproximadamente 4,60 g (**Tabela 2**, **Figura 22 B**). Os camundongos do grupo tratado com crotamina mostraram um atraso na implantação de melanomas, com um máximo de ocorrência entre os dias 19-21, quando os tumores puderam ser detectados em 16 animais. No entanto, estes tumores eram muito pequenos e apenas após cuidadosa inspeção dos locais de inoculação pode-se detectar "grãos" do tumor. Neste grupo, cinco animais morreram durante o tratamento, enquanto 28 sobreviveram até o 25º dia (**Tabela 2**). O peso médio do tumor no grupo tratado com crotamina foi de aproximadamente 0,27 g (**Tabela 2**, **Figura 18 B**). Dois camundongos neste grupo não apresentaram formação de tumor, observados após o tratamento por 40 dias.

Os 35 animais que receberam células B16-F10 apresentaram melanomas, sendo 14 no 14º dia, 7 animais no 15º dia e 14 animais no 16º dia. Perfazendo um total de 100% de implantes positivos. Estes dados foram de extrema importância para validar a comparação dos grupos não tratados e tratados. Os animais que receberam B16-F10 e tratados com  $1 \mu\text{g}$  de crotamina diariamente, apresentaram melanomas no 17º dia, 9 animais no 19º dia, 3 animais no 20º dia, 3 animais no 21º dia, 10 animais no 24º dia, 2 animais no e 1 animal no 25º dia. Sendo assim, dois animais não apresentaram formação de tumor, os quais foram acompanhados durante 63 dias após a inoculação de B16-F10, representando 6% de não implantados.

**Figura 22. Efeito da rotamina em camundongos implantados com células B16-F10, peso efeito.**



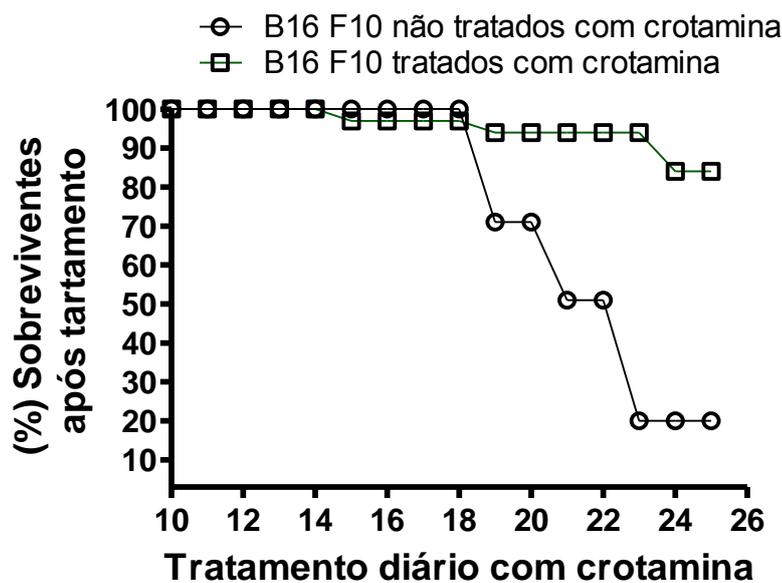
**A)** Camundongos 21 dias após a injeção (s.c.) com células B16-F10: à esquerda, camundongo tratado com crotonina (s.c.), à direita, camundongos apresentando tumor (grupo não tratado). **B)** Os tumores isolados de camundongos sem tratamento (a-c) e tratados com crotonina (d-g). FONTE: Pereira (2011)

**Tabela 2. Efeito de 1 µg/animal de crotamina sobre a progressão do tumor.** Avaliação do desenvolvimento dos tumores. Após 21 dias de tratamento os animais, tratados e não tratados, foram eutanasiados e os tumores removidos e pesados. O tratamento com crotamina durou 21 dias. O atraso da implantação do tumor e redução da mortalidade foi observado para o grupo tratado com crotamina quando comparados ao grupo controle não tratado. O peso médio do tumor no grupo não tratado foi 4,60 g, enquanto no tratado com crotamina, foi de apenas de 0,27 g, quando detectados. FONTE: Pereira (2011)

Células B16F10 Após infecção em dias	Grupo injetado com células B16-F10				Grupo injetado com células B16-F10 tratados com crotamina			
	No. implantes Tumor	Mortalidade No. Camundongos	Sobrevi-da No. Camundongos	Tumor peso média (g)	No. implantes Tumor	Mortalidade No. Camundongos	Sobrevi-da No. Camundongos	Tumor peso média (g)
14	14							
15	7				1	1		
16	14							
17					8			
18		4				1		
19		6			3			
20					3	1		
21				4.60	10			0.27
22								
23		7						
24		11			2	2		
25					1			
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>28</b>	<b>7</b>		<b>28</b>	<b>5</b>	<b>30</b>	

Na **Figura 23** os resultados foram avaliados pelo teste probabilístico de sobrevida global de Kaplan Meier utilizado para calcular a fração de animais vivos, em tratamento por determinado período de tempo em dias. Nossos dados sugerem que os camundongos do grupo tratado com crotamina apresentam uma taxa maior de sobrevida quando comparados com o grupo não tratado (**Figura 23**). Camundongos do grupo tratado com crotamina foram mantidos vivos por mais 40 dias após o término do tratamento. Após este período, os tumores cresceram muito devagar e apresentaram aumento significativo no tamanho (dados não mostrados). FONTE: Pereira (2011)

Figura 23. Teste de probabilidade de sobrevivência de Kaplan Meier.

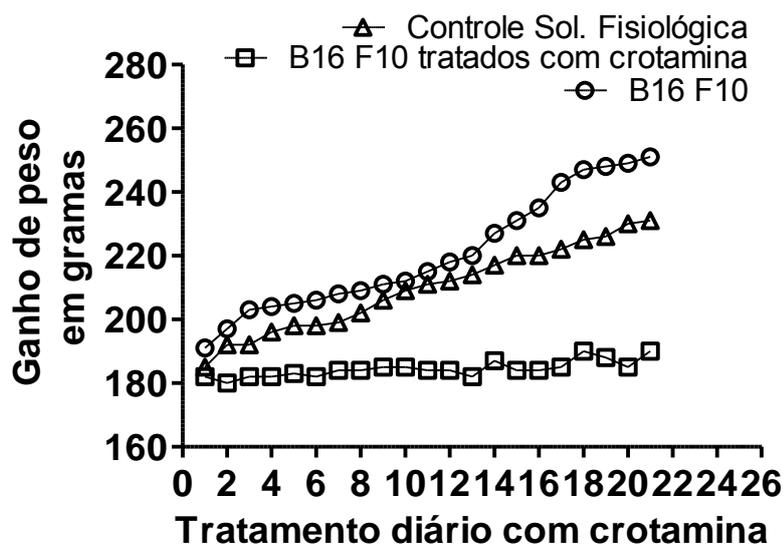


Route of Survival - Teste de Kaplan Meier

O número de animais sobreviventes foram analisados pelo teste probabilístico de sobrevivência global por Kaplan Mayer, onde os animais vivos no final do tratamento com crotamina, foi de aproximadamente 85%. Sem tratamento com crotamina foi limitado a cerca de 20%. FONTE: Pereira (2011)

Os pesos dos camundongos, a partir de ambos os grupos experimentais e um grupo controle composto por animais normais, foram avaliados diariamente, durante 26 dias. Os pesos dos animais do grupo controle aumentaram conforme o esperado. Os animais do grupo não tratado com os tumores em progressão apresentaram, a partir do 14º dia, notável ganho de peso quando comparados com o grupo controle, e os do grupo tratado com crotamina apresentaram peso estável e/ou baixa variação do peso (**Figura 23**).

Figura 24. Ganho de peso dos animais durante o tratamento com crotamina.



Varição do peso observado em camundongos normais ( $\Delta$ ), implantados e tratados com crotamina ( $\square$ ) e o grupo implantados e não tratados ( $\circ$ ). Cada grupo compunha 10 animais com o peso entre 16 a 18g e do mesmo sexo. FONTE: Pereira (2011)

A toxicidade específica mostra que a crotamina, na dose avaliada, é tóxica para camundongos até 24 horas após a inoculação e atóxica no final de sete dias. Outro resultado importante aqui apresentado é que no tipo de tratamento estabelecido a crotamina não induziu formação de anticorpos contra a crotamina e também não alterou as células sanguíneas. Estes resultados mostram que a crotamina, na dose por nós estabelecida, poderá ser uma candidata a ser utilizada em estudos experimentais *in vivo* em vários tipos de câncer. A crotamina como todas as toxinas de origem animal, pode variar suas atividades biológicas *in natura*, bem como após procedimentos de purificação.

## 5 DISCUSSÃO

O estudo da crotamina no Instituto Butantan teve início no começo da década de 50, sendo a crotamina o primeiro peptídeo cujas atividades biológicas e farmacológicas foram demonstradas. Isso nos faz pensar na importância das pesquisas com venenos de serpentes, tanto no âmbito nacional como internacional realizadas até então. A produção e pesquisa de antissoros, bem como, a formulação de novos fármacos baseada na investigação dos mecanismos de ação dos venenos e toxinas, tem muito contribuído para a Saúde Pública. Em 2004, pesquisadores deste Instituto, mostraram que crotamina é uma molécula que se apresenta como um peptídeo célula penetrante, ou seja, que pode penetrar no interior das células. Desde então, vem se descobrindo novas atividades biológicas da crotamina, e os resultados aqui apresentados mostram que a crotamina ainda esconde seus segredos. Os recursos naturais do Brasil são uma fonte inesgotável de novas espécies, bem como, novas peçonhas, que podem permitir para os pesquisadores desenvolver idéias inovadoras e originais. O Instituto Butantan, mesmo investigando somente uma pequena parcela desses recursos naturais do Brasil, beneficia os entusiastas pesquisadores desta Instituição.

Sendo um peptídeo célula penetrante, a crotamina tem potencial de carregar outras moléculas, por exemplo, plasmídeos de DNA ou drogas antitumorais no interior das células. Ainda mais, a crotamina é capaz se associar com outras moléculas, para exercer ação conjunta com droga(s), inserindo medicamentos no interior das células. A eficiência da crotamina depende da sua ação seletiva para células em divisão e de concentração. Investigando a ação de diferentes concentrações de crotamina sobre os tipos celulares diferentes, descobrimos que em altas concentrações ( $>10 \mu\text{M}$ ) a crotamina exerce um efeito citotóxico em células normais e tumorais (Kerkis A et al., 2004). No entanto, em baixas concentrações sub tóxicas ( $<10 \mu\text{M}$ ), é inócua para células normais e se comporta como um típico CPP, pelo qual pode ser utilizada como uma molécula carreadora (Kerkis A et al., 2004; Nascimento FD et al., 2007; Hayashi MA et al., 2008). Utilizando como modelo de estudo as células tronco-embrionárias (*Embryonic Stem Cells* - ES), que apresentam *in vitro* alta capacidade proliferativa, descobrimos que a crotamina penetrou preferencialmente em células em proliferação ativa e de divisão rápida. As células ES são normais, mas são capazes de gerar teratomas, que são tumores benignos de células germinativas. A crotamina não

apresentou toxicidade para as células ES, nem para embriões de camundongos nas mesmas concentrações (Kerkis A et al., 2004; Nascimento FD et al., 2007). Desenvolvemos uma hipótese de que células de tumores malignos, as quais têm alta capacidade proliferativa, possam também ser alvos seletivos do efeito tóxico da crotamina. Esta observação, além de nossas descobertas anteriores, justifica a utilização de crotamina como uma sonda para diagnóstico rápido para diversos tipos de cânceres e tumores de crescimento rápido e agressivo. Para explorar esta idéia, foram desenvolvidos experimentos com cultivos de células CHO-K1 tumorigênica. Curiosamente, as concentrações não tóxicas de crotamina, as quais foram utilizadas em células normais, incluindo as células ES, mostraram-se tóxicas para as células CHO-K1. A crotamina induziu a morte de células CHO-K1 que ocorreu após a internalização endocítica da crotamina, seguida pelo acúmulo em endossomos ácidos nas vesículas lisossomais e, seu rompimento com a liberação dos cisteína-proteases, assim como as catepsinas (Nascimento FD et al., 2007; Hayashi MA et al., 2008).

Demonstramos que a crotamina é um peptídeo catiônico versátil que possui propriedades funcionais e estruturais similares a ambos peptídeos células penetrantes - CPPs e peptídeos catiônicos antimicrobianos - CAPs, também conhecidos como peptídeos antimicrobianos - PAMs. A crotamina torna esse peptídeo equivalente a outros peptídeos antimicrobianos, em termos de funcionalidades convergentes em relação as suas atividades anticancerígenas. Semelhante a crotamina peptídeo antimicrobiano magainin tem sua atividade antitumoral *in vitro*, que desencadeia apoptose de leucemia promielocítica humana em células HL-60. A morte celular induzida pelo magainin ocorre através da liberação de citocromo C, acompanhada por um aumento substancial na atividade do proteassomo. A magainina também exerce atividade citotóxica e antiproliferativa contra células de câncer de bexiga, mas não contra células murinas normais ou fibroblastos humanos (Cruz-Chamorro L et al., 2006). Tem sido sugerido que vários CPPs conseguem distinguir entre tecido normal e maligno, porém esta associação parece estar restrita as células endoteliais e do sistema linfático, mas não a uma vasta gama de células malignas (Taylor et al., 2009). Ao contrário, nossas publicações (Kerkis et al., 2004; Kerkis et al., 2006; Nascimento et al., 2007; Hayashi et al., 2008) demonstraram a capacidade de penetração da crotamina em uma ampla gama de células e atividade anti-proliferativa para células tumorais.

Atualmente, a toxicidade seletiva da crotamina contra células de câncer é o principal foco de nossos interesses em pesquisa e resultados obtidos em modelo de melanoma murino *in vivo* têm sido promissores, na visão do desenvolvimento de agentes anti-proliferativos, a partir de toxinas peptídicas animais (Yamane T et al., 2006). Demonstramos que crotamina é citotóxica para as células B16-F10, SK-Mel-28 e Mia Paca-2 em provas *in vitro* nas concentrações de 1,0 µg/mL (0,2µM) e 5,0 µg/mL (1 µM), onde induziu a lise das células, porém quando a crotamina foi utilizada, nas mesmas concentrações, em células da linhagem 3T3, não foram observados efeitos citotóxicos (**Figuras 10, 11 e 12**). Desta forma foi mostrado que crotamina apresenta citotoxicidade específica para células tumorais, sem qualquer efeito visível sobre as células normais utilizadas neste trabalho. Uma vez que estas linhagens celulares não foram utilizadas em nossos estudos verificamos a sua penetração no interior das células B16-F10. Conforme esperado, observamos a sua distribuição no citoplasma e localização no núcleo em células B16-F10. Quando foi testada penetração da crotamina nas células que foram injetadas no animal e formaram o tumor *in vivo*, a mesma se acumulou no interior da massa tumoral que se encontra em crescimento assim como traçou a invasão metastática das células B16-F10 em tecidos normais. Este achado sugere o seu possível uso como um agente de imagem latente e marcador de metástase em organismo vivo **Figura 17**. Ao mesmo tempo realizamos os estudos histológicos dos diversos tecidos de camundongo para avaliar o possível efeito colateral da sua atividade citotóxica nos tecidos normais. Este estudo histológico não revelou nenhuma anormalidade morfológica nos tecidos isolados de animais tratados com crotamina, confirmando que a crotamina não é tóxica para as células e tecidos normais, sendo que nenhuma alteração foi detectada no peso corporal dos animais, bem como mortes, nas doses utilizadas durante o tratamento.

O presente trabalho sugere, que a crotamina é capaz de distinguir preferencialmente entre diferentes tipos de células normais e as cancerígenas com alta taxa proliferativa. Atualmente, um dos fatores limitantes para um tratamento bem sucedido com quimioterápicos é justamente a falta de drogas com toxicidade seletiva contra tumores, sem provocar danos nas células saudáveis, eliminando assim os efeitos colaterais graves para os pacientes. Outro problema é o mecanismo de resistência celular as drogas. Drogas antitumorais podem ser inativadas dentro das células e serem transportadas para fora das mesmas antes que elas atinjam o alvo intracelular e exerçam suas ações (Fehrenbacher N & Jaattela M, 2005; Boya P & Kroemer G, 2008; Almeida PF &

Pokorny A, 2009). Para superar a falta de seletividade e especificidade antitumoral para as células, vários domínios de transdução de proteína dos CPPs têm sido explorados para desenvolver macromoléculas antitumorais e estratégias de distinção entre tumor e tecido normal, particularmente para o câncer de mama (Harada H et al., 2006). Do ponto de vista estrutural e funcional, a crotamina é única, pois possui duas atividades CPPs e CAPs (Radis-Baptista GE et al., 2008; Auvynet C et al., 2009; Zhu WL et al., 2009; Henriques ST et al., 2006; Oguiura N et al., 2005; Pazgier M et al., 2006). É importante salientar que crotamina é um peptídeo extremamente estável e não é facilmente degradada em soluções (Nicastro G et al., 2003; Fadel V et al., 2005).

Ainda não está completamente compreendido como a crotamina inibe o desenvolvimento de células tumorais. Nós demonstramos que, tanto com células normais como em células tumorais CHO-K1, o processo de captação de crotamina ocorre essencialmente da mesma maneira. Este processo é iniciado pela ligação aniônica com a crotamina na superfície celular ao heparan sulfato, seguido por endocitose mediada por clatrina e, finalmente, pela liberação intracelular dos endossomos ácidos. Neste ponto, vale ressaltar que a crotamina 5  $\mu\text{M}$  não apresentou toxicidade para as células normais, mas induz a lise de células tumorais. Em tais concentrações, aumenta a permeabilidade da membrana lisossomal, levando a fuga de cisteína-proteases lisossomais para o citoplasma da célula. A ativação da caspase-3 pela catepsina, indica que o lisossomo é um dos principais efetores intracelulares de crotamina. As células tumorais podem ser menos resistentes a permeabilização do compartimento lisossomal (Nascimento et al., 2007; Hayashi et al., 2008; Fehrenbacher et al., 2005; Boya e Kroemer, 2008). A toxicidade tumor-seletivo da crotamina, bem como de alguns outros CAPs pode ser explicada pela composição eletrostática e diferenças de potencial entre as membranas das células normais e cancerígenas. As células cancerígenas apresentam um maior nível de expressão de inúmeras moléculas aniônicas (Sanderson, 2001). HSPG é uma das células da superfície contendo moléculas com capacidade conhecida de organizar os processos de adesão em células tumorais. Nós reportamos que, para ter acesso ao citoplasma a crotamina liga-se ao HSPG. (Nascimento et al., 2007). Curiosamente, muitos dos CAPs são CPPs seletivos com atividade citolítica (Zhu et al., 2009; Henriques et al., 2006). Portanto, CAPs naturais e sintéticos podem ser desenvolvidos em drogas antitumorais altamente seletivas, pois vários deles exibem estereoespecificidade de encaixe com a droga

receptora (Nicolas e Rosenstein, 2009). Além disso, as propriedades de CAPs e CPPs podem coexistir dentro de uma única sequência peptídica, podendo proporcionar uma vantagem adicional para o desenvolvimento de agentes anti-proliferativos em células de mamíferos (Nicolas e Rosenstein, 2009; Schweizer, 2009; Henriques et al., 2006). Recentemente, Rádis-Baptista e colaboradores optaram pela minimização estrutural da crotamina, preparando dois peptídeos derivados sintéticos, que exibem uma localização preferencial pelo núcleo e nucléolo, (Radis-Baptista GE et al., 2008). Comparando-se a ação de ambos, crotamina nativa e estes peptídeos sintéticos, em vários tipos de células de tumor, provas *in vitro e in vivo*, poderá se abrir um leque de possibilidades em pesquisas clínicas, que permitirão um melhor entendimento dos mecanismos da crotamina, principalmente quanto a sua toxicidade seletiva e suas derivações sobre células cancerígenas.

Mais ainda, as potencialidades da crotamina dentro da física intrínseca, e propriedades biológicas, derivadas de seu esqueleto estrutural e multi-funcionalidade, se apresentam como atividades de célula penetrante, antimicrobiana e anti-proliferativa. Devido à toxicidade seletiva para as células tumorais, mostrada neste estudo, a crotamina fornece um modelo molecular para a geração de novas terapêuticas bem toleradas, com o mínimo de efeitos colaterais e indesejáveis. A crotamina poderá translocar para dentro de células cancerígenas, pequenas sequência de materiais genéticos, que uma vez incorporados ao genoma, poderá impedir a duplicação das células.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho pretendem elucidar ainda mais as atividades biológicas da crotamina, até então estudadas.

1. Nesta linha de pesquisa encontramos uma nova atividade para este peptídeo, ainda não observada, que é a marcação das células tumorais *in vivo* pela crotamina.
2. Assim sendo, observamos a indução da morte celular por crotamina em células tumorais *in vitro*.
3. Confirmamos a presença de crotamina dentro de células de melanomas murinos *in vitro* e *in vivo*.
4. Estabelecemos uma dose de tratamento diário em camundongos implantados, mostramos sua toxicidade específica para camundongos, bem como a ação da crotamina em retardar a formação de tumores e prolongar o tempo de vida dos animais implantados com melanomas.

## REFERÊNCIAS\*

Almeida PF, Pokomy A. Mechanisms of antimicrobial, cytolytic, and cell- penetrating peptides: from kinetics to thermodynamics. *Biochemistry*. 2009;48:8083-93.

Amaral CFS, Magalhães RA, Rezende NA, Pedrosa TMG. A fibrogenemia secundária e acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Ver. Inst. Med Trop*. 1988, 30: 288-292.

Amaral CFS, Magalhães RA, Rezende NA. Comprometimento respiratório secundário e acidente ofídico crotálico. *Rer Inst Med Trop*. 1991;33:251-5.

Amaral CFS, Rezende NA, Silva AO. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico: Análise de 63 casos. *Rer Inst Med Trop*. 1986;28:220-7.

Auto HJF. *Crotalus*. In: -----Animais Peçonhentos. 2º edição ed. Maceió; Ed. UFAL; 2008. P.22-6.

Auvynet C, Rosenstein Y. Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. *FEBS J*. 2009;276:6497-08.

Azevedo-Marques MM, Hering SE, Cupo P. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. *Toxicon*. 1985, 23: 631-636.

Barrabin H. et al. Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: Rosemberg P. *Toxins animals plant and microbial*. New York: Pergamon Press, 1978.

Becker S, Terlau H. Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2008, 79: 1-9.

Bieber AL, McParland RH, Becker RR. 'Amino acid sequences of myotoxins from *Crotalus viridis concolor* venom. *Toxicon* 1987, 25:677-80.

Bicalho AFX, Mascarenhas YP, Craievich AF, Laure CJ. SAXS study of the structure and conformational changes of crotamine. *Biophys. J*. 1995, 47: 33-5.

Batista TCA. Estudo de populações de *Crotalus durissus collilineatus* Amaral, 1926 crotamina-positivo no estado de Goiás. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995.

Birrell GW, Earl ST, Wallis TP, Masci PP, de Jersey J, Gorman JJ, Lavin MF. The diversity of bioactive proteins in Australian snake venoms. *Mol. Cell. Proteomics* 2007, 6: 973-86.

Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 2008; 27:6434-6451.

De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform fro manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Avalieble from: [HTTP://www.icmje.org/2007](http://www.icmje.org/2007) may 22.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Ministério da Saúde. Ed Brasília; 2001.

Brooks NA, Pouniotis DS, Tang C-K, Apostolopoulos V, Pietersz GA. Cell-penetrating peptides: Application in vaccine delivery. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010, 1805:25–34.

Cameron DL, Tu AT. Chemical and functional homology of myotoxin from prairie rattlesnake venom and crotamine from South American rattlesnake venom. *Biochim Biophys Acta* 1978, 532:147-54.

Cardoso JL.....[et al.]. Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos: ----- Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2º edição Ed. -- São Paulo: SARVIER, 2009.

Chang CC, Tseng KH. Effect of crotamine, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. *Br J Pharmacol* 1978, 63:551-9.

Cheymol J, et al. Comparison of the neuromuscular action of crotamine and the venom of *Crotalus durissus terrificus* var. *Crotaminicus*. *Toxicon*. 1971, 9: 279-286.

Chuah, M.K., Collen, D., Vanden-Driessche, T. Biosafety of adenoviral vectors. *Curr. Gene Ther* 2003, 3:527-543.

Console S, Marty C, Garcia-Echeverria C, Schwendener R, Ballmer-Hofer K. Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 2003, 278:35109-14.

Cruz-Chamorro L, Puertollano MA, Puertollano E, de Cienfuegos GA, de Pablo MA. In vitro biological activities of magainin alone or in combination with nisin. *Peptides* 2006, 27:1201-9.

Dal Pai V, Neto HS. Ação dos venenos sobre os tecidos animais. In: Barravieira B. Venenos animais. Uma visão integrada. São Paulo: Publicações Científicas 1994.

Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 1994, 269:10444-50.

Dilber MS, Phelan A, Aints A, Mohamed AJ, Elliott G, Smith CI & O'Hare P. Intercellular delivery of thymidine kinase prodrug activating enzyme by the herpes simplex virus protein, VP22. *Gene Ther* 1999, 6:12-21.

Drin G, Cottin S, Blanc E, Rees AR, Temsamani J. Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J Biol Chem* 2003, 278:31192-201.

Easton DM, Nijnik A, Mayer ML, Hancock RE. Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives. *Trends Biotechnol* 2009; 27:582-590.

Elliott G. & O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 1997, 88:223-233.

Estrada G, Villegas E, Corzo G, Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Nat. Prod. Rep* 2007, 24:145-61.

Fadel V, Bettendorff P, Herrmann T, de Azevedo WF Jr, Oliveira EB, Yamane T, Wuthrich K. Automated NMR structure determination and disulfide bond identification of the myotoxin crotamine from *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 2005; 46:759-767.

Fehrenbacher N, Jaattela M. Lysosomes as targets for cancer therapy. *Cancer Res*, 2005; 65:2993-2995.

Ferrari A, Pellegrini V, Arcangeli C, Fittipaldi A, Giacca M. & Beltram F. Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time. *Mol. Ther* 2003, 8:284-294.

Fischer R, Waizenegger T, Kohler K, Brock R. A quantitative validation of fluorophore-labelled cell-permeable peptide conjugates: fluorophore and cargo dependence of import. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1564: 365–374.

Floriano RS. Estudo clínico e laboratorial da intoxicação experimental pelo veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* em ratos *Wistars* tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* [dissertação]. São Paulo:Universidade do Oeste de Presidente Prudente; 2008.

Foged C, Nielsen HM. Cell-penetrating peptides for drug delivery across membrane barriers. *Expert Opin Drug Deliv* 2008, 5:105-117.

Ford KG, Darling D, Souberbielle B., Farzaneh F. Protein transduction: a new tool for the study of cellular ageing and senescence. *Mech. Ageing Dev* 2000, 121:113-121.

Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 1988, 55:1189-93.

Fry BG. From genome to "venome": molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Res*. 2005, 15: 403-20.

Futaki S. Membrane permeable peptide vectors: chemistry and functional design for the therapeutic applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2008, 60:447-614

Futaki, S. Arginine-rich peptides: potential for intracellular delivery of macromolecules and the mystery of the translocation mechanisms. *Int. J. Pharm* 2002, 245:1-7.

Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003, 3:710-20.

Garlanda C, Dejana E. Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997, 17:1193-202.

Gonçalves JM, Arantes, E.G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras III—Determinação quantitativa de crotamina no veneno de cascavel Brasileira. *An Acad Bras Cienc* 1956, 28:369-71.

Gonçalves JM, Vieira LG. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras I. Análise eletroforética. *An Acad Bras Cienc* 1950, 22:141-50.

Gump JM, Dowdy SF. TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects. *Trends Mol Med* 2007, 13:443-8.

Gutiérrez JM, Cerdas L. [Mechanism of action of myotoxins isolated from snake venoms]. *Rev Biol Trop.* 1984, 32:213-22.

Habermann E. [Extraction and properties of crotactin, phospholipase A, crotamine and toxin III from the venom of the Brazilian rattlesnake.]. *Biochem Z.* 1957; 329:405-15.

Harada H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M. Antitumor protein therapy; application of the protein transduction domain to the development of a protein drug for cancer treatment. *Breast Cancer.* 2006;13:16-26.

Hayashi MA, Nascimento FD, Kerkis A, Oliveira V, Oliveira EB, Pereira A, et al. Cytotoxic effects of crotamine are mediated through lysosomal membrane permeabilization. *Toxicon.* 2008; 52:508-17.

Henriques ST, Melo MN, Castanho MA, Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? *Biochem J;* 2006; 399:1-7.

Herce, HD, Garcia, AE. Cell Penetrating Peptides: How Do They Do It? *J Biol Phys.* 2007; 33:345–356.

Hoskin DW, Ramamoorthy A, Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1778:357-375.

Irvine AS, Trinder PK, Laughton DL, Ketteringham H, McDermott RH, Reid SC, Haines AM, Amir A, Husain R, Doshi R, Young LS, Mountain A. Efficient nonviral transfection of dendritic cells and their use for in vivo immunization. *Nat Biotechnol.* 2000; 18:1273-1278.

Järver, P., Langel, U. Cell-penetrating peptides—A brief introduction. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2006; 260–263.

Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19:491-511.

Joanne P, Nicolas P, El Amri C. Antimicrobial peptides and viral fusion peptides: how different they are? *Protein Pept Lett.* 2009;16:743-750.

Joliot A, Pernelle C, Deagostini-Bazin H, Prochiantz A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88:1864-1868.

Joliot A, Prochiantz A. Homeoproteins as natural Penetratin cargoes with signaling properties. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60:608-13.

Joliot A, Prochiantz A. Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat Cell Biol.* 2004; 6:189-196.

Jones AT. Gateways and tools for drug delivery: endocytic pathways and the cellular dynamics of cell penetrating peptides. *Int J Pharm.* 2008; 354:34-8.

Jones SW, Christison R, Bundell K, Voyce CJ, Brockbank SM, Newham P. & Lindsay MA. Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. *Br. J. Pharmacol.* 2005; 145:1093-1102.

Jorge MT, Ribeiro LA. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Ver. Ass.Méd.Brs.* 1990; 36: 66-77.

Kabouridis, P.S. Biological applications of protein transduction technology. *Trends Biotechnol.* 2003; 21:498-503.

Kelen EMA, Rosenfeld G, Nudel F. Hemolytic activity of animal venoms. II. Variation in relation to erythrocyte species. *Mem Inst Butantan.* 1960-62; 30: 133-42.

Kerkis A, Hayashi MA, Yamane T, Kerkis I. Properties of cell penetrating peptides (CPPs). *IUBMB Life.* 2006; 58:7-13.

Kerkis A, Kerkis I, Rádis-Baptista G, Oliveira EB, Vianna-Morgante AM, Pereira LV, Yamane T. Crostamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *FASEB J.* 2004, 18:1407-9; \*\* This work reported for the first time cell penetrating capacity of crostamine and his ability to bind to centrioles and DNA.

Kerkis I, Silva Fde S, Pereira A, Kerkis A, Rádis-Baptista G. Biological versatility of crostamine - a cationic peptide from the venom of a South American rattlesnake. *Expert Opin Investig Drugs.* 2010; 19(12):1515-25.

Kosuge M, Takeuchi T, Nakase I, Jones AT, Futaki S. Cellular internalization and distribution of arginine-rich peptides as a function of extracellular peptide concentration, serum, and plasma membrane associated proteoglycans. *Bioconjug Chem.* 2008; 19:656-64.

Laure CJ, Bettendorff P, Herrmann T, de Azevedo WF, Jr., Oliveira EB, Yamane T, et al. Automated NMR structure determination and disulfide bond identification of the myotoxin crostamine from *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon.* 2005; 46:759-67. \* Decifration of crostaimine three dimensional structure.

Laure CJ. [The primary structure of crostamine (author's transl)]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1975; 356:213-5.

Lehrer RI, Ganz T. Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol.* 2002, 14:96-102.

Lundberg P, El-Andaloussi S, Sütülü T, Johansson H. & Langel U. Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides. *FASEB J.* 2007; 21: 2664-71.

Mackessy SP (editor). *Handbook of venoms and toxins of reptiles.* CRC Press. Boca raton, FL-USA. 2009.

Mäe M, Langel U. Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Curr Opin Pharmacol.* 2006; 6:509-514.

Mäe M, Langel U. Intracellular delivery of protein and peptide therapeutics *DDT* 5(2):e95-e103, 2008.

Mancin AC, Soares AM, Andriao-Escarso SH, Faca VM, Greene LJ, Zuccolotto S, et al. The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. *Toxicon.* 1998; 36:1927-37.

Martin A, O'Hare P, McLauchlan J, Elliott G. Herpes simplex virus tegument protein VP22 contains overlapping domains for cytoplasmic localization, microtubule interaction, and chromatin binding. *J Virol.* 2002; 76:4961-70.

Murtauch RT, Kaplan PM. *Veterinary emergency and critical care medicine.* Missouri: Mosby year book. 1992; 685.

Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Snyder EL, Ho A, Latham DG, Lissy NA, Becker-Hapak M, Ezhevsky SA, Dowdy SF. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med.* 1998; 4:1449-52.

Nascimento FD, Hayashi MA, Kerkis A, Oliveira V, Oliveira EB, Radis-Baptista G, et al. Crotamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem.* 2007; 282:21349-60. \*\* This work reported the mechanism of crotamine cellular uptake.

Nedelkov D, Bieber AL. Characterization of the two myotoxin isomers from the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) by capillary zone electrophoresis and fluorescence quenching studies. *Toxicon.* 1997; 35:689-98.

Nicastro G, Franzoni L, de Chiara C, Mancin AC, Giglio JR, Spisni A. Solution structure of crotamine, a Na<sup>+</sup> channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Eur J Biochem.* 2003; 270:1969-79. \* Decifration of crotamine three dimensional structure.

Nicolas P, Rosenstein Y. Multifunctional host defense peptides. *FEBS J.* 2009; 276 :6464.

Nishioka SA, et al. South American rattlesnake bite and soft-tissue infection: Report of a case. *Rev Soc Bras Med Trop. Incl Trop Dis.* 2000; 33: 401-2.

Oguiura N, Boni-Mitake M, Radis-Baptista G, New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom, *Toxicon.* 2005; 46:363-370.

- Oguiura N, Camargo ME, da Silva AR, Horton DS. Quantification of crotamine, a small basic myotoxin, in South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by enzyme-linked immunosorbent assay with parallel-lines analysis. *Toxicon*. 2000; 38:443-8.
- Oguiura N, Collares MA, Furtado MF, Ferrarezzi H, Suzuki H. Intraspecific variation of the crotamine and crotasin genes in *Crotalus durissus* rattlesnakes. *Gene*. 2009; 446:35-40.
- Okamoto M, Prado-Franceschi JP, Ribeiro LA. Induction of tolerance to crotoxin in mice. *J Pharmacol. Exp Ther*. 1983; 265: 41-46.
- Ouellette AJ. Defensin-mediated innate immunity in the small intestine. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004; 18:405-19.
- Ownby CL, Aird S, Kaiser II. Physiological and immunological properties of small myotoxins from the venom of the midget faded rattlesnake (*Crotalus viridis concolor*). *Toxicon*. 1988; 26:319-323.
- Patel LN, Zaro JL, Shen WC. Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives. *Pharm Res*. 2007; 24:1977-92.
- Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J. Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63:1294-1313.
- Phelan A, Elliott G. & O'Hare P. Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. *Nat Biotechnol*. 1998; 16:440-3.
- Pieters RJ, Arnusch CJ, Breukink E. Membrane permeabilization by multivalent anti-microbial peptides. *Protein Pept Lett*. 2009;16:736-42.
- Pinho FMO, Pereira ID. Ofidismo. *Rev Ass Med Brasil*. 2001; 47: 24-9.
- Ponce-Soto LA, Martins-de-Souza D, Marangoni S. Structural and pharmacological characterization of the crotamine isoforms III-4 (MYX4\_CROCu) and III-7 (MYX7\_CROCU) isolated from the *Crotalus durissus cumanensis* venom. *Toxicon*. 2010, 55:1443-52.
- Poon GM, Gariépy J. Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells. *Biochem Soc Trans*. 2007; 35(Pt 4):788-93.
- Pouton CW, Wagstaff KM, Roth DM, Moseley GW, Jans DA. Targeted delivery to the nucleus. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007; 59:698-717.
- Puig J, Vilafranca M, Font A. Acute intrinsic renal failure and blood coagulation disorders after a snake bite in dog. *J Small Anim Pract*. 1995; 36: 333-336.
- Pujals S, Fernandez-Carneado J, Lopez-Iglesias C, Kogan MJ, Giralt E. Mechanistic aspects of CPP-mediated intracellular drug delivery: relevance of CPP self-assembly. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1758:264-79.
- Räägel H, Säälík P, Pooga M. Peptide-mediated protein delivery—which pathways are penetrable? *Biochem Biophys Acta*. (2010); 1798(12):2240-8.

Rádis-Baptista G, de la Torre BG, Andreu D. A novel cell-penetrating peptide sequence derived by structural minimization of snake toxin exhibits preferential nucleolar localization. *J Med Chem.* 2008; 51:7041-4. \*\* Synthesis of crotamine derivatives which retain its in vitro and in vivo properties.

Rádis-Baptista G, Kerkis A, Da Silva ARP, Hayashi MAF, Kerkis I, Yamane T. Membrane-translocating peptides and toxins: from nature to bedside. *J Braz Chem Soc* 2008; 19:211-25.

Rádis-Baptista G, Kubo T, Oguiura N, Svartman M, Almeida TM, Batistic RF, et al. Structure and chromosomal localization of the gene for crotamine, a toxin from the South American rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon.* 2003; 42:747-52. \* Crotamine gene chromosome localization.

Rádis-Baptista G, Oguiura N, Hayashi MA, Camargo ME, Grego KF, Oliveira EB, et al. Nucleotide sequence of crotamine isoform precursors from a single South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon.* 1999; 37:973-84. \*\* First time crotamine DNA sequence characterization.

Richard JP, Melikov K, Vives E, Ramos C, Verbeure B, Gait MJ, et al. Cell-penetrating peptides. A re-evaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem.* 2003; 278:585-90.

Rizzi CT, Carvalho-de-Souza JL, Schiavon E, Cassola AC, Wanke E, Troncone LR. Crotamine inhibits preferentially fast-twitching muscles but is inactive on sodium channels. *Toxicon.* 2007; 50:553-62.

Roodeted AR, Dolab JA, Segre L. Fisiopatología Y diagnóstico Del ataque por serpientes venenosas. Una breve actualización. 1996; 77: 64-71.

Rosenfeld G, Kelen EMA, Nudel F. Hemolytic activity of animal venoms. I. Classification in different types and activities. *Mem Inst Butantan.* 1960-62; 30:103-16.

Samejima Y, Aoki Y, Mebs D. Amino acid sequence of a myotoxin from venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *Toxicon.* 1991; 29:461-8.

Sanderson RD. Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. *Semin Cell Dev Biol.* 2001;12:89-98.

Schenberg S. Geographical pattern of crotamine distribution in the same rattlesnake subspecies. *Science.* 1959; 129:1361-3.

Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC. Human defensins. *J Mol Med.* 2005; 83:587-95.

Schweizer F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. *Eur J Pharmacol.* 2009; 625:190-4.

SilveiraUS, Diniz MRV, Santos SM. Distribuição geográfica das serpentes *Crotalus durissus* variedades crotamina-positiva nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. *Memórias do instituto Butantan.* 1990; 52: 66.

Sitaram N, Nagaraj R, The therapeutic potential of host-defense antimicrobial peptides. *Curr Drug Targets*. 2002; 3:259-267.

Sorkin A, Von Zastrow M. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3:600-14.

Straight RC, Glenn JL, Wolf MC. Regional difference in content of small basic peptide toxins in the venoms of *Crotalus adamanteus* and *Crotalus horridus*. *Comp Biochem Physiol*. 1991; 100B:51-8.

Stewart KM, Horton KL, Kelley SO. Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Org Biomol Chem*. 2008; 6:2242-55.

Stewart KM, Kersemans K, Cornelissen B. Cell penetrating peptides for in vivo molecular imaging applications. *Curr Pharm Des*. 2008; 14:2415-47.

Suda T, Arai F, Hirao A. Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends Immunol*. 2005; 8:426-33.

Suzuki T, Futaki S, Niwa M, Tanaka S, Ueda K, Sugiura Y. Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *J Biol Chem*. 2002; 277:2437-43.

Taylor BN, Mehta RR, Yamada T, Lekmine F, Christov K, Chakrabarty AM, Green Albert, Bratescu L, Shilkaitis A, Beattie CW, Gupta TKD. Noncationic peptides obtained from Azurin preferentially enter cancer cells. *Cancer Res*. 2009; 69: 537-46.

Taylor K, Barran PE, Dorin JR. Structure-activity relationships in beta-defensin peptides. *Biopolymers*. 2008; 90:1-7.

Torchilin VP, Rammohan R, Weissig V, Levchenko TS. TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:8786-91.

Torres AM, Kuchel PW. The beta-defensin-fold family of polypeptides. *Toxicon*. 2004; 44:581-8.

Toyama MH, Marangoni S, Novello JC, Leite GB, Prado-Franceschi J, da Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L. Biophysical, histopathological and pharmacological characterization of crotamine isoforms F22 and F32. *Toxicon*. 2003; 41:493-500.

Ulrich H, Colli W, Ho PL, Faria M, Trujillo CA. *Bases moleculares da biotecnologia*. 1 ed. São Paulo: Roca. 2008.

Vendeville A, Rayne F, Bonhoure A, Bettache N, Montcourrier P, Beaumelle B. HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses. *Mol Biol Cell*. 2004; 15:2347-60.

Vieira AC. Ação de vários agentes sobre o efeito paralisante dos membros posteriores induzido pela crotamina em camundongos. *Biosci.J. Uberlandia*. 2006, 22:125-32.

Vital Brazil O. Pharmacology of crotamine. *Mem Inst Butantan*. 1990; 52:23-4

Vital Brazil O. Neurotoxins from the South American Rattlesnake.Venom J Formos Med Assoc. 1972; 71: 294-400.

Vivès E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. J Biol Chem. 1997; 272:16010-17.

Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. Nat Med. 2004; 10: 310-5.

Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A, Clamp, M. and Barton, G. J. (2009). "Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench".Bioinformatics. 25 (9):1189-1191.

Yamane T, Kerkis I, Kerkis A et al., Use of crostamine, kit and composition.WO2006096953 (2006).

Yeaman MR, Yount NY. Unifying themes in host defence effector polypeptides. Nat Rev Microbiol. 2007; 5:727-40.

Yesylevskyy S, Marrink S-J, Mark AE. Alternative Mechanisms for the Interaction of the Cell-Penetrating Peptides Penetratin and the TAT Peptide with Lipid Bilayers Biophysical Journal. 2009; 97:40-49.

Yount NY, Kupferwasser D, Spisni A, Dutz SM, Ramjan ZH, Sharma S, Waring AJ, Yeaman MR. Selective reciprocity in antimicrobial activity versus cytotoxicity of hBD-2 and crostamine. Proc Natl Acad Sci. USA 2009; 106:14972-7.\*\* Crostamine characterization as a cationic antimicrobial peptide and potassium channel ligant.

Yount NY, Yeaman MR. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. Proc Natl Acad Sci. USA. 2004; 101:7363-8.

Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms.Nature. 2002; 415:389-95.

Zhao M. & Weissleder R. Intracellular cargo delivery using tat peptide and derivatives. Med Res Rev. 2004; 24:1-12.

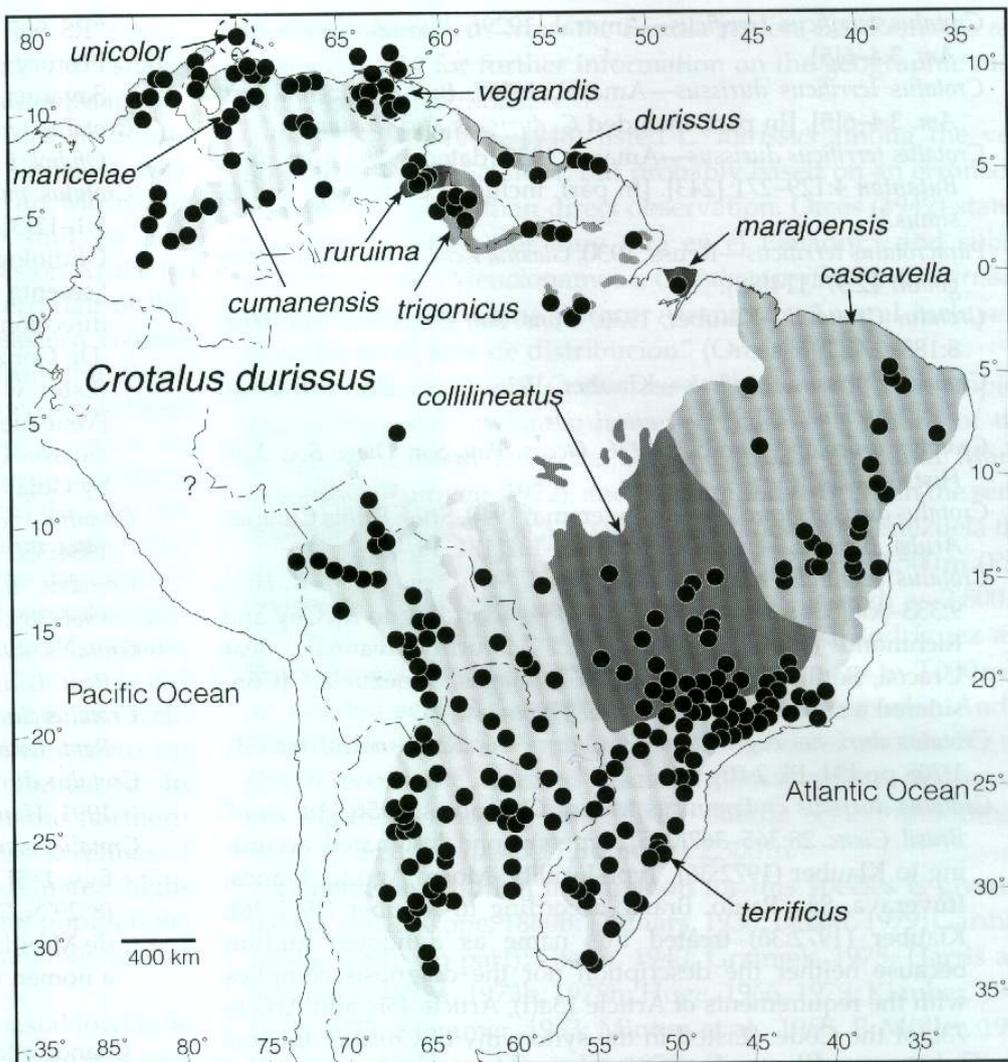
Zhu WL, Hahm KS, Shin SY.Cell selectivity and mechanism of action of short antimicrobial peptides designed from the cell-penetrating peptide. Pep-I, J Pept Sei. 2009;15:569-575.

Ziegler A, Blatter XL, Seelig A, Seelig J. Protein transduction domains of HIV-1 and SIV TAT interact with charged lipid vesicles. Binding mechanism and thermodynamic analysis.Biochemistry. 2003; 42:9185-94.

Zorko M, Langel U. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. Adv Drug Deliv Ver. 2005;57:529-45.

## ANEXO I

### Distribuição de subspecies de *Crotalus durissus* no Hemisfério Sul.



CAMPBELL, Jonathan A.; LAMAR, William W.  
The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere.  
Ithaca: Comstock Pub. Associates, 2004. Volume II: pages 477-774.

## ANEXOS II

**Publicações específicas com o tema Crotamina, durante o período de Pós-Graduação em Doutorado, fevereiro de 2008 a fevereiro de 2012.**

**I) Cytotoxic effects of crotonamine are mediated through lysosomal membrane permeabilization.**

Hayashi MAF, Nascimento FD, Kerkis A, Oliveira V, Oliveira EB, Pereira A, Rádis-Baptista G, Helena BN, Yamane T, Kerkis I, Tersariol ILS.

**ISSN 0041-0101 Citações 8.**

**Toxicon, 2008; 52;508-17. Fator de impacto 2.742**

**II) Biological versatility of crotonamine - a cationic peptide from the venom of a South American rattlesnake.**

Kerkis I, Silva Fde S, Pereira A, Kerkis A, Rádis-Baptista G.

**Expert Opin Investig Drugs. 2010, 19(12):1515-25.**

[http://www.researchgate.net/journal/1744-7658\\_Expert\\_Opinion\\_on\\_Investigational\\_Drugs](http://www.researchgate.net/journal/1744-7658_Expert_Opinion_on_Investigational_Drugs)

Identificação: ( Nº ISSN ou ISBN) **1354-3784**

**Citações 1**

**Fator de impacto 4.218**

**III) Crotonamine toxicity and efficacy in mouse models of melanoma.**

Alexandre Pereira, Alexandre Kerkis, Mirian Hayashi, Aparecida Pereira, Fernando Silva, Eduardo Oliveira, Alvaro Prieto da Silva, Tetsuo Yamane, Gandhi Radis-Baptista, Irina Kerkis.

**Expert Opin Investig Drugs. 2011, 20(9):1189-1200.**

DOI: **10.1517/13543784.2011.602064**

[http://www.researchgate.net/journal/1744-7658\\_Expert\\_Opinion\\_on\\_Investigational\\_Drugs](http://www.researchgate.net/journal/1744-7658_Expert_Opinion_on_Investigational_Drugs)

Identificação: ( Nº ISSN ou ISBN) **1354-3784**

**Fator de impacto 4.218**

**IV) The natural cell-penetrating peptide crotamine targets tumor tissue *invivo* and triggers a lethal calcium-dependent pathway in cultured cells"**

Nascimento, Fábio; Sancey, Lucie; Pereira, Alexandre; Rome, Claire; Oliveira, Vitor; Oliveira, Eduardo; NADER, HELENA; Yamane, Tetsuo; Kerkis, Irina; Tersariol, Ivarne; Coll, Jean-Luc; Hayashi, Mirian.

**Molecular Pharmaceutics dx.doi.org/10.1021/mp2000605 | Mol. Pharmaceutics 2012, 9, 211–221**

DOI: 10.1021/mp2000605

[pubs.acs.org/molecularpharmaceutics](http://pubs.acs.org/molecularpharmaceutics)

Identificação: ( Nº ISSN ou ISBN) Manuscript ID: **mp-2011-000605.R2**

**Fator de impacto 5.400**

**Publicações com outros temas, durante o período de Pós-Graduação em Doutorado , fevereiro de 2008 a fevereiro de 2012.**

**V) Bacterial Toxins: An overview on bacterial proteases and their action as virulence factors.**

Lebrun I, Marques-Porto R, Pereira ASP, Pereira A, Perpetuo EA.

**Medical Chemistry, 2009; 9:820-28.**

**VI) Antibody response from whole-cell pertussis vaccine immunized brazilian children against different strains of *Bordetella pertussis*.**

Pereira A, Pereira ASP, Silva CL, Gutemberg MR, Lebrun I, Sant'Ána AO, Tambourgi DV.

**Citações 1**

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene. 2010, 84(4):678-682.

## **VII) Detection of hantaviruses in Brazilian rodents by SYBR-Green-based real-time RT-PCR.**

J. Araujo • A. Pereira • M. S. Nardi • D. A. Henriques • D. A. Lautenschlager • L. M. Dutra • T. L. Ometto • R. F. Hurtado • F. Maue's • A. Nava • F. A. Morais • C. C. Aires • S. Favorito • E. L. Durigon.

Arch Virol. 2011. Received: 27 April 2010 / Accepted: 4 March 2011. Arch Virol DOI 10.1007/s00705-011-0968-1 ISSN 0304-8608.

## **VIII) BOVINE PAPILLOMAVIRUS TYPE 4 L1 GENE TRANSFECTION IN A DROSOPHILA S2 CELL EXPRESSION SYSTEM: ABSENCE OF L1 PROTEIN EXPRESSION BOVINE PAPILLOMAVIRUS TYPE 4 L**

Luiz Gustavo Bentim Góes<sup>1</sup>; Antonio Carlos de Freitas<sup>1,3</sup>; Oilita Pereira Ferraz<sup>1</sup>; Tania Tassinari Rieger<sup>2</sup>; José Ferreira dos Santos<sup>2</sup>; Alexandre Pereira<sup>1</sup>; Willy Beçak<sup>1,2</sup>; Charles J. Lindsey<sup>4</sup>; Rita de Cassia Stocco<sup>1\*</sup>  
Brazilian Journal of Microbiology (2008) 39:1-4. ISSN 1517-8382

## **IX) Anticancer Effects of Synthetic Phosphoethanolamine on Ehrlich Ascites Tumor: An Experimental Study**

ADILSON KLEBER FERREIRA<sup>1,2</sup>, RENATO MENEGUELO<sup>3</sup>, ALEXANDRE PEREIRA<sup>4</sup>, OTAVIANO MENDONCA R. FILHO<sup>5</sup>, GILBERTO ORIVALDO CHIERICE<sup>3</sup> and DURVANEI AUGUSTO MARIA<sup>1</sup>,

**ISSN: 1791-7530**

**DOI: 0250-7005/2012 Fator de Impacto: 1.656**

**ANTICANCER RESEARCH 32: 95-104 (2012)**

## ANEXOS III

### ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS

Aminoácidos Abreviatura de 3 letras Abreviatura de 1 letra

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Acido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Vai	V

# ÍNDICE REMISSIVO

FALSA FOLHA DE ROSTO.....	1
PÁGINA DE ROSTO.....	2
FOLHA DE APROVAÇÃO.....	3
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA.....	4
DEDICATÓRIA.....	5
AGRADECIMENTOS.....	6
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTAS DAS FIGURAS.....	10
LISTAS DAS TABELAS.....	12
LISTAS DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	13
SUMÁRIO.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Características do gênero <i>Crotalus</i> .....	18
Figura 1. <i>Crotalus durissus terrificus</i> .....	19
1.2 Veneno e suas frações.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Cotamina.....	22
Figura 2. Modelo tridimensional da crotamina.....	22
Figura 3. A seqüência de aminoácidos que compõem a molécula de crotamina e comparada com outras proteínas pertencentes à família das miotoxinas.....	24
Figura 4. Potencial eletrostático da superfície da crotamina.....	26

<b>2.2 Variação geográfica do veneno de cascavéis <i>Crotalus durissus</i></b> .....	<b>26</b>
<b>Figura 5. Mapa de distribuição, das variedades dos venenos de <i>Crotalus</i>,</b> .....	<b>27</b>
<b>2.3 O efeito farmacológico da crotamina</b> .....	<b>28</b>
<b>Figura 6. Camundongo paralisado por crotamina</b> .....	<b>29</b>
<b>2.4 A crotamina é um peptídeo célula penetrante (CPP)</b> .....	<b>29</b>
<b>Tabela 1 – Peptídeos célula penetrantes usados para entregas de materiais</b> .....	<b>30</b>
<b>Figura 7. Podemos observar a progressão da crotamina conjugada com Cy-3, no ciclo celular, usando-se sinais fluorescentes</b> .....	<b>33</b>
<b>2.5 Mecanismo de penetração celular da crotamina</b> .....	<b>34</b>
<b>Figura 8. Mecanismo de penetração da crotamina em células por endocitose ou macropinocitose</b> .....	<b>35</b>
<b>2.6 Distribuição da crotamina e seus derivados nos compartimentos celulares</b> .....	<b>36</b>
<b>2.7 Crotamina como agente de transfecção</b> .....	<b>37</b>
<b>2.8 Crotamina é um peptídeo-cisteína estabilizado com atividade antimicrobiana</b> .....	<b>37</b>
<b>OBJETIVO GERAL DO PROJETO</b> .....	<b>39</b>
<b>Figura 9. Fluxograma</b> .....	<b>41</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
<b>Purificação da crotamina</b> .....	<b>42</b>
<b>Cultura de células</b> .....	<b>42</b>
<b>Ensaio de viabilidade celular - Ensaio de MTT</b> .....	<b>43</b>
<b>Ensaio de viabilidade celular – Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo</b> .....	<b>43</b>
<b>Análise de fragmentação de ácidos nucleicos</b> .....	<b>44</b>
<b>Extração de ácidos nucleicos</b> .....	<b>44</b>
<b>Análise de DNA genômico</b> .....	<b>44</b>
<b>Síntese de cDNA por RT-PCR a partir do RNA total</b> .....	<b>44</b>
<b>Microscopia Confocal</b> .....	<b>45</b>
<b>Marcação covalente de crotamina com o corante fluorescente</b> .....	<b>45</b>

Translocação de crotamina <i>in vitro</i> em células B16-F10.....	46
Translocação da crotamina marcada com Cy3.....	46
Translocação da crotamina revelada por imunocitoquímica.....	46
Ensaio de Citometria de fluxo FACS.....	47
Animais Utilizados para Crescimento <i>in vivo</i> das Células B 16 F10 indutoras de melanomas murinos.....	47
Localização intratumoral da crotamina marcada Cy3, ensaio <i>in vivo</i> .....	47
Efeito da Crotamina em controlar o crescimento de células cancerígenas <i>in vivo</i> ..	48
Teste de probabilidade de sobrevivência de Kaplan Meier.....	48
Respostas hematológicas e imunológicas dos camundongos implantados com B16 F10, tratados ou não com crotamina.....	49
A análise histológica dos tecidos de camundongos C57/Bl/6.....	49
Análise Histológica em Cortes congelados.....	49
Prova de ganho de peso em camundongos.....	49
Produção de anticorpos em camundongos anti-Crotamina.....	50
Ensaio Enzimático Imuno Absorção (ELISA).....	50
Estatística.....	51
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>52</b>
Efeito citotóxico da crotamina <i>In vitro</i> .....	52
Figura 10. Ensaio de viabilidade celular - Ensaio MTT.....	53
Figura 11. Ensaio de viabilidade celular, utilizando-se o método Hoechst e Iodeto de propídeo.....	54
Figura 12. Efeito seletivo citotóxico da crotamina em células cancerígenas, dose-dependente.....	55
Translocação <i>in vitro</i> B16-F10 e localização intracelular da crotamina.....	56
Figura 13. Internalização <i>in vitro</i> de crotamina em células B16-F10:.....	57
Figura 14. Crotamina marcada com FITC e antitubulina beta:.....	58
Fragmentação do DNA.....	58
Figura 15. Análise da fragmentação do DNA por PCR.....	59
A) DNA genômico de células B16-F10 tratadas com crotamina.....	59
B) PCR do cDNA do RNA 16S ribossomal de células B16-F10 tratadas com crotamina.....	59

<b>Ensaio de Citometria de fluxo.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 16. Ensaio de Citometria de fluxo.....</b>	<b>61</b>
<b><i>In vivo</i> localização de crotamina em melanomas murinos.....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 17. Crotamina conjugada-Cy3 (2,5 µg/mL) foi confirmada em células de melanoma murino, 24 horas após a injeção, prova <i>in vivo</i>.....</b>	<b>62</b>
<b>Prova de ganho de peso (Toxicidade Específica).....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 18. Ganho de peso em camundongos.....</b>	<b>65</b>
<b>Análise de sangue periférico dos camundongos tratados ou não com crotamina...66</b>	
<b>Figure 19. Análise de mononucleares e polimorfos nucleares durante o tratamento dos camundongos implantados com células B16-F10.....</b>	<b>66</b>
<b>Avaliação de anticorpos contra a crotamina e veneno bruto <i>Crotalico</i>.....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 20. Soros antiveneno bruto <i>C. d. terrificus</i> e anticrotamina analisados por ELISA.....</b>	<b>68</b>
<b>Exame histopatológico.....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 21. Estudos histopatológicos dos tecidos dos camundongos dos grupos controle e tratados com crotamina com 1 µg diária.....</b>	<b>69</b>
<b>Efeito da crotamina <i>in vivo</i> em células B16-F10.....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 22. Efeito da crotamina em camundongos implantados com células B16-F10, peso efeito.....</b>	<b>71</b>
<b>Tabela 2. Efeito de 1 µg/animal de crotamina sobre a progressão do tumor .....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 23. Teste de probabilidade de sobrevivência de Kaplan Meier.....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 24. Ganho de peso dos animais durante o tratamento.....</b>	<b>74</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>O estudo da crotamina.....</b>	<b>75</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS* .....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS I.....</b>	<b>91</b>
<b>Distribuição de subspécies de <i>Crotalus durissus</i> no Hemisfério Sul.</b>	
<b>ANEXO II.....</b>	<b>92</b>

**Publicações durante o período de Pós-Graduação em Doutorado.**

**ANEXO III.....94**

**Abreviaturas dos aminoácidos.**