

Introdução

O envenenamento por serpentes peçonhentas é considerada uma doença tropical negligenciada, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), com milhares de casos anuais no Brasil. A grande maioria destes acidentes ocorre com os gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*. O tratamento padrão é a administração de soro antiofídico, cuja potência, tanto do veneno quanto do próprio soro, é testada em camundongos por meio da determinação da DL50 (dose letal do veneno para 50% dos animais) e da DE50 (dose do soro necessária para proteger 50% dos animais). No entanto, esses testes apresentam limitações éticas, científicas e econômicas, pois geram alta demanda de animais, custos elevados e dificuldades na extrapolação para humanos. Assim, métodos *in vitro* surgem como alternativas promissoras, permitindo maior controle experimental e reprodutibilidade. Neste estudo, a linhagem SH-SY5Y, derivada de neuroblastoma humano, foi utilizada para avaliar a toxicidade do veneno da surucucu (*Lachesis muta*), o qual tem efeito neurotóxico, e a eficácia do soro antilaquéutico, buscando estabelecer um modelo mais ético e eficiente para substituir os testes em animais.

Objetivo

Este estudo visa avaliar a viabilidade do uso da linhagem de neurônios SH-SY5Y como alternativa aos testes de letalidade em camundongos para a determinação da potência do veneno de *Lachesis muta* e da eficácia de soro antilaquéutico.

Métodos

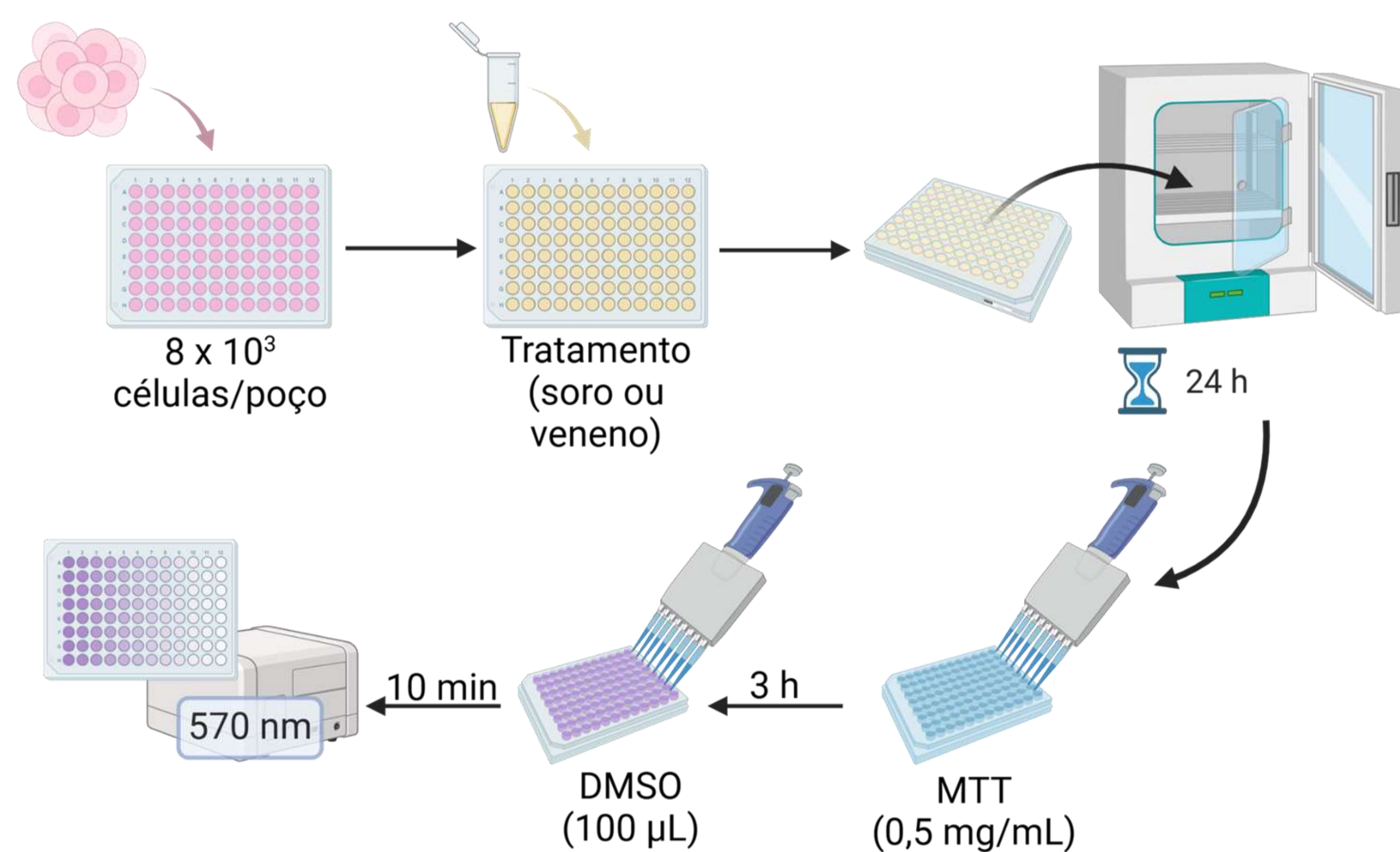


Figura 1: O veneno e o soro de *Lachesis muta* foram testados em culturas de células SH-SY5Y para determinar a citotoxicidade induzida por diferentes concentrações dos tratamentos. As células SH-SY5Y foram cultivadas em meio DMEM-F12, plaqueadas na densidade de 8×10^3 células/poço, tratadas com diferentes concentrações de veneno ou soro de *Lachesis muta* e, após 24 h, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazólio (MTT). 100 µl de solução de MTT foram adicionados a cada poço e incubados por 3 h antes da leitura em espectrofotômetro (570 nm). Os resultados foram analisados por one-way ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey, por meio do programa GraphPad Prism, que também foi usado para calcular a IC50.

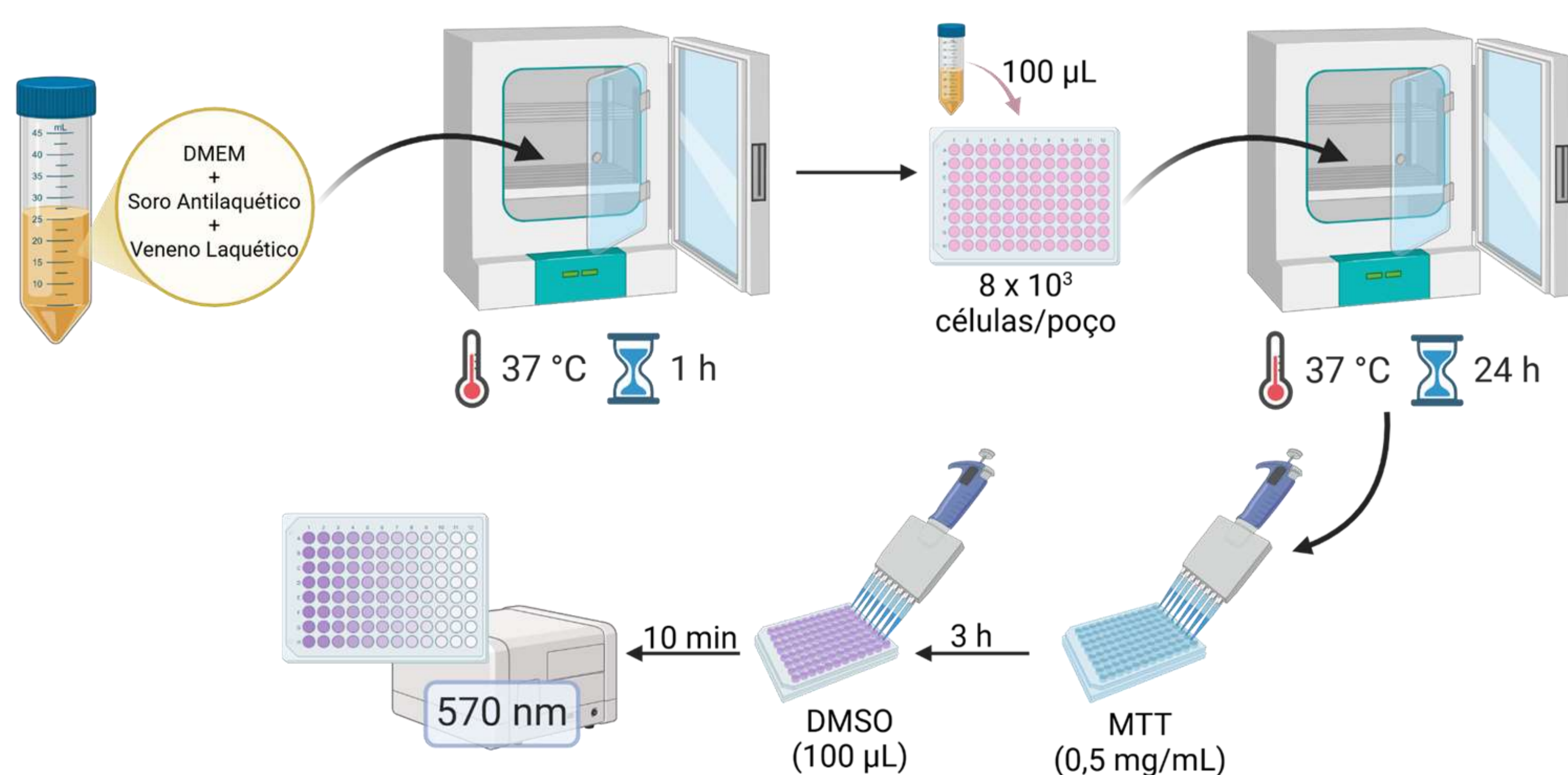


Figura 2: De acordo com a Farmacopéia Brasileira, diferentes concentrações de soro antilaquéutico foram adicionadas a uma dose fixa de veneno de *Lachesis muta* equivalente a $1 \times IC_{50}$ previamente determinada. Estas misturas foram incubadas a 37°C por 1 h. Em seguida, o tratamento foi colocado em células SH-SY5Y de acordo com o protocolo descrito na Figura 1.

Resultados

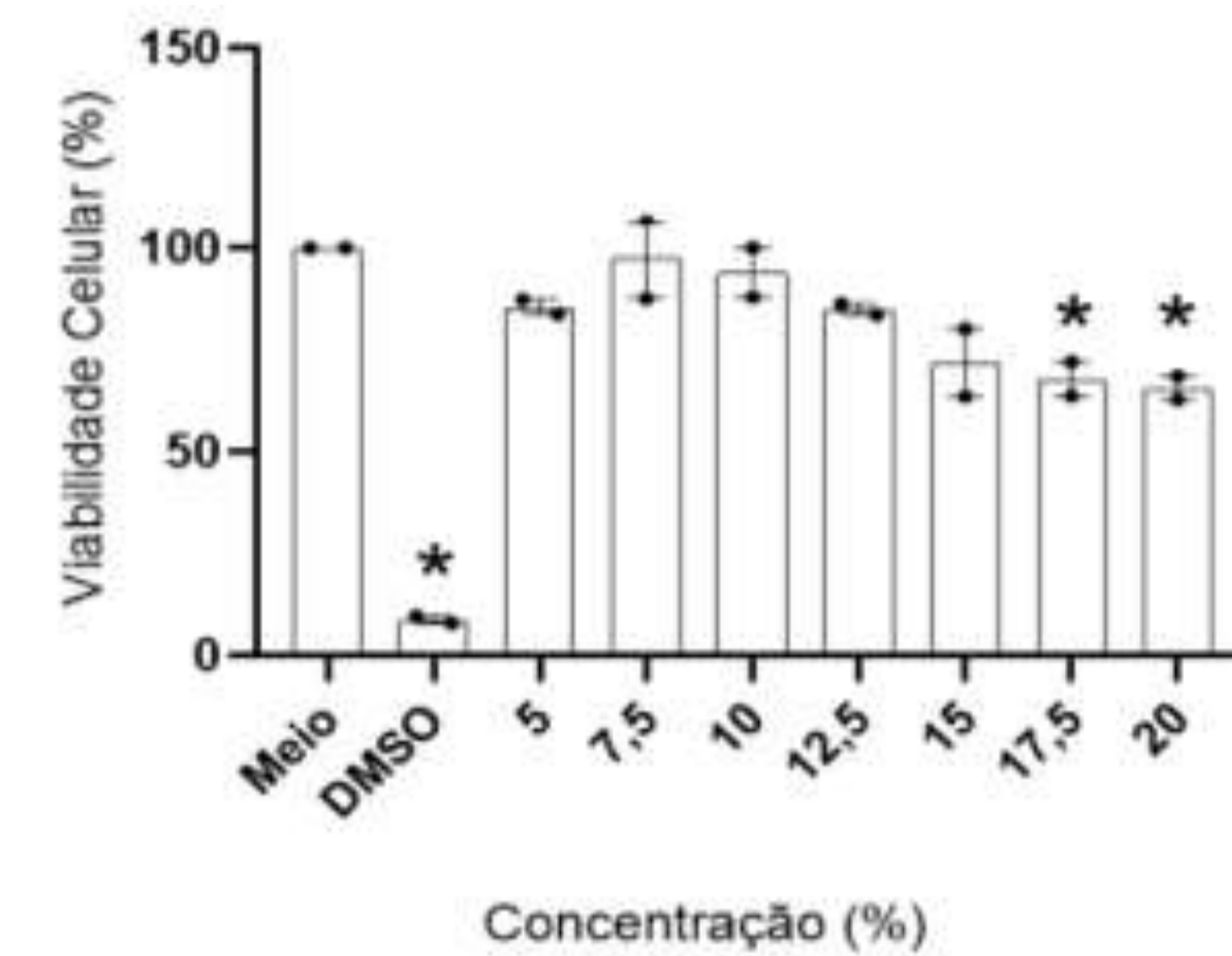


Figura 3: Viabilidade de neurônios SH-SY5Y expostos ao soro antilaquéutico. Pode-se observar diminuição significativa a partir de 17,5% de soro antilaquéutico. * $p < 0.05$ em comparação com as células que foram tratadas apenas com o meio de cultura (DMEM-F12). One-way ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey, $n=2$ em triplicata.

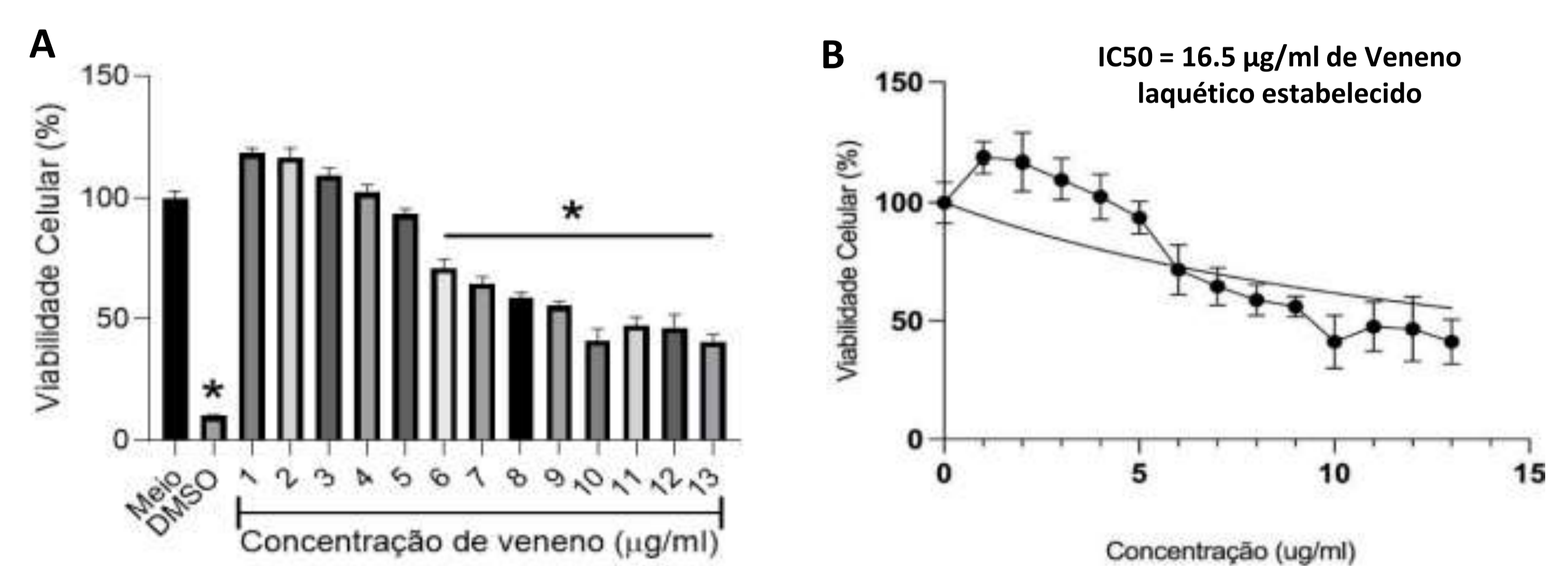


Figura 4: Viabilidade de neurônios SH-SY5Y expostos ao veneno de *Lachesis muta*. (A) Observa-se diminuição significativa na viabilidade celular a partir de $6 \mu\text{g/mL}$. * $p < 0.05$ em comparação com as células que foram tratadas apenas com o meio de cultura (DMEM-F12). One-way ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey, $n=3$ em triplicata. (B) Foi determinada a IC50, por meio de uma curva de regressão não linear, de $16,5 \mu\text{g/mL}$. * $p < 0.05$ em comparação com as células que foram tratadas apenas com o meio de cultura (DMEM-F12). Curva de regressão não linear, $n=3$ em triplicata.

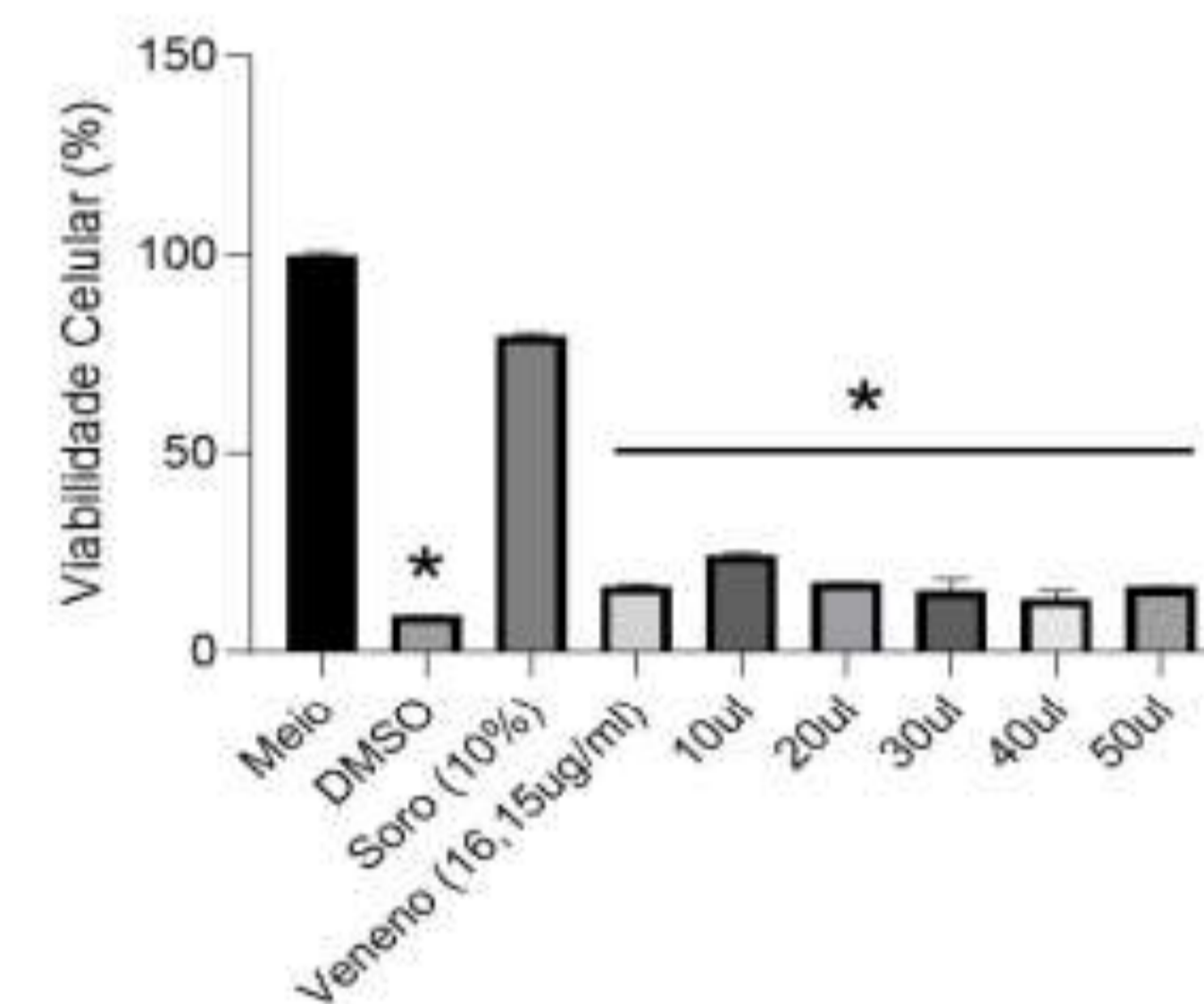


Figura 5: Viabilidade de neurônios SH-SY5Y expostos a uma mistura de veneno de *Lachesis muta* com soro antilaquéutico. Não foi detectada diferença significativa entre as células tratadas apenas com o veneno e com as células tratadas com diferentes diluições de soro somadas a mesma dose de veneno * $p < 0.05$ em comparação com as células que foram tratadas apenas com o meio de cultura (DMEM-F12). One-way ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey, $n=3$ em triplicata

Conclusão

Neste estudo, investigamos a possibilidade de substituir os modelos murinos pela linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y para avaliar a eficácia do soro antilaquéutico e a toxicidade do veneno de *Lachesis muta*. Os resultados obtidos demonstram que o soro antilaquéutico é citotóxico em concentrações acima de 17,5%. O valor determinado para a IC50 do veneno foi $16,5 \mu\text{g/mL}$. No entanto, não foi detectada a neutralização do veneno pelo soro em células SH-SY5Y. Novos estudos são necessários para confirmar a viabilidade do modelo.

Referências

1. ANVISA. Farmacopeia Brasileira. Brasília. 6a Edição. 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/ptbr/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>
2. PERLMAN, Robert L. Mouse models of human disease: An evolutionary perspective. Evolution, medicine, and public health, [s. l.], v. 2016, n. 1, p. eow014, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/EMPH/EOW014>. Acesso em: 29 out. 2024.

Agradecimentos

Gostaríamos de expressar nossa gratidão à Fundação Butantan por seu apoio técnico e logístico e à FAPESP pelo apoio financeiro (2024/04023-0).