

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

Natacha Diesca dos Santos

**Resposta humoral e celular em camundongos AIRmax e AIRmin tratados com
crotoxina de *Crotalus durissus terrificus***

São Paulo

2022

Natacha Diesca dos Santos

**Resposta humoral e celular em camundongos AIRmax e AIRmin tratados com
crotoxina de *Crotalus durissus terrificus***

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para a Saúde-Vacinas e Biofármacos.

Orientador: Orlando Garcia Ribeiro

São Paulo

2022

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

dos Santos , Natacha Diesca

Resposta humoral e celular em camundongos AIRmax e AIRmin tratados com crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* / Natacha Diesca dos Santos ; orientador(a) Orlando Garcia Ribeiro Filho - São Paulo, 2022.

37 p. : il.

Monografia (Especialização) da Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP "Doutor Guilherme de Souza" - Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Crotoxina 2. *Crotalus durissus terrificus* . 3. Inflamação. 4. Imunomodulação I. Ribeiro Filho, Orlando Garcia. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe da Biblioteca do Instituto Butantan

Esta monografia foi elaborada com base no Guia prático para elaboração de trabalho acadêmico desenvolvido pela Biblioteca do Instituto Butantan, de acordo com as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus que me abençoou em todas as coisas e me sustentou durante esta jornada.

Sou grata à minha família por todo o apoio, pela paciência nos momentos difíceis e por me proporcionar um ambiente propício para estudar e me desenvolver.

Ao meu professor orientador Orlando Garcia Ribeiro por me oferecer a oportunidade de aprendizado, pela disponibilidade e por me orientar neste projeto.

À toda a equipe administrativa e técnica do laboratório, bem como do biotério de Imunogenética e demais pesquisadores que contribuíram com o seu trabalho e conhecimento. Especialmente à Bruna Cristina Favoretto, cujo auxílio na execução dos experimentos e orientação foram essenciais para a conclusão deste projeto.

Aos meus colegas de curso e de laboratório pela agradável convivência, pela companhia, compreensão, auxílio e risadas, e também por compartilharem sua experiência.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

RESUMO

DOS SANTOS, Natacha Diesca. **Resposta humoral e celular em camundongos AIRmax e AIRmin tratados com crotoxina de *Crotalus durissus terrificus***, se houver. 2022 37 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para a Saúde-Vacinas e Biofármacos) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

A crotoxina (CTX) é uma proteína presente no veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.t.*), sendo a principal responsável pela sua toxicidade. À essa toxina também são atribuídos a ação imunomodulatória, anti-inflamatória, anti-tumoral e analgésica, apresentando, portanto, grande potencial terapêutico. Neste trabalho, foram utilizados como modelo experimental camundongos AIRmax e AIRmin. Essas linhagens foram fenotipicamente selecionadas com base na intensidade da resposta inflamatória aguda (AIR) máxima ou mínima, mas não diferem na resposta adaptativa, produzindo quantidades equivalentes de anticorpos, nas mesmas condições. Por se tratarem de linhagens heterogêneas, observa-se grande variabilidade na resposta imune e, portanto, constituem um modelo adequado para este estudo. Assim, objetivamos, neste estudo, investigar os efeitos imunomodulatórios da crotoxina na resposta humoral e celular de camundongos das linhagens AIR. Para isso, camundongos AIRmax e AIRmin foram imunizados com 50 µg/mL de HGG (Gama Globulina Humana) adsorvido em hidróxido de alumínio por via subcutânea (s.c.). Em 1h antes ou 72h após a imunização foi administrada por via intraperitoneal (i.p.) 40 µg/kg de peso corporal de crotoxina (obtida do veneno da cascavel *C.d.t.*) que corresponde à 0,5 da DL₅₀ previamente determinada nestas linhagens. Os soros foram obtidos a cada 7 dias, durante 28 dias, a fim de realizar o teste ELISA para detecção de IgG anti-HGG. Em conjunto com esses dados foram conduzidos ensaios de proliferação de esplenócitos e dosagem de citocinas (IL-2, IFN-γ), a fim de avaliar supressão da proliferação. A análise dos resultados obtidos revelou que o tratamento com crotoxina não causou a diminuição na produção de anticorpos nessas linhagens. A capacidade proliferativa e a secreção de citocinas também não sofreram alterações significativas. Portanto consideramos a necessidade de purificar uma nova partida de crotoxina para futuros ensaios de imunossupressão.

Palavras-chave: Crotoxina. *Crotalus durissus terrificus*. Inflamação. Imunomodulação.

ABSTRACT

DOS SANTOS, Natacha Diesca. **Humoral and celular response in AIRmax and AIRmin mice treated with crotoxin from *Crotalus durissus terrificus***. 2022 37 p. Monograph (Specialization in Biotechnology for Health-Vaccines and Biopharmaceuticals) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2022

Crotoxin (CTX) is the most abundant protein present in the venom of the rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.t.*), being the main responsible for its toxicity. The immunomodulatory, anti-inflammatory, antitumor and analgesic action is also attributed to this toxin, presenting, therefore, great therapeutic potential. AIRmax and AIRmin mice were used as an experimental model. These strains were phenotypically selected based on maximal or minimal acute inflammatory response (AIR) intensity, but did not differ in adaptive response, producing equivalent amounts of antibodies, under the same conditions. As they are heterogeneous strains, there is great variability in the immune response and, therefore, they are a suitable model for this study. The aim of this study is to investigate the immunomodulatory effects of crotoxin on the humoral response of mice of the AIR strains. For this, AIRmax and AIRmin mice were immunized with 50 µg/mL of HGG adsorbed on aluminum hydroxide subcutaneously (s.c.). At 1 h before or 72 h after immunization, a dose of crotoxin (obtained from *C.d.t.* rattlesnake venom) was administered intraperitoneally (i.p.). The chosen dose was 40 µg/kg of weight, whose anti-inflammatory effects can be observed. Serum was obtained every 7 days, for 28 days in order to perform the ELISA test for IgG anti-HGG detection. In conjunction with these data, splenocyte proliferation assays and cytokine (IL-2, IFN- γ) assays were carried out in order to assess whether there was cell damage. The analysis of the results obtained revealed that the treatment with crotoxin did not cause a decrease in the production of antibodies in these strains. The proliferative capacity and secretion of cytokines also did not undergo significant changes. Therefore, we consider the need to purify a new batch of crotoxin for future immunosuppression assays.

Keywords: Crotoxin. *Crotalus durissus terrificus*. Inflammation. Immunomodulation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	Cascavéis e a composição do veneno crotálico	8
1.2	Crotoxina	9
1.3	Atividade imunomodulatória da Crotoxina	10
1.4	Camundongos AIRmax e AIRmin como modelo experimental	11
2	OBJETIVOS	13
3	METODOLOGIA	14
3.1	Camundongos	14
3.2	Purificação da crotoxina	14
3.3	Determinação da dose letal (DL ₅₀) da crotoxina via intraperitoneal	15
3.4	Imunização com Gama Globulina Humana (HGG)	16
3.5	Imunização com Ovalbumina de galinha (OVA)	16
3.6	Quantificação de IgG e IgM anti-HGG e anti-OVA no soro por ELISA	17
3.7	Obtenção e proliferação de esplenócitos <i>in vitro</i> por CFSE	18
3.8	Quantificação de citocinas produzidas por esplenócitos <i>in vitro</i>	18
3.9	Análise estatística	19
4	RESULTADOS	20
4.1	Purificação da Crotoxina	20
4.2	Cálculo da DL ₅₀ nas linhagens AIRmax e AIRmin	20
4.3	Efeito da crotoxina na resposta humoral a HGG em AIRmax e AIRmin	21
4.4	Efeito da crotoxina na resposta celular a HGG em AIRmax e AIRmin	22
4.5	Quantificação de citocinas no sobrenadante da cultura de esplenócitos	25
4.6	Efeito da crotoxina na resposta humoral a HGG e OVA em BALB/c	26
5	DISCUSSÃO	28

6 CONCLUSÕES

33

REFERÊNCIAS

34

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cascavéis e a composição do veneno crotálico

As cascavéis, como são popularmente conhecidas no Brasil, são serpentes peçonhentas do gênero *Crotalus* que fazem parte da família das víboras (*Viperidae*). No Brasil, são representadas por uma única espécie, a *Crotalus durissus*. Há ainda outras cinco subespécies: *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella*, *C. d. ruruima* e *C. d. marajoensis* que estão amplamente distribuídas em território brasileiro, habitando principalmente regiões secas (áridas e semiáridas) e de campo aberto, com exceção de pântanos, regiões litorâneas ou cobertas por vegetação de mata atlântica. Em termos de anatomia, são facilmente distinguíveis pela presença do guizo (chocalho) na ponta da cauda que é característico da espécie (PINHO; PEREIRA, 2001).

Figura 1 - *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t)



Fonte: (CHUCAO, 2013)
Cascavel *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t)

O veneno da cascavel possui ação neurotóxica, miotóxica e nefrotóxica, sendo, no entanto, pouco letal. Os sintomas de envenenamento são reversíveis quando administrado o anti-soro em tempo adequado. Apresenta poucas manifestações locais, como edema e eritema moderados, acompanhados de dor

moderada e perda de sensibilidade (parestesia), que pode ser local ou regional (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (BRAZIL), 1998).

Uma análise proteômica dos venenos de serpentes *Crotalus durissus*, residentes na América do Sul e Central, permitiu visualizar alguns de seus componentes mais abundantes, sendo a crotoxina a mais presente. Outros componentes são: enzimas da família das fosfolipases A₂, proteases (serinoproteases, metaloproteases), crotamina (CTM) e, dependendo da região de habitat, lectinas tipo C, L-amino ácido oxidases desintegrinas, cisteínas ricas em proteínas secretoras, além de peptídeos vasoativos, entre outros (BAUDOU et al., 2021; MELANI et al., 2015; TASIMA et al., 2020).

1.2 Crotoxina

A crotoxina é a toxina mais abundante presente no veneno da cascavel, representando cerca de 60% do peso total. Trata-se de uma proteína que apresenta estrutura heterodimérica, sendo constituída por duas subunidades: a crotoxina A (CA) e crotoxina B (CB). Quanto às características físico-químicas, a fração CA corresponde à crotapotina e possui caráter ácido, enquanto CB corresponde à fosfolipase A₂ (PLA₂), de caráter básico. Apenas a CB apresenta atividade enzimática, ao passo que CA atua como molécula carreadora, de maneira que ambas agem em sinergismo. Isto é, uma amplifica a ação da outra, evidenciando a necessidade de interação entre as moléculas, interação esta possibilitada por uma semelhança estrutural, pois a crotapotina é originada a partir de uma proteína da família das fosfolipases A₂ (SAMPAIO et al., 2010).

Estudos buscaram investigar a atividade dessas frações isoladamente. Quanto à CA, em uma publicação em 2003, Garcia e colaboradores demonstraram *in vitro* que CA foi capaz de inibir a proliferação de linfócitos T, induzidos por ConA (concanavalina A) (GARCIA et al., 2003). Porém, ensaios subsequentes, também *in vitro*, mostraram que a adição de crotoxina ou CB, mas não CA, em células dendríticas incubadas com LPS (lipopolissacarídeo) inibiu a proliferação de linfócitos T, bem como a produção de IL-2 (FREITAS et al., 2018). Ou seja, isoladamente, a

fração CB ainda continua a exercer os efeitos descritos para a crotoxina, isto é, apresenta atividade enzimática, enquanto CA não apresenta ação efetiva. Um estudo comparativo dos venenos de três subespécies de *C.d* (*C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus* e *C. d. cascavella*) avaliou também a atividade biológica da crotoxina e frações (CA e CB), sugerindo que a PLA₂ é o principal componente envolvido na atividade biológica da crotoxina. Os resultados mostraram atividade fosfolipásica e miotóxica aumentada para a *C. d. terrificus*, particularmente com a fração CB, associando à enzima aos efeitos tóxicos do veneno (RANGEL-SANTOS et al., 2004a).

1.3 Atividade imunomodulatória da Crotoxina

A crotoxina possui grande potencial terapêutico, apresentando ação imunomodulatória (CARDOSO et al., 2001; FAURE et al., 1996; FAVORETTO et al., 2011; RANGEL-SANTOS et al., 2004b), anti-inflamatória (NUNES et al., 2010), anti-tumoral (CURA et al., 2002) e analgésica (SANT'ANNA et al., 2019) (SARTIM; MENALDO; SAMPAIO, 2018). Sartim e seus colaboradores reuniram uma série de trabalhos que sustentam o uso terapêutico dessa toxina. Um surgiu de uma publicação feita por Dos-Santos em 1989 (DOS-SANTOS et al., 1989) a qual sugere que o veneno crotálico, quando comparado a outros venenos, não foi capaz de produzir uma quantidade satisfatória de anticorpos neutralizantes. Partindo-se do pressuposto de que a baixa produção de anticorpos poderia estar associada à crotoxina, um dos principais componentes do veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.t*). Outras publicações seguiram buscando provar essa ação imunomodulatória.

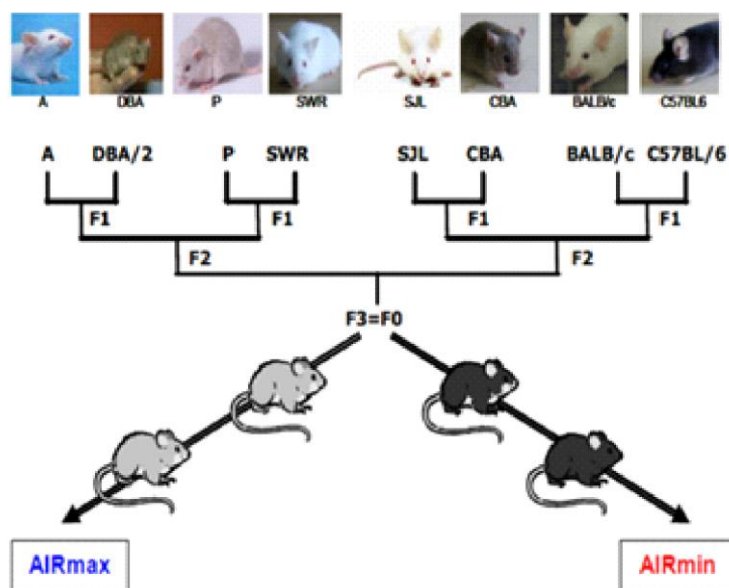
Cardoso e Mota em 1997 e 2001 observaram em camundongos BALB/c imunizados com HSA (do inglês: soro albumina humana) ou OVA (do inglês: ovalbumina) níveis de anticorpos IgG e isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b diminuídos quando tratados com o veneno total (*CdtV*) ou crotoxina 1h antes da imunização. Em ambos os estudos sugere-se que a crotoxina modula a resposta imune, diminuindo a produção de anticorpos (CARDOSO et al., 2001; CARDOSO; MOTA, 1997).

Favoretto e colaboradores em 2011 obtiveram resultados similares utilizando uma dose fixa de 5 µg/ animal via subcutânea (s.c) na pata de camundongos BALB/c, também imunizados com HSA. O objetivo do trabalho foi investigar o perfil de resposta adaptativa, utilizando para isso dois adjuvantes, neste caso o CFA (Adjuvante de Freund) e hidróxido de alumínio. O CFA induz o reconhecimento através do receptor TLR2 em APCs (células apresentadoras de antígenos). O hidróxido de alumínio, por sua vez, promove o acúmulo do antígeno no local da inoculação, ativando outros tipos de células. Logo, observou-se que a crotoxina inibiu a produção de anticorpos específicos *in vivo*, bem como a proliferação de esplenócitos *in vitro* (FAVORETTO et al., 2011).

1.4 Camundongos AIRmax e AIRmin como modelo experimental

Os camundongos AIRmax e AIRmin foram fenotipicamente selecionados com base na intensidade da resposta inflamatória aguda (AIR). O processo seletivo foi iniciado a partir de cruzamentos equilibrados entre oito linhagens isogênicas (CBA, SJL, A, SWR, C57Bl6, P, DBA/2 e BALB/c) que deram origem à população (F0), geneticamente heterogênea (Figura 2) (STIFFEL et al., 1990). O critério utilizado levou em consideração os extremos de máxima ou mínima reatividade inflamatória aguda (AIR) produzida pela injeção subcutânea de microesferas de poliacrilamida (Biogel). A avaliação da AIR foi realizada após 24 hs da injeção de Biogel por meio da lavagem do exsudato inflamatório com PBS (do inglês: phosphate buffered saline) e heparina a 20U. O fenótipo foi determinado por meio da avaliação no exsudato inflamatório da concentração de proteínas plasmáticas por espectrofotometria a 280 nm e o número de leucócitos por contagem em câmara hemocitométrica de Malassez (IBANEZ et al., 1992; STIFFEL et al., 1990). É importante ressaltar que as respostas inatas e específicas possuem regulações genéticas independentes, como já demonstrado em Araujo *et al.* (1998). AIRmax e AIRmin não apresentaram diferenças na resposta humoral a antígenos complexos ou celular em ensaios de hipersensibilidade tardia (ARAUJO et al., 1998).

Figura 2 – Seleção das linhagens AIRmax e AIRmin



Fonte: Laboratório de Imunogenética, 2022.

Camundongos AIRmax e AIRmin produzidos por seleção fenotípica bidirecional.

A crotoxina tem sido objeto de estudos como potencial imunobiológico de uso terapêutico devido às suas propriedades imunomoduladoras, anti-inflamatórias e anti-nociceptivas. Há inúmeras publicações de estudos que utilizam como modelo experimental linhagens de camundongos isogênicos. Porém, não há registros na literatura de ensaios realizados com camundongos geneticamente heterogêneos como os das linhagens AIRmax e AIRmin. Estas linhagens foram criadas e estabelecidas pelo grupo do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, onde o presente trabalho foi desenvolvido. Esses animais constituem, portanto, um modelo de estudo adequado, representando populações naturais como a humana.

2 OBJETIVOS

No presente trabalho, nos propomos a avaliar a ação da crotoxina na resposta humoral e celular, utilizando como modelo experimental camundongos das linhagens AIRmax e AIRmin imunizados com Gama globulina Humana (HGG), adsorvida em hidróxido de alumínio e tratados ou não com crotoxina, antes e após a imunização. Para tanto realizamos:

- a purificação da crotoxina a partir do veneno total de *C.d.t*;
- a avaliação da imunossupressão da produção de anticorpos anti-HGG em animais AIRmax e AIRmin imunizados com HGG; e
- avaliação inibição de proliferação e produção de IL-2 e IFN- γ .

3 METODOLOGIA

3.1 Camundongos

Foram utilizados camundongos AIRmax e AIRmin e camundongos isogênicos BALB/c, machos ou fêmeas, com idades entre 8 e 12 semanas. Os animais AIRmax e AIRmin foram mantidos no biotério de Imunogenética do Instituto Butantan sob regime convencional, água *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos envolvendo os animais atenderam aos princípios éticos de experimentação animal aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto Butantan (CEUAIB #8412070821; #4195190820).

3.2 Purificação da crotoxina

A crotoxina foi purificada a partir do veneno da cascavel C.d.t (fornecido pelo laboratório de herpetologia do Instituto Butantan). Como base, utilizou-se o método descrito por Faure e Bon (1987) (FAURE; BON, 1987), com modificações. Inicialmente, o veneno foi pesado e alíquotado, diluído em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) e, então submetido à cromatografia de troca aniônica, utilizando uma coluna MONO-Q HR 5/5. O sistema usado foi o Akta-FPLC (GE Healthcare, Brasil). A crotoxina é uma proteína com muitas cargas negativas, logo a fica retida na coluna. Em seguida, as proteínas adsorvidas à resina foram então eluídas em um gradiente linear de NaCl de 0 a 1 M, tamponado com fosfato 50 mM. Através da análise dos picos obtidos, os tubos contendo as frações correspondentes à crotoxina foram identificados e as amostras então reunidas e dialisadas contra PBS. Após a diálise, foi feita a limpeza das endotoxinas, utilizando uma coluna de polimixina “Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal, 1 mL” (Thermo Fisher Scientific). Por fim, a concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Uma vez separada e purificada, as amostras de crotoxina foram analisadas por eletroforese em gel, para visualização das bandas de crotoxina. Foi utilizado o gel de empilhamento contendo 3% de bisacrilamida/acrilamida em Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) e 1% de SDS e um gel de separação contendo 15% de

isacrilamida/acrilamida em Tris-HCl 2,0M pH 8,8 e 1% SDS. Antes de serem adicionadas aos poços do gel, as amostras (contendo de 5 a 10 µg de proteínas) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), contendo glicerol a 10% (v/v), mercaptoetanol 5% (v/v), 2% de SDS e 0,001% de azul de bromofenol, como corante, e aquecidas a 100 °C durante 5 min. Foi utilizado o padrão molecular “Trail Mix Protein Markes” (Novagen).

Para o tampão de corrida foi preparada uma solução contendo Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,19 M e SDS a 0,1%, pH 8,3. A corrida foi realizada com uma corrente de 55 mA, com duração de 2 horas. Ao final, as proteínas foram coradas em uma solução de 0,2% (m/v) de Coomassie Blue R-250 em água e metanol na proporção de 1:1 (v/v), durante 1h. A descoloração do gel foi realizada com metanol 30% / ácido acético/ 10% em água destilada.

Segundo publicação prévia de Rangel e colaboradores (2004), a utilização do gel SDS permitiu obter a crotoxina pura. A análise das bandas obtidas também foi feita com base no mesmo trabalho. É importante ressaltar que durante o processo de purificação, ao utilizar esse gel, a crotoxina é fragmentada em frações CA e CB, o que não prejudica a identificação da toxina (RANGEL-SANTOS et al., 2004a).

3.3 Determinação da dose letal (DL₅₀) da crotoxina via intraperitoneal

A dose letal capaz de matar 50% dos animais é denominada DL₅₀. Para determinação da DL₅₀ nas linhagens AIRmax e AIRmin, grupos de seis camundongos machos e fêmeas foram administrados intraperitonealmente (i.p.) com concentrações variadas da crotoxina (obtida do veneno da cascavel *C.d.t.*, fornecido pelo laboratório de herpetologia do Instituto Butantan), a saber 600, 300, 150, 75, 37,5 e 18,75 µg/kg de peso corpóreo. A determinação das concentrações se baseou em dados já existentes na literatura da DL₅₀ da crotoxina em camundongos C57BL/6 (OKAMOTO et al., 1993; SANT’ANNA et al., 2019). A crotoxina foi diluída em PBS (do inglês: phosphate buffered saline), na proporção de 100 µL/10 g de peso corporal. Ao todo, os animais sobreviventes foram observados por um período de 7 dias. Os cálculos foram realizados pela fórmula de tendência e os dados foram

plotados em gráficos de dispersão, cuja equação da reta determina a relação dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corpóreo) e mortalidade (%).

3.4 Imunização com Gama Globulina Humana (HGG)

Grupos de cinco camundongos pertencentes às linhagens AIR e, posteriormente animais BALB/c, foram imunizados com uma injeção subcutânea (s.c.) dorsal de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HGG (Sigma Aldrich ®) adsorvido em 2 mg de hidróxido de alumínio, pré diluído em PBS em um volume fixo de 200 $\mu\text{L}/\text{animal}$. Estes mesmos grupos foram tratados com crotoxina em dois momentos: 1h antes ou 72h após a imunização, por via intraperitoneal (i.p.). A dose escolhida foi 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corpóreo, sendo a crotoxina diluída em PBS, na proporção de 100 $\mu\text{L}/10$ g de peso corporal. Essa dose corresponde a 50% da dose letal via i.p., nestas linhagens. O grupo controle não recebeu qualquer tratamento. Os animais ficaram sob o efeito da crotoxina durante 28 dias e, a cada 7 dias, foram obtidas amostras de soro por sangria do plexo venoso retro-orbital para quantificação de anticorpos IgM ou IgG anti-HGG. Para os ensaios com os camundongos BALB/c, o mesmo protocolo foi aplicado, exceto a crotoxina, cuja administração somente ocorreu no tempo de 72h após a imunização de acordo com o estudo de Favoretto em 2011 (FAVORETTO et al., 2011), com modificações.

3.5 Imunização com Ovalbumina de galinha (OVA)

Grupos de cinco camundongos BALB/c foram imunizados com uma injeção subcutânea (s.c.) na base da cauda, de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de OVA (Sigma Aldrich ®) adsorvida em hidróxido de alumínio, na concentração de 1mg/mL e pré diluída em PBS em um volume fixo de 200 $\mu\text{L}/\text{animal}$. Os grupos em questão também foram tratados com crotoxina em dois tempos, 1h antes ou 72h após a imunização, por via subcutânea (s.c.) na pata. A dose escolhida foi de 5 $\mu\text{g}/\text{animal}$, diluída em um volume fixo de 20 μL de PBS. O protocolo utilizado baseou-se nos trabalhos de Cardoso e Mota (1997) e Favoretto e colaboradores (2011) (CARDOSO; MOTA, 1997; FAVORETTO et al., 2011), com modificações. Para controle negativo utilizou-se animais não imunizados. Os animais ficaram sob o efeito da crotoxina durante 28

dias, sendo que, a cada 7 dias, foram obtidas amostras de soro por sangria do plexo venoso retro orbital para quantificação de anticorpos IgM e IgG anti-OVA.

3.6 Quantificação de IgG e IgM anti-HGG e anti-OVA no soro por ELISA

Amostras de sangue dos animais foram coletadas por punção do plexo venoso retro-orbital, com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro. Antes do procedimento, os animais foram anestesiados via ocular (o.c) com 10 μ L de Cloridrato de Proximetacaína (Anestalcon[®]), numa concentração de 5 mg/mL. Após um período para a coagulação de 2 horas a 4°C, o sangue coletado foi centrifugado a 4°C e 9000g por 2 minutos e o soro separado e estocado a -20°C.

Placas Costar[®] 3590, de alta ligação, 96 poços, não estéril foram sensibilizadas com 100 μ L/poço de HGG diluído em tampão carbonato (pH 9,5), a uma concentração de 0,2 μ g/poço e incubadas a 4°C, overnight. No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS 0,05% Tween 20 (Sigma Aldrich[®]) e bloqueadas com 200 μ L/poço de PBS 5% BSA (do inglês: Bovine Serum Albumin) e incubadas a 37°C durante 2 horas. Em seguida, as placas foram novamente lavadas e feita a diluição seriada das amostras de soro diluídas em tampão de bloqueio (PBS 5% BSA) com fator de diluição na razão de 2, sendo incubadas a 37°C por 1 hora. Após esse período de incubação as placas foram lavadas e acrescentou-se 100 μ L/poço de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (Southern Biotechnology) ou IgM (Sigma Aldrich[®]), ambos conjugados à peroxidase. Os anticorpos foram diluídos em PBS-Tween, nas concentrações de 1:8000 ou 1:1250, respectivamente. Em sequência, as placas foram incubadas por mais 1h a 37°C, lavadas e foram adicionados 100 μ L/poço de reagente substrato TMB (tetramethylbenzidine) BD OptEIA[™]. Após reagir durante cerca de 5 minutos no escuro, a reação foi bloqueada com 50 μ L/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2N). As absorbâncias das amostras foram obtidas por leitura em comprimento de onda de 450nm e a titulação de anticorpos calculada com base no log₂ da recíproca da diluição que corresponde a 20% do platô.

3.7 Obtenção e proliferação de esplenócitos *in vitro* por CFSE

Após 28 dias da primeira imunização, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e as células do baço obtidas para ensaio de proliferação. Os esplenócitos, na concentração de 3x10⁶/mL, foram marcados com CFSE (do inglês: Carboxyfluorescein succinimidyl ester) na concentração de 5 µM em meio RPMI-1640 simples e incubados por 10 minutos em banho-maria à 37°C. Após este período foram acrescentados à suspensão celular 3 mL de RPMI 10% SFB (do inglês: fetal bovine serum) (Gibco™) e incubadas no gelo por 5 minutos. Em seguida, as células foram lavadas por 2 vezes com 3 mL de RPMI 10% SFB, centrifugadas a 4°C e 290 g por 5 minutos e ressuspensas em 1mL de RPMI completo (10% de SFB, 2mM de Glutamina, 50µM 2-βMercaptoetanol e 20µg de Gentamicina). Foram feitas as contagens das células em câmara hemocitométrica de Malassez, utilizando corante Azul de tripan a 0,02% e as concentrações acertadas para 2x10⁵ células/poço. A cultura foi feita em placas de 96 poços de fundo chato onde as suspensões celulares foram estimuladas com ConA (concanavalina A) a 5 µg/mL ou HGG a 5 µg/mL. As culturas celulares foram mantidas em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 96hs. Após esse período as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi armazenado a -20°C. Às suspensões foi adicionado 1 µg/10⁶ células de FCBlock (CD16/CD32) (clone 2.4G2) e incubadas por 10 minutos a 4°C. Em seguida as células foram lavadas com PBS 2% SFB e marcadas com anticorpo anti-CD3 (clone 145-2C11), conjugado ao fluorocromo PEcy7 na proporção de 1 µg/10⁶ células. Foram considerados 10.000 eventos para aquisição em FACS Canto II. Os dados obtidos foram analisados pelo programa FlowJo V.10.

3.8 Quantificação de citocinas produzidas por esplenócitos *in vitro*

Foram avaliadas as citocinas produzidas pelos esplenócitos em cultura após tratamento *in vivo* com crotoxina. Os ensaios foram realizados utilizando os kits de ELISA BD OptEIA™. Placas Nunc Maxi Sorp®, de alta ligação, 96 poços, não estéril foram sensibilizadas com 100 µL/poço do anticorpo de captura diluído em tampão (carbonato de sódio (pH 9,5)) e incubadas a 4°C *overnight*, para os ensaios de IFN-γ e IL-2. As diluições dos anticorpos primários foram, respectivamente 1:500,

1:250. No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS 0,05% Tween 20 (Sigma Aldrich®) e bloqueadas com 200 µL/poço de PBS 20% SFB e incubadas durante 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram novamente lavadas, e adicionados 100 µL de amostra do sobrenadante (em duplicata). Na sequência, paralelamente foram acrescentados os recombinantes para a curva padrão diluídos seriadamente no tampão de bloqueio, sendo as placas novamente incubadas por 2 horas, em temperatura ambiente. Terminado o período de incubação e após a lavagem, acrescentou-se 100 µL/poço de anticorpo secundário, de acordo com as orientações do fabricante. Após 1h de incubação em temperatura ambiente, prosseguiu-se com a lavagem das placas. A última etapa consistiu em adicionar 100 µL/poço de reagente substrato TMB que foi deixado reagir durante cerca de 5 minutos no escuro. A reação foi interrompida com 50 µL/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2N) e as absorbâncias das amostras foram obtidas por leitura em comprimento de onda de 450nm. A concentração de cada amostra foi baseada nas respectivas curvas padrão.

3.9 Análise estatística

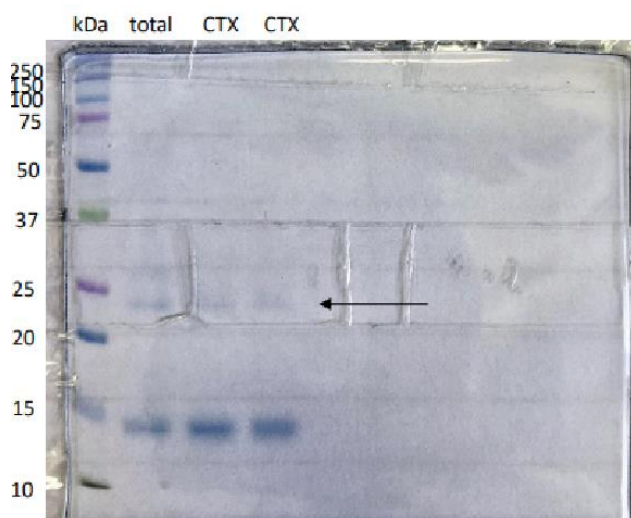
As diferenças entre as médias foram calculadas pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Turkey para a comparação entre os grupos. Consideramos significativos aqueles valores de $p < 0,05$ bicaudal.

4 RESULTADOS

4.1 Purificação da Crotoxina

Após o processo de purificação da crotoxina conforme item [3.2](#), realizamos eletroforese SDS-Page, em gel de empilhamento para determinar as bandas obtidas após o processo da passagem na coluna de purificação. Foram utilizados como base em um padrão molecular, para determinar o posicionamento das diferentes bandas da crotoxina e do veneno bruto (*CdtV*). É possível observar na Figura 3 a localização das duas bandas correspondentes às frações A e B da crotoxina, constituída por suas subunidades CA (crotapotina) e CB (fosfolipase A₂). A seta indica a banda relacionada à crotoxina cujo peso molecular é aproximadamente de 24 kDa (Figura 3).

Figura 3 – Eletroforese em gel SDS-Page para purificação de crotoxina



Fonte: Laboratório de Imunogenética, 2021.

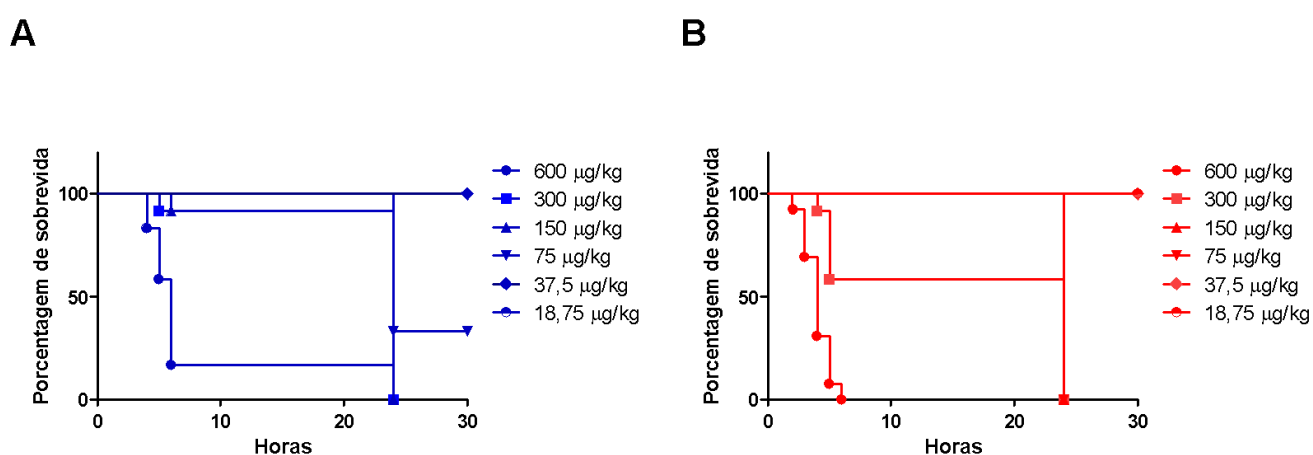
Eletroforese de amostras de veneno de *Crotalus durissus terrificus* e de crotoxina purificada. Setas indicam bandas de crotoxina.

4.2 Cálculo da DL₅₀ nas linhagens AIRmax e AIRmin

A determinação da DL₅₀ da crotoxina nas linhagens AIR foi realizada conforme o item [3.3](#). Os resultados mostraram que durante as primeiras 24h foram registradas o maior número de mortes, como é possível observar nos gráficos

(Figura 4). Os sintomas relacionados a um possível envenenamento observados foram: dispneia e aumento da frequência cardiorrespiratórios que variaram de leves a graves, geralmente antecedendo o óbito. Nossos cálculos indicaram um valor de DL_{50} de aproximadamente $80 \mu\text{g}/\text{kg}$ (de peso corporal), para ambas as linhagens sem qualquer diferença entre os sexos. Nos experimentos foi utilizada a dose correspondente à metade deste valor ($40 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal).

Figura 4 – DL_{50} de crotoxina via intraperitoneal



Fonte: Laboratório de Imunogenética, 2021.

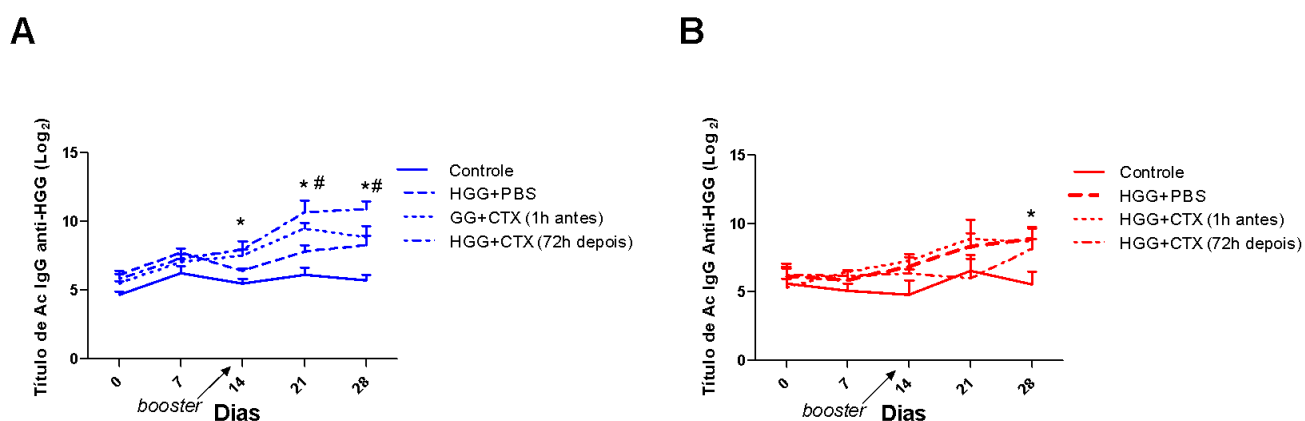
Gráficos de sobrevivência de camundongos AIRmax (A) e AIRmin (B) (ambos os sexos) tratados com crotoxina em doses intraperitoneais variadas de 40 a 320 mg/Kg de peso corpóreo (DL_{50}). A diferença entre as curvas foi calculada pelo método qui-quadrado sendo altamente significativa $p < 0,001$.

4.3 Efeito da crotoxina na resposta humoral a HGG em AIRmax e AIRmin

Com o propósito de avaliar o papel imunossupressor da crotoxina na produção de anticorpos anti-HGG, grupos de 5 camundongos das linhagens AIRmax e AIRmin foram tratados com HGG ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) via s.c. e submetidos ou não aos efeitos da crotoxina. Os títulos de anticorpos individuais foram calculados como descrito no item [3.4](#) e expressos como a média e erro padrão da média (EPM) conforme Figura 5A e B. O dia zero corresponde à sangria prévia aos tratamentos. O intervalo entre 7 e 14 dias compreende a resposta primária e, de 21 a 28 dias, a resposta secundária, sendo que no 14º dia foi administrado o *booster* de HGG. Os títulos basais são referidos como os títulos do grupo controle.

Durante a resposta primária foi possível observar que os camundongos AIRmax e AIRmin apresentaram perfis similares. Na resposta secundária, aos 21 dias, os títulos de anticorpos dos grupos AIRmax imunizados e tratados com crotoxina aumentaram significativamente em relação aos títulos basais e ao grupo HGG, seguido de uma queda aos 28 dias. Na resposta secundária, o grupo que recebeu crotoxina 72h após HGG manteve uma diferença significativa em relação ao grupo HGG, com um título mais elevado. Porém, os grupos tratados com crotoxina não diferem significativamente entre si. Quanto aos animais AIRmin, os títulos mantiveram-se constantes ao longo de toda a cinética, com equivalência entre os grupos, com exceção do grupo HGG e CTX 1h antes, que apresentou uma diferença significativa em relação aos títulos basais de 21 e 28 dias.

Figura 5 - Cinética da titulação de anticorpos IgG total anti-HGG (AIRmax e AIRmin)



Fonte: próprio autor, 2021.

Cinética da titulação de anticorpos IgG total anti-HGG de camundongos AIRmax (A) e AIRmin (B) tratados ou não com crotoxina 1h antes ou 72h depois, via i.p e imunizados com HGG s.c. Os resultados são expressos como média \pm Erro Padrão da Média (n=5). *diferença com relação ao grupo controle; #diferença com relação ao grupo HGG ($p < 0.05$).

4.4 Efeito da crotoxina na resposta celular a HGG em AIRmax e AIRmin

Para avaliação da capacidade proliferativa dos esplenócitos, foram obtidas células de camundongos AIRmax e AIRmin imunizados com HGG (50 $\mu\text{g/mL}$, s.c.) e tratados ou não com crotoxina (40 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal i.p) em diferentes tempos, 1h antes ou 72h após a imunização. As células foram obtidas 28 dias após a imunização e marcadas com CFSE e, em seguida, incubadas por 96 horas em estufa de CO₂ a 37°C, sob estímulo da ConA (item [3.7](#)). O CFSE é um corante

fluorescente, utilizado como marcador de proliferação celular. Ele é originado a partir do CFDA-SE (éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína), sendo absorvido somente por células vivas. No interior da célula, passa então por um processo de clivagem que dá origem à sua forma aniônica, que é o CFSE. A porção de éster succinimidílico liga-se covalentemente aos grupos amina das proteínas e passa a emitir fluorescência. A cada mitose, as células-filhas retêm a metade da intensidade de fluorescência da célula-mãe e assim sucessivamente. Logo, quanto menor a intensidade de fluorescência, maior é a proliferação celular e vice-versa (LYONS, 2000).

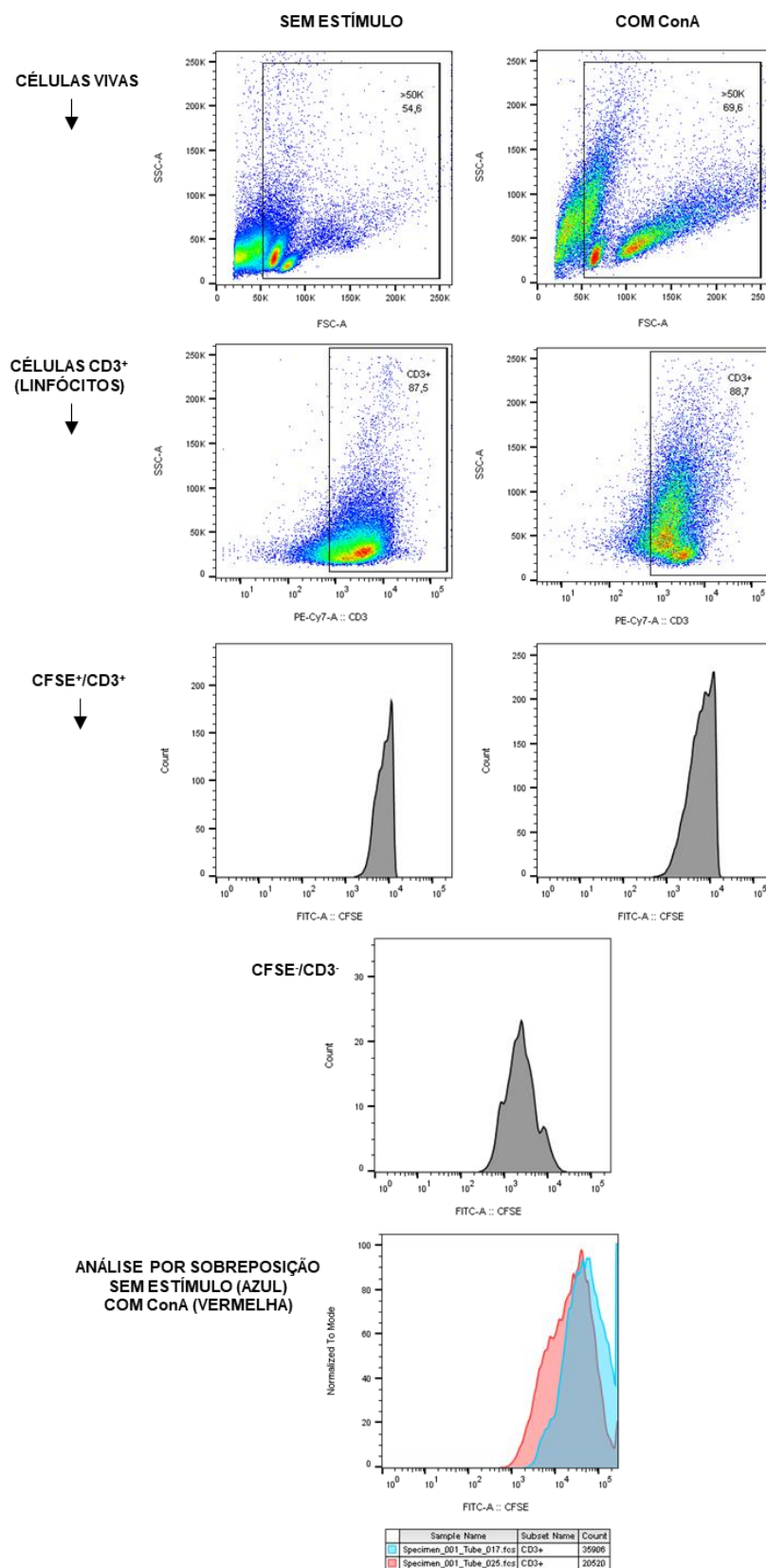
Assim, as amostras obtidas das culturas foram submetidas à análise por citometria de fluxo priorizando as células T (CD3⁺) e marcação de proliferação por CFSE (CFSE⁺). Na Figura 6A mostramos a estratégia de análise de proliferação dos esplenócitos cujos resultados foram plotados conforme Figura 5B e C.

Para a análise de proliferação, os gráficos, obtidos da leitura das amostras no citômetro, foram visualizados em formato de histograma por sobreposição das amostras com e sem ConA (Figura 6A). Em seguida, foram obtidas as medianas de intensidade de fluorescência (MFI) de todas as amostras e calculou-se a média e o erro padrão de cada grupo. Os números obtidos foram plotados em gráficos (Figura 6B).

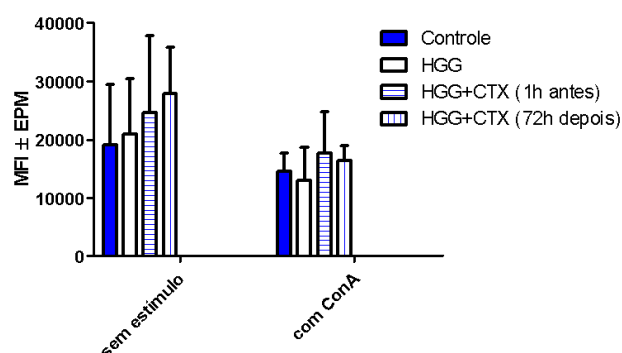
Os resultados de MFI indicaram que a ConA não induziu proliferação significativa em ambas as linhagens. Devido à grande variabilidade entre os animais, representados pela média e erro padrão da média, não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos, apesar do tratamento com crotoxina. Importante ressaltar que, devido a dificuldades técnicas, o cultivo celular foi realizado em dias diferentes com quantidades aproximadamente iguais de amostras. O mesmo protocolo foi aplicado nos dois dias, o que pode explicar parcialmente as altas variações encontradas nos diferentes grupos.

Figura 6 - Estratégia de análise e valores de Intensidade de Fluorescência Média (MFI)

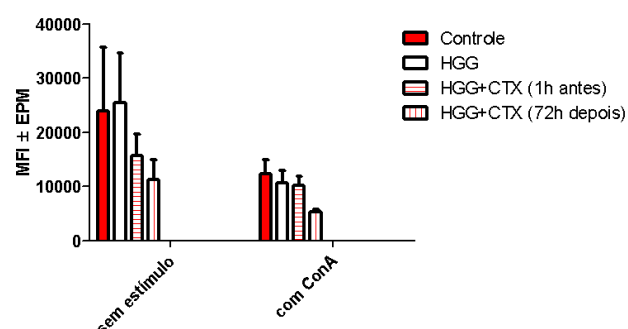
A



B



C



Fonte: próprio autor, 2021.

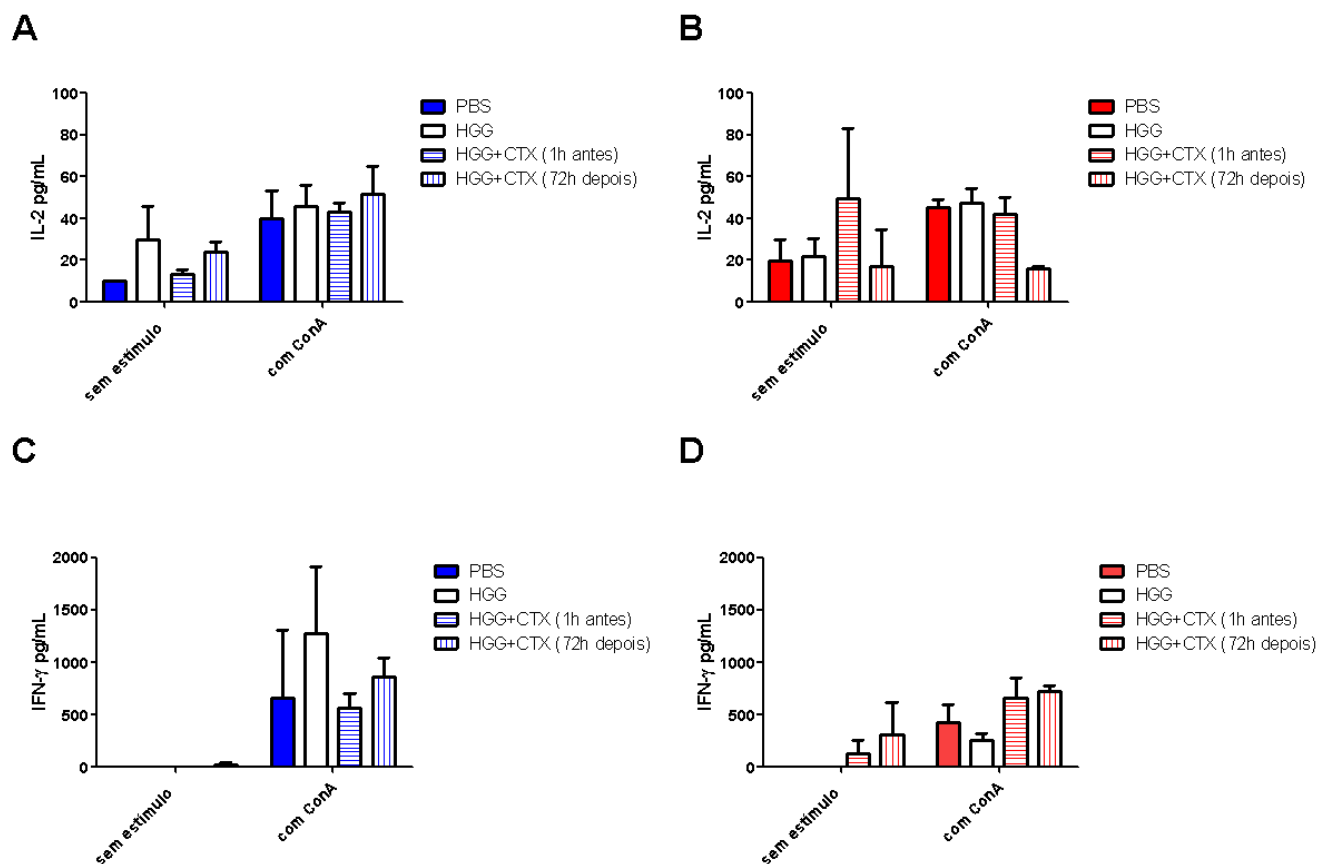
Análise proliferativa de esplenócitos oriundos de camundongos AIRmax e AIRmin. (A) Estratégia de análise da Intensidade de Fluorescência Média (MFI) das células CD3⁺ após cultura de 96 horas, antes (esquerda) e depois (direita) do estímulo com ConA *in vitro*, a amostra pertence a um animal do grupo controle. (B e C) Valores de MFI da proliferação de esplenócitos de AIRmax e AIRmin, respectivamente, estimulados ou não com ConA *in vitro*. Os resultados são expressos como média \pm Erro Padrão da Média (n=5). *diferença com relação ao grupo controle; #diferença com relação ao grupo HGG (p<0.05).

4.5 Quantificação de citocinas no sobrenadante da cultura de esplenócitos

Foi feita a análise dos níveis de IL-2 e IFN- γ a partir dos sobrenadantes oriundos das culturas celulares de esplenócitos, obtidos dos animais imunizados e tratados ou não com crotoxina (item [3.8](#)). As dosagens dos grupos controle, cujos animais não receberam nenhum tratamento, foram consideradas como referência de base.

As culturas estimuladas com ConA apresentaram níveis superiores de IL-2 (Figura 7A) e IFN- γ (Figura 7B) em relação àquelas sem estímulo para as duas linhagens AIRmax e AIRmin. No entanto esta diferença não foi estatisticamente significativa. Portanto, não podemos considerar qualquer supressão da secreção citocinas em cultura para os animais tratados com crotoxina.

Figura 7 – Níveis de IL-2 e IFN- γ no sobrenadante da cultura de esplenócitos



Fonte: próprio autor, 2021.

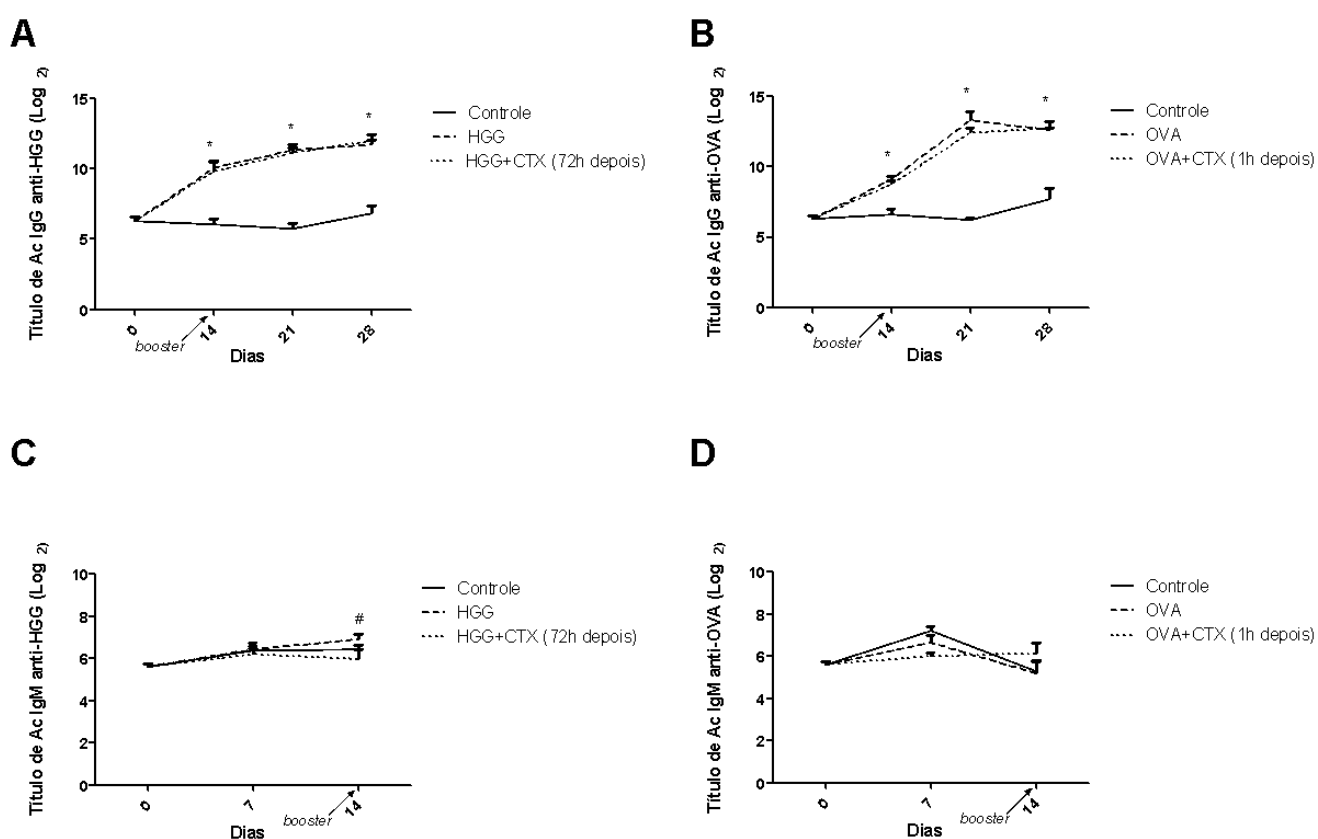
Níveis de IL-2 (A e B) e IFN- γ (C e D) a partir dos sobrenadantes oriundos das culturas celulares de esplenócitos obtidos dos animais imunizados com HGG (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ s.c.) e tratados ou não com crotoxina (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, i.p.). (A e C) AIRmax e (B e D) AIRmin.

4.6 Efeito da crotoxina na resposta humoral a HGG e OVA em BALB/c

Em vista de não termos encontrado efeito modulador da crotoxina na produção quantitativa de anticorpos nas linhagens AIRmax e AIRmin, o que sugere uma possível ineficácia da crotoxina, avaliamos o seu efeito em camundongos BALB/c imunizados com HGG ou OVA por via subcutânea, seguindo o protocolo previamente estabelecido e publicado por Cardoso e Mota em 1997 e Favoretto em 2011. Assim, os camundongos BALB/c foram imunizados com HGG ou OVA e realizada a quantificação de anticorpos das classes IgM aos 7 e 14 dias, e IgG a partir do 14^o dia da primeira imunização no mesmo protocolo proposto nos artigos (item [3.4](#) e [3.5](#)). O dia zero corresponde à sangria prévia.

Como resultados, na produção de anticorpo IgM, não houve diferença significativa entre os grupos controle e imunizado ou entre os grupos imunizados e tratados com crotoxina. Isso pode ser observado tanto para HGG quanto OVA. A partir de 14 dias da resposta primária e na resposta secundária, os títulos de IgG anti-HGG e anti-OVA dos animais tratados ou não com crotoxina apresentaram aumento progressivo até atingir o máximo aos 21 dias, mantendo sempre uma diferença significativa entre os grupos imunizados e o grupo controle (Figura 8). No entanto, como em outros experimentos com AIRmax e AIRmin, não observamos qualquer modulação pela crotoxina (Figura 8).

Figura 8 – Cinética dos títulos de anticorpos IgM e IgG anti-HGG e anti-OVA (BALB/c)



Fonte: próprio autor, 2022.

Cinética dos títulos de anticorpos IgM e IgG total anti-HGG ou anti-OVA de camundongos BALB/c imunizados com 200 µg/mL de OVA por via subcutânea e tratados ou não com crotoxina 1h depois (s.c.) aqueles imunizados com 50 µg/mL de HGG s.c. e tratados com crotoxina 72h depois (i.p). (A) IgM anti-HGG. (B) IgM anti-OVA. (C) IgG anti-HGG. (D) IgG anti-OVA. Os resultados são expressos como média ± Erro Padrão da Média (n=5). *diferença com relação ao grupo controle; #diferença com relação ao grupo HGG ou OVA (p<0.05).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo objetivamos avaliar o papel da crotoxina na modulação da resposta imune humoral à HGG. Neste sentido, estudos em linhagens isogênicas de camundongos demonstraram que tanto o veneno total (*CdtV*) quanto a crotoxina (CTX) foram capazes de modular a resposta imune humoral, resultando na diminuição da produção de anticorpos (CARDOSO; MOTA, 1997; FAVORETTO et al., 2011). No entanto, alguns modelos animais não refletem fielmente o que ocorre com uma população natural como a humana, geneticamente heterogênea. Assim, optamos pela utilização de linhagens de camundongos fenotipicamente selecionadas para a resposta inflamatória aguda (AIR), resultante do cruzamento equilibrado entre 8 linhagens isogênicas de origens filogenéticas diversas, AIRmax e AIRmin (IBANEZ et al, 1992). Esses animais comportam-se como bons ou maus respondedores para estímulos inflamatórios e indiferentemente para a resposta imune humoral e celular a antígenos proteicos complexos. Este fenótipo é reflexo da independência dos controles genéticos da resposta inata e adaptativa (ARAUJO et al., 1998).

Os experimentos foram conduzidos no sentido de avaliar a resposta humoral (IgG total) e celular (proliferação) ao antígeno HGG inoculado subcutaneamente, no dorso dos animais AIRmax e AIRmin, sob efeito da crotoxina. A crotoxina foi purificada a partir do veneno bruto da cascavel *C.d.t* e administrada de acordo com os respectivos grupos experimentais. Dessa forma, avaliamos a resposta humoral primária e secundária por meio dos ensaios de ELISA a partir dos soros obtidos aos 7 e 14 (resposta primária) e aos 21 e 28 dias (resposta secundária).

Para determinação da dose a ser utilizada e, sabendo-se que os efeitos tóxicos da crotoxina promovem o comprometimento cardiorrespiratório, podendo levar ao óbito, inicialmente, fez-se necessário determinar a dose letal de 50% (DL₅₀) na inoculação intraperitoneal. Chegamos então, à DL₅₀ de 80 µg/kg de peso corpóreo, sendo utilizada nos experimentos de modulação a dose de 0,5 da DL₅₀, que corresponde a 40 µg/kg de peso corporal. Na sequência, a crotoxina foi administrada em tempos distintos, sendo eles 1h antes e 72h depois da imunização

com HGG, protocolo estabelecido por Favoretto em 2011, o que permitiu analisar o grau de interferência dessa toxina na resposta imune, uma vez que a crotoxina possui propriedades imunossupressoras (FAVORETTO et al., 2011).

Como foi constatado em nossos resultados, os títulos de anticorpos dos animais AIRmax e AIRmin se elevaram no 21^o dia, sobretudo nos grupos de animais tratados com crotoxina, o que não era esperado uma vez que a crotoxina possui efeitos supressores e não ativadores do sistema imune. Estas alterações, contudo, não podem ser atribuídas aos efeitos da crotoxina. Esta diferença observada, no entanto, poderia ser explicada pela dose de reforço (*booster*), administrada no 14^o dia, presumindo que a crotoxina não tenha exercido o efeito esperado.

Com a finalidade de comparar os protocolos em relação à produção de anticorpos, sob efeito da crotoxina, foram conduzidos outros dois experimentos: um utilizando o mesmo protocolo aplicado em nossos estudos com as linhagens AIR e outro retirado da publicação de Cardoso e Mota (1997) e Favoretto e colaboradores (2011) (CARDOSO; MOTA, 1997; FAVORETTO et al., 2011), com modificações (item 3.4 e 3.5). Para isso, foram utilizados como modelo experimental camundongos isogênicos da linhagem BALB/c. Os resultados revelaram que o tratamento com crotoxina não promoveu a diminuição dos títulos de anticorpos, ademais, não observamos diferenças a despeito da dose, via ou tempo de administração. Os títulos de anticorpos aumentaram proporcionalmente ao longo da cinética, mantendo uma diferença significativa em relação ao grupo controle, independente do antígeno imunizante.

Diversos estudos correlacionam as propriedades anti-inflamatórias da crotoxina à capacidade de imunomodulação. Essa toxina é descrita como possuindo um efeito anti-inflamatório prolongado, que está associado à participação de mediadores inflamatórios derivados de eicosanoides, bem como a ativação do receptor peptídico formil (da sigla em inglês: FPR) (SAMPAIO et al., 2006a). Nunes e seu grupo identificaram uma diminuição no rolamento de leucócitos no endotélio, acompanhado de um aumento na adesão às paredes endoteliais, sugerindo que a crotoxina interfere na expressão das moléculas de adesão. Isso resultaria na

diminuição da migração de leucócitos ao sítio inflamatório, reduzindo o edema. Tais observações se estenderam por até 21 dias, sendo que os efeitos já podiam ser observados mesmo quando a crotoxina foi administrada antes da inflamação (NUNES et al., 2007, 2010). Os mesmos autores também observaram que a lipoxina A₄, produto metabólico da via da lipoxigenase, foi capaz de ativar o FPR. Esse receptor pertence à família de receptores de membrana celular acoplados à proteína G (da sigla em inglês: GPCR) e reconhece uma grande diversidade de ligantes. Em humanos já foram identificados três tipos de FPRs: FPR1, FPR2/ALX e FPR3. Os camundongos possuem genes ortólogos para os receptores FPR1 e FPR2/ALX (FILEP; SEKHERI; EL KEBIR, 2018).

Alguns autores postulam que a PLA₂ está envolvida nesse efeito anti-inflamatório associado à crotoxina. Ela hidrolisa os fosfolípidios da bicamada lipídica das membranas celulares, ativando a cascata do ácido araquidônico (AA) (SARTIM; MENALDO; SAMPAIO, 2018). Em ratos, por exemplo, o veneno bruto (CdtV) inibe a diapedese e a capacidade fagocítica dos macrófagos, comprometendo a produção de citocinas e, conseqüentemente, afetando o processo inflamatório. Essas células também estariam associadas à produção da LXA₄, que funcionaria como mediador anti-inflamatório (SAMPALIO et al., 2001, 2006b) (SAMPALIO et al., 2003, 2005). Tais achados reforçam o papel anti-inflamatório da crotoxina.

Sabendo-se que a crotoxina age também em células do sistema imune, foi constatado que, além dos macrófagos, outros tipos celulares, como os neutrófilos e células dendríticas podem ter funções importantes prejudicadas. Lima e colaboradores (2012) demonstraram que tanto a crotoxina quanto o veneno total (CdtV) inibiram a atividade fagocítica dos neutrófilos em diferentes concentrações. Ensaio *in vivo*, utilizando ratos também como modelo experimental, obtiveram os mesmo resultados, com administração da toxina pós e pré-imunização. Os resultados apontaram para uma interferência na fosforilação da tirosina e, conseqüentemente, da polimerização da actina, interferindo no rearranjo do citoesqueleto. Em trabalho posterior, verificaram ainda que a crotoxina pode afetar neutrófilos desde a medula óssea, efeito que poderia estar correlacionado com a

atividade anti-inflamatória de longa duração, descrito como característico da crotoxina (LIMA et al., 2012, 2017).

Já as células dendríticas possuem a expressão da molécula MHC II (da sigla em inglês, complexo principal de histocompatibilidade), essencial na apresentação de antígeno e ativação de células T e, conseqüentemente, na resposta adaptativa. Freitas e colegas (2018 e 2021) demonstraram, *in vitro*, que células dendríticas, oriundas da medula óssea e estimuladas com LPS, quando tratadas com crotoxina, tiveram o processo de maturação prejudicado. Os resultados revelaram, que além da expressão de moléculas MHC II, a expressão de outras moléculas co-estimulatórias e citocinas pró-inflamatórias também foi prejudicada. Isso inclui a secreção de mediadores derivados de eicosanoide. E, novamente, o uso de um antagonista do receptor FPR2, provou sua participação no efeito anti-inflamatório da crotoxina (FREITAS et al., 2018, 2021).

Há dados na literatura dos efeitos da crotoxina sobre a capacidade proliferativa dos linfócitos e o perfil de citocinas. Rangel e colaboradores (2004) (RANGEL-SANTOS et al., 2004b) a fim de avaliar o efeito citotóxico do veneno bruto (*CdtV*), em tempos diferentes, dentro de um intervalo de 48h, foram obtidos esplenócitos de camundongos BALB/c e cultivados com 5 µg de veneno total. A viabilidade celular permaneceu inalterada demonstrando que não houve citotoxicidade por parte da crotoxina. Para avaliar os efeitos da crotoxina na resposta imune celular, os esplenócitos de animais previamente tratados com crotoxina foram transplantados em animais não tratados. Estes últimos, após imunização com HSA apresentaram títulos de anticorpos específicos anti-HSA diminuídos, demonstrando o efeito supressor da crotoxina.

Em nossos experimentos, foram obtidos os esplenócitos dos animais AIRmax e AIRmin, previamente imunizados com HGG e tratados ou não com crotoxina. As células foram marcadas com CFSE e anticorpo anti-CD3 e estimuladas ou não com ConA *in vitro*. Os linfócitos T CD4 exercem o papel de auxiliares das células B, sendo importantes para o desenvolvimento da resposta adaptativa. Mas, diferentemente do que já foi descrito em trabalhos anteriores, nossos ensaios de

proliferação não tiveram os mesmos resultados. Logo, o tratamento com crotoxina não inibiu a proliferação de linfócitos T CD3 primados com HGG e estimulados com ConA *in vitro*, assim como na resposta quantitativa de anticorpos anti-HGG.

Duas citocinas foram avaliadas, IL-2 e IFN- γ . A IL-2 possui ação autócrina atuando na maturação das células. A dosagem dessa citocina auxilia na determinação dos níveis de proliferação. Dessa forma, os níveis de IL-2, podem ser um método indireto de analisar a proliferação também. Neste caso, observamos, porém, que os níveis de IL-2 não diminuíram sob efeito da crotoxina, o que é coerente com os resultados observados na proliferação. Quanto ao IFN- γ secretado pelos linfócitos, este, atua como mediador na ativação e diferenciação de células T auxiliares tipo 1 (Th1) e células B. Os linfócitos Th1 possuem ação predominantemente pró-inflamatória e as células B são produtoras de anticorpos.

Inicialmente imaginamos encontrar uma diferença de supressão da resposta específica pela crotoxina em uma das linhagens AIRmax ou AIRmin, considerando o fato desses animais apresentarem fenótipos opostos para a AIR e que uma eventual diferença de resposta poderia estar relacionada com um polimorfismo genético do receptor FPR, o que poderia conferir uma diferença na resposta dos animais à crotoxina. No entanto, não observamos qualquer diferença entre as linhagens AIRmax e AIRmin, nem BALB/c em resposta ao tratamento com crotoxina.

6 CONCLUSÕES

A partir da análise dos resultados obtidos é possível concluir que não houve diminuição na produção de anticorpos, ou resposta proliferativa, nas linhagens AIR como resultado do tratamento com crotoxina. Curiosamente, isso também não pôde ser observado nos animais BALB/c. As alterações no protocolo de imunização e nas doses de crotoxina também não surtiram o efeito esperado. Este fato pode estar relacionado a uma ineficácia na purificação da crotoxina, provavelmente devido a uma saturação da coluna de purificação pelo tempo de uso.

Assim se faz necessário a realização de novos ensaios, utilizando uma crotoxina purificada em uma nova coluna, bem como a realização de testes para avaliar a sua atividade enzimática. Portanto, novos ensaios de modulação da imunidade humoral e celular deverão ser realizados nessas linhagens com o objetivo de avaliar o efeito, amplamente descrito da crotoxina como agente supressor da imunidade bem como uma possível resposta diferenciada entre AIRmax e AIRmin em decorrência de um polimorfismo funcional do gene *Fpr2*, localizado no cromossomo 17, constituição genética essa que poderá destacar a variabilidade de resposta à Crotoxina de uma população natural como é a humana.

REFERÊNCIAS¹

- ARAUJO, L. M. M.; RIBEIRO, O. G.; SIQUEIRA, M.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; MASSA, S.; CABRERA, W. H. K.; MOUTON, D.; SEMAN, M.; IBÁÑEZ, O. M. **Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response**, 1998. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1521-4141\(199809\)28:09<2913::aid-immu2913>3.0.co;2-3](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1521-4141(199809)28:09<2913::aid-immu2913>3.0.co;2-3)>
- BAUDOU, F. G.; RODRIGUEZ, J. P.; FUSCO, L.; DE ROODT, A. R.; DE MARZI, M. C.; LEIVA, L. South American snake venoms with abundant neurotoxic components. Composition and toxicological properties. A literature review. **Acta tropica**, [s. l.], v. 224, p. 106119, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106119>>
- CARDOSO, D. F.; LOPES-FERREIRA, M.; FAQUIM-MAURO, E. L.; MACEDO, M. S.; FARSKY, S. H. Role of crotoxin, a phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. **Mediators of inflammation**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 125–133, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09629350124986>>
- CARDOSO, D. F.; MOTA, I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 607–612, 1997. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101\(96\)00134-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101(96)00134-1)>
- CHUCAO. **Ejemplar taxidermizado de víbora de cascabel austral (*Crotalus durissus terrificus*)** Wikimedia Commons, , 2013. Disponível em: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Crotalus_durissus_terrificus_\(mounted\).JPG#/media/File:Crotalus_durissus_terrificus_\(mounted\).JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Crotalus_durissus_terrificus_(mounted).JPG#/media/File:Crotalus_durissus_terrificus_(mounted).JPG)>online image
- CURA, J. E.; BLANZACO, D. P.; BRISSON, C.; CURA, M. A.; CABROL, R.; LARRATEGUY, L.; MENDEZ, C.; SECHI, J. C.; SILVEIRA, J. S.; THEILLER, E.; DE ROODT, A. R.; VIDAL, J. C. Phase I and pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA(2), NSC-624244) in patients with advanced cancer. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 1033–1041, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11948110>>
- DOS-SANTOS, M. C.; YAMAGUCHI, I. K.; CARICATTI, C. P.; HIGASHI, H. G.; DIAS-DASILVA, W. Immunization of equines with phospholipase A2 protects against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 509–512, 1989. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2590734>>
- FAURE, G.; PERALES, J.; VILLELA, C.; CHOUMET, V.; SALIOU, B.; DOMONT, G. B.; MOUSSATCHÉ, H.; BON, C. **Neutralization of crotoxin by the specific crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum**, 1996. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)83714-7](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(96)83714-7)>
- FAVORETTO, B. C.; RICARDI, R.; SILVA, S. R.; JACYSYN, J. F.; FERNANDES, I.; TAKEHARA, H. A.; FAQUIM-MAURO, E. L. Immunomodulatory effects of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice immunised with human serum albumin. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, [s. l.], v. 57, n. 4, p.

¹ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

600–607, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.12.023>>

FILEP, J. G.; SEKHERI, M.; EL KEBIR, D. **Targeting formyl peptide receptors to facilitate the resolution of inflammation**, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.06.025>>

FREITAS, A. P.; CLISSA, P. B.; SOTO, D. R.; CÂMARA, N. O. S.; FAQUIM-MAURO, E. L. The modulatory effect of crotoxin and its phospholipase A subunit from *Crotalus durissus terrificus* venom on dendritic cells interferes with the generation of effector CD4 T lymphocytes. **Immunology letters**, [s. l.], v. 240, p. 56–70, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2021.09.012>>

FREITAS, A. P.; FAVORETTO, B. C.; CLISSA, P. B.; SAMPAIO, S. C.; FAQUIM-MAURO, E. L. **Crotoxin Isolated from *Crotalus durissus terrificus* Venom Modulates the Functional Activity of Dendritic Cells via Formyl Peptide Receptors**, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2018/7873257>>

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (BRAZIL). **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://books.google.com/books/about/Manual_de_diagn%C3%B3stico_e_tratamento_de_a.html?hl=&id=cfdAAAAMAAJ>

GARCIA, F.; TOYAMA, M. H.; CASTRO, F. R.; PROENÇA, P. L.; MARANGONI, S.; SANTOS, L. M. B. Crotopotin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE2 synthesis. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 433–437, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101\(03\)00198-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101(03)00198-3)>

IBANEZ, O. M.; STIFFEL, C.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. K.; MASSA, S.; DE FRANCO, M.; SANT'ANNA, O. A.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. **Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness**, 1992. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830221014>>

LIMA, T. S.; CATANEO, S. C.; IRITUS, A. C. C.; SAMPAIO, S. C.; DELLA-CASA, M. S.; CIRILLO, M. C. Crotoxin, a rattlesnake toxin, induces a long-lasting inhibitory effect on phagocytosis by neutrophils. **Experimental biology and medicine**, [s. l.], v. 237, n. 10, p. 1219–1230, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1258/ebm.2012.012010>>

LIMA, T. S.; NEVES, C. L.; ZAMBELLI, V. O.; LOPES, F. S. R.; SAMPAIO, S. C.; CIRILLO, M. C. Crotoxin, a rattlesnake toxin, down-modulates functions of bone marrow neutrophils and impairs the Syk-GTPase pathway. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, [s. l.], v. 136, p. 44–55, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.07.002>>

LYONS, A. B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. **Journal of immunological methods**, [s. l.], v. 243, n. 1-2, p. 147–154, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0022-1759\(00\)00231-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-1759(00)00231-3)>

MELANI, R. D.; ARAUJO, G. D. T.; CARVALHO, P. C.; GOTO, L.; NOGUEIRA, F. C. S.; JUNQUEIRA, M.; DOMONT, G. B. **Seeing beyond the tip of the iceberg: A deep analysis of the venom of the Brazilian Rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus***, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.euprot.2015.05.006>>

NUNES, F. P. B.; SAMPAIO, S. C.; SANTORO, M. L.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C. **Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in**

mice, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.01.017>>

NUNES, F. P. B.; ZYCHAR, B. C.; DELLA-CASA, M. S.; SAMPAIO, S. C.; GONÇALVES, L. R. C.; CIRILLO, M. C. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 1100–1106, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.12.011>>

OKAMOTO, M.; VISKATIS, L. J.; DE LA ROZA, G.; VIDAL, J. C. Induction of tolerance to crotoxin in mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, [s. l.], v. 265, n. 1, p. 41–46, 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8474024>>

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. **Ofidismo**, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0104-42302001000100026>>

RANGEL-SANTOS, A.; DOS-SANTOS, E. C.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C.; CARDOSO, D. F.; MOTA, I. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, [s. l.], v. 43, n. 7, p. 801–810, 2004. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.03.011>>

RANGEL-SANTOS, A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; CARDOSO, D. F. **Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom**, 2004. b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.07.004>>

SAMPAIO, S. C.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; BRIGATTE, P.; LANDGRAF, R. G.; DOS SANTOS, E. C.; CURI, R.; CURY, Y. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 313–321, 2006. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.11.008>>

SAMPAIO, S. C.; BRIGATTE, P.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; DOS-SANTOS, E. C.; RANGEL-SANTOS, A. C.; CURI, R.; CURY, Y. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, [s. l.], v. 41, n. 7, p. 899–907, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101\(03\)00069-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101(03)00069-2)>

SAMPAIO, S. C.; HYSLOP, S.; FONTES, M. R. M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; ZAMBELLI, V. O.; MAGRO, A. J.; BRIGATTE, P.; GUTIERREZ, V. P.; CURY, Y. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 1045–1060, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.011>>

SAMPAIO, S. C.; RANGEL-SANTOS, A. C.; PERES, C. M.; CURI, R.; CURY, Y. Inhibitory effect of phospholipase A(2) isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 671–676, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.01.009>>

SAMPAIO, S. C.; SANTOS, M. F.; COSTA, E. P.; RANGEL-SANTOS, A. C.; CARNEIRO, S. M.; CURI, R.; CURY, Y. Crotoxin induces actin reorganization and inhibits tyrosine phosphorylation and activity of small GTPases in rat macrophages. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, [s. l.], v. 47, n. 8, p. 909–919, 2006. b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.03.004>>

SAMPAIO, S. C.; SOUSA-E-SILVA, M. C.; BORELLI, P.; CURI, R.; CURY, Y. Crotalus durissus terrificus snake venom regulates macrophage metabolism and function. **Journal of leukocyte biology**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 551–558, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11590191>>

SANT'ANNA, M. B.; LOPES, F. S. R.; KIMURA, L. F.; GIARDINI, A. C.; SANT'ANNA, O. A.; PICOLO, G. Crotoxin Conjugated to SBA-15 Nanostructured Mesoporous Silica Induces Long-Last Analgesic Effect in the Neuropathic Pain Model in Mice. **Toxins**, [s. l.], v. 11, n. 12, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/toxins11120679>>

SARTIM, M. A.; MENALDO, D. L.; SAMPAIO, S. V. Immunotherapeutic potential of Crotoxin: anti-inflammatory and immunosuppressive properties. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, [s. l.], v. 24, p. 39, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40409-018-0178-3>>

STIFFEL, C.; IBANEZ, O. M.; RIBEIRO, O. G.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetics of acute inflammation: inflammatory reactions in inbred lines of mice and in their interline crosses. **Experimental and clinical immunogenetics**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 221–233, 1990. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2083094>>

TASIMA, L. J.; HATAKEYAMA, D. M.; SERINO-SILVA, C.; RODRIGUES, C. F. B.; DE LIMA, E. O. V.; SANT'ANNA, S. S.; GREGO, K. F.; DE MORAIS-ZANI, K.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; TANAKA-AZEVEDO, A. M. Comparative proteomic profiling and functional characterization of venom pooled from captive Crotalus durissus terrificus specimens and the Brazilian crotalic reference venom. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, [s. l.], v. 185, p. 26–35, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.07.001>>