

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Toxinas de Interesse em Saúde

Marina Ferreira da Silva

Ação imunomoduladora do veneno de *Bothrops jararacussu* e suas frações em modelo *in vitro* de macrófagos peritoneais murinos

São Paulo

2023

Marina Ferreira da Silva

Ação imunomoduladora do veneno de *Bothrops jararacussu* e suas frações em modelo *in vitro* de macrófagos peritoneais murinos

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Toxinas de Interesse em Saúde.

Orientador (a): Carla Cristina Squaiella Baptistão

São Paulo

2023

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

da Silva, Marina Ferreira

Ação imunomoduladora do veneno de Bothrops jararacussu e suas frações em modelo in vitro de macrófagos peritoneais murinos / Marina Ferreira da Silva ; orientador(a) Carla Cristina Squaiella Baptistão - São Paulo, 2023.

26 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Toxinas de Interesse em Saúde.

1. Bothrops jararacussu 2. Adjuvantes. 3. Macrófagos I. Baptistão, Carla Cristina Squaiella . II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Toxinas de Interesse em Saúde. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe da Biblioteca do Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

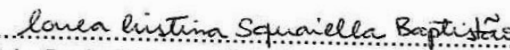
Eu, Marina Ferreira da Silva, aluno(a) do Curso de Especialização em Toxinas de interesse em saúde, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 04 de janeiro de 2023.


.....
aluno(a): Marina Ferreira da Silva

De acordo: 
.....
Orientador(a): Carla Cristina Squaiella Baptista

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e minha tia, por tudo.

A minha orientadora Carla, por todo seu apoio, paciência e aprendizado.

As meninas de toxinas, especialmente Nathalia, Natasha e Mavi.

A Kauan e Aline por todas nossas risadas e géis feitos e a todos as pessoas do Laboratório de Imunoquímica.

A Raquel, você foi maior que todo o céu, e agora faz parte dele.

E claro, a pequena praça de recreação de um hospício que eu chamo de amigos.

RESUMO

SILVA, Marina Ferreira da. **Ação imunomoduladora do veneno de *Bothrops jararacussu* e suas frações em modelo *in vitro* de macrófagos peritoneais murinos**. 2023. 29 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Com o desenvolvimento da ciência, as vacinas passaram de micro-organismos inteiros atenuados a subunidades purificadas ou recombinantes, trazendo a necessidade de novas estratégias para garantir a imunogenicidade. Com isso, o uso de adjuvantes imunológicos tornou-se crucial na composição de muitas vacinas, porém efeitos adversos desses componentes fazem necessária a pesquisa de novas substâncias que provocam os mesmos efeitos sobre o sistema imune. O objetivo do trabalho foi investigar a ação imunomoduladora de frações do veneno de *B. jararacussu* sobre macrófagos murinos, visto que as propriedades químicas desse veneno o tornam uma boa fonte de moléculas com potencial efeito adjuvante imunológico. Nesse trabalho, o veneno de *Bothrops jararacussu* foi fracionado por cromatografia de exclusão molecular, e o padrão eletroforético das frações foi analisado em gel de poliacrilamida. As frações foram testadas em culturas de macrófagos peritoneais murinos. A viabilidade celular foi avaliada por ensaio de MTT, e os sobrenadantes de cultura foram coletados para dosagem de NO e citocinas. Os resultados preliminares indicaram que a maioria das frações induziu a produção de níveis variados de NO, TNF, IL-6, IL-10 e MCP-1 nas culturas. Entretanto, como os valores obtidos ficaram acima do limite de detecção das curvas padrão, os ensaios precisam ser repetidos utilizando amostras diluídas. A obtenção de resultados confiáveis permitirá a identificação de frações com capacidade estimuladora de macrófagos, e as frações serão refracionadas para a obtenção de moléculas com potencial imunoadjuvante.

Palavras-chave: *Bothrops jararacussu*. Adjuvantes. Macrófagos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cromatograma do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	21
Figura 2 - Corrida eletroforética das frações do veneno de <i>B. jararacussu</i> em condições redutoras	24
Figura 3 - Gráfico de Viabilidade celular, Frações 1-7	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Volume aproximado das frações do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> , obtidas após separação cromatográfica.....	21
Tabela 2 - Dosagem proteica	22
Tabela 3 - Concentração proteica	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Vacinas e adjuvantes	11
1.2 Macrófagos	12
1.3 Ofidismo	13
1.4 O gênero Bothrops	14
1.5 Jararacuçu	14
1.6 Principais classes químicas presentes na peçonha	14
2 OBJETIVOS	16
2.1. Específicos	16
3 METODOLOGIA	17
3.1 Veneno	17
3.2 Cromatografia de exclusão molecular	17
3.3 Dosagem Proteica	17
3.4 Eletroforese em Gel De Poliacrilamida 12,5%	18
3.5 Camundongos	18
3.6 Coleta de macrófagos peritoneais murinos naïve	18
3.7 Viabilidade Celular	19
3.8 Dosagem de óxido nítrico	19
3.9 Cytometric Bead Array (CBA)	19
3.10 Análise estatística	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Fracionamento do veneno	21
4.2 Dosagem Proteica	22
4.3 Eletroforese em Gel De Poliacrilamida 12,5%	23

4.4 Efeitos imunomoduladores sobre macrófagos peritoneais murinos	25
5 CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vacinas e adjuvantes

Mais de 200 anos se passaram desde o desenvolvimento da primeira vacina pelo médico britânico Edward Jenner. Desde então, a vacinação continua exercendo um enorme impacto sobre a saúde e longevidade da população humana. Ao longo desse período, com o desenvolvimento da ciência e da tecnologia, o desenho de novas vacinas passou a ser mais racional do que empírico, e a segurança tornou-se tão importante quanto a eficácia. As vacinas passaram de micro-organismos inteiros atenuados a subunidades purificadas ou recombinantes, trazendo a necessidade de novas estratégias para garantir a imunogenicidade (PLOTKIN, 2014) O processo de imunização constitui parte essencial da eficácia das vacinas atuais. Nesse contexto, o uso de adjuvantes imunológicos tornou-se crucial na composição de muitas vacinas.

A palavra adjuvante deriva do latim “adjuvans”, que significa “o que ajuda”. Em imunologia, o conceito de adjuvante foi introduzido no início do século XX, quando observou-se falha na imunização com vacinas compostas por toxoides tetânico ou diftérico purificados. Naquela época, muitos compostos naturais, como ssRNA, LPS e DNA, começaram a ser testados na formulação de vacinas, com o intuito de melhorar sua eficácia. Entretanto, foram os compostos sintéticos artificiais, em particular os sais de alumínio, que se tornaram marcos na história dos adjuvantes vacinais. Os efeitos adjuvantes do alumínio foram inicialmente descritos em 1926. Em 1932, foram desenvolvidos adjuvantes à base de fosfato de alumínio e potássio, seguidos de adjuvantes de hidróxido de alumínio em 1939, utilizados nas vacinas contendo toxoide tetânico ou diftérico, pertussis acelular, hepatite A inativado, hepatite B recombinante e antrax. Desde então, os sais de alumínio, globalmente conhecidos como alum, são os adjuvantes vacinais mais utilizados e um dos poucos aprovados para uso humano pelo FDA. (SHI et al., 2019)

Muito se tem discutido a respeito dos mecanismos de ação do alum. O efeito de depósito, a ação imunoestimulante sobre células da imunidade inata e o direcionamento para respostas Th2 estão entre os efeitos mais comumente descritos para os sais de alumínio (SHI et al., 2019). É importante ter em mente que os mecanismos também podem variar de acordo com o tipo de sal.

Apesar de sua ampla utilização, o alum possui muitas limitações que justificam a busca por novos adjuvantes imunológicos. Entre elas, destacam-se o fato de que a substância não pode ser congelada (GOLD et al., 1999) seu potencial reatogênico, causando dor, febre e até mesmo granulomas no local de inoculação (HILLEMANN, 2000), e a ineficiência para geração da resposta celular correta para alguns tipos de antígenos, como os patógenos intracelulares, cuja imunidade deveria envolver a ativação de células Th1 e T citotóxicas. (DEL GIUDICE; RAPPUOLI; DIDIERLAURENT, 2018)

Os atuais conhecimentos em Imunologia permitem, sem dúvida, afirmar que a obtenção de qualquer resposta adaptativa eficiente, seja ela celular ou humoral, depende do direcionamento das respostas celulares, e a etapa de apresentação de antígenos para linfócitos T auxiliares está no centro desse direcionamento. Assim, novos adjuvantes imunológicos que desempenhem seu mecanismo de ação especificamente nessa etapa têm sido buscados.

Contudo, na prática, adjuvantes não são tão simples de serem formulados. O modelo utópico de adjuvante deve conter algumas características importantes, além de melhorar a resposta imunogênica da vacina. Basicamente, a formulação deve atender às necessidades do modelo vacinal, não apresentar risco de toxicidade, manter sua estabilidade por no mínimo 2 anos, ser biodegradável, de fácil inoculação, e, primordialmente, não reatogênica. Nesse contexto, é importante também, que o adjuvante apresente um potencial imunomodulador, e que seja capaz de induzir repostas imunes que o alum não induz (DEL GIUDICE; RAPPUOLI; DIDIERLAURENT, 2018). Dentro destas circunstâncias, inúmeras fontes de matéria-prima têm sido utilizadas na busca por novos adjuvantes imunológicos, incluindo micro-organismos e plantas, além de substâncias orgânicas e inorgânicas, mas poucos estudos têm explorado o potencial imunomodulador de componentes presentes em venenos animais. Dessa forma, os venenos animais ainda permanecem como fontes pouco exploradas de substâncias com potencial efeito imunomodulador e que poderiam servir como a base para o desenvolvimento de novos adjuvantes vacinais.

1.2 Macrófagos

Os macrófagos são células hematopoiéticas de linhagem mieloide precursoras de monócitos que circulam temporariamente na corrente sanguínea e se diferenciam

nos tecidos. Sua principal função é ingerir e matar microrganismos por geração enzimática de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e digestão proteolítica, também, ao serem ativados secretam diferentes citocinas que aumentam a quimiotaxia leucocitária e conseguem atuar no reparo de tecidos danificados. Se tratando da imunidade humoral, os macrófagos podem atuar como APCs (Célula apresentadora de antígeno) e ativar os linfócitos T. (ABUL K. ABBAS, 2020)

O modelo utilizado está largamente descrito na literatura como um dos mais adequados e simples para a obtenção de macrófagos naïve, devido à facilidade na manipulação dos camundongos e na obtenção das células, além de provocar praticamente nenhum desconforto aos animais, já que os mesmos não receberão nenhum tipo de tratamento prévio, nem sofrerão nenhum procedimento cirúrgico anterior à eutanásia. A utilização da espécie *Mus musculus* justifica-se pela já citada facilidade de manipulação, alto rendimento das células de interesse e possibilidade de expansão dos experimentos em projetos futuros, utilizando possíveis tratamentos in vivo e a utilização da linhagem BALB/c se dá pelo fato de serem camundongos isogênicos, eliminando, assim, possíveis variações de resultados decorrentes de fatores genéticos.

1.3 Ofidismo

Os acidentes ofídicos ocorrem quando as serpentes atacam o ser humano, podendo ou não inocular sua peçonha; esses acidentes provocam um desequilíbrio homeostático levando à morte se não forem tratados a tempo (TAVARES-NETO, 2014)

Segundo a OMS, estima-se que 100 mil pessoas morrem por ano devido aos agravamentos de acidente ofídicos, número que fez com que esses acidentes entrassem em 2009 para o conjunto de 20 doenças que compõem as “doenças tropicais negligenciadas”, que, por definição, são endêmicas, cujos agravos podem incapacitar o paciente e não recebem devida atenção de órgãos responsáveis (BRASIL, 2021).

No Brasil, os acidentes ofídicos são causados por diferentes tipos de serpentes, porém apenas quatro grupos apresentam interesse médico: *Micrurus*, *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus*, sendo o gênero *Bothrops* o principal causador de acidentes em números. (TAVARES-NETO, 2014)

1.4 O gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops* abrange aproximadamente 50 espécies, podendo ser encontradas em todo o território nacional. Esse gênero pertence à família Viperidae, que tem como principal característica a presença da fosseta loreal e a denticção de tipo solenóglifa (presas conectadas a uma glândula de veneno que se projetam no momento do bote).

Seu veneno é um composto complexo de proteínas, peptídeos e compostos inorgânicos cujos principais sinais de envenenamento envolvem: hemorragia, dor, edema e significantes alterações sistêmicas (DA SILVA AGUIAR et al., 2020).

O tratamento efetivo para o envenenamento é a administração intravenosa do soro anti-botrópico, feito a partir da administração de um pool de venenos de espécies do grupo, em cavalos.

1.5 Jararacuçu

A *Bothrops jararacussu*, popularmente chamada de jararacuçu, é uma das principais serpentes do grupo das jararacas. Encontrada principalmente na mata Atlântica e algumas regiões de países adjacentes como Argentina, Bolívia e Paraguai, é a segunda maior serpente peçonhenta do Brasil, podendo se aproximar dos 2 metros de comprimento e apresentando uma visível distinção sexual e uma enorme variedade policromática auxiliando em sua perfeita camuflagem no ambiente. (MILANI et al., 1997)

Assim como as demais, sua peçonha é uma substância complexa de diferentes classes de proteínas, porém diferentemente das demais espécies do gênero, o veneno da jararacuçu apresenta um potente efeito miotóxico, causando mioglobinúria e insuficiência renal aguda. (MILANI et al., 1997)

1.6 Principais classes químicas presentes na peçonha

Correa-Netto et al. (CORREA-NETTO et al., 2010) identificaram, no veneno de *B. jararacussu*, seis diferentes classes de proteínas: metaloproteases, serinoproteases, L-amino-ácido oxidases, proteínas ricas em cisteína, fosfolipase A2

e lectinas do tipo C, sendo as metaloproteases as proteínas mais frequentes, seguidas pela fosfolipase A2, e as serinoproteases e proteínas ricas em cisteína, encontradas com menos frequência (CORREA-NETTO et al., 2010).

Pidde-Queiroz *et al.* realizaram a caracterização do padrão eletroforético e atividades enzimáticas dos venenos de dezenove espécies de *Bothrops* presentes no Brasil, bem como a neutralização de tais atividades pelo soro antiofídico. Foi verificado que o veneno de *B. jararacussu* apresentou atividade tóxica, fosfolipásica, hialuronidásica e proteolítica intermediárias; o soro antiofídico neutralizou cerca de 60% da atividade fosfolipásica do veneno de *B. jararacussu*, 29% da atividade hialuronidásica, e praticamente não inibiu a atividade proteolítica. (QUEIROZ et al., 2008)

2 OBJETIVOS

Avaliar os possíveis efeitos imunomoduladores do veneno de *Bothrops jararacussu* e suas frações em modelo murino.

2.1. Específicos

- a) Foi realizado o fracionamento inicial do veneno de *B. jararacussu*, utilizando cromatografia de exclusão molecular;
- b) Foi realizada a dosagem proteica das frações obtidas e avaliação do perfil eletroforético;
- c) Utilizando modelo de cultura de macrófagos peritoneais murinos, as frações foram testadas em diferentes concentrações, e a viabilidade celular foi avaliada;
- d) Os sobrenadantes de cultura de células foram coletados para dosagem de óxido nítrico e citocinas.

3 METODOLOGIA

3.1 Veneno

O acesso ao patrimônio genético do veneno de *Bothrops jararacussu*, para fins de pesquisa científica, está cadastrado no SisGen (AFDFBB8). Mediante solicitação, o veneno liofilizado foi fornecido pela Seção de Venenos do Instituto Butantan e mantido a -20°C. Para a utilização nos experimentos, o veneno foi pesado e diluído em solução PBS estéril na concentração de 1 mg/mL, aliquotado e armazenado a -20°C.

3.2 Cromatografia de exclusão molecular

O fracionamento do veneno de *Bothrops jararacussu* foi realizado no Laboratório de Imunoquímica, em colaboração com o Pesquisador Científico Fábio Carlos Magnoli.

Vinte miligramas de veneno liofilizado foram ressuspensos em PBS estéril e submetidos a cromatografia de exclusão molecular em coluna Superose 12 HR (10/30, ÄKTA FPLC, Pharmacia, Uppsala, Suécia), equilibrada e eluída com acetato de amônio 50 mM, em sala climatizada. As amostras foram separadas a uma vazão de 24 mL/h, e o seu teor de proteínas foi monitorado através do registro da absorbância a 280 nm em um UPC-900 Amersham Pharmacia Biotech. As frações foram coletadas em tubos Falcon de 50 mL, e os volumes aproximados de cada fração foram estimados a partir da graduação dos tubos. Após a separação cromatográfica, as frações foram congeladas, liofilizadas e, por fim, ressuspensas em 700 µL de PBS estéril. Cada fração foi, então aliquotada e congelada a -80°C, até a realização dos experimentos

3.3 Dosagem Proteica

A concentração proteica das frações do veneno foi determinada pelo método de BCA (BCA Protein Assay Kit, Thermo Fischer, Pierce Protein Research Products, Rockford, IL, USA), seguindo as instruções do fabricante e utilizando albumina sérica

bovina (BSA) como padrão. A concentração resultante foi utilizada como base para determinar a quantidade das frações a ser utilizada nos ensaios.

3.4 Eletroforese em Gel De Poliacrilamida 12,5%

As frações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS-PAGE, sob condições redutoras e não redutoras com diluição específica para cada amostra. Foram aplicados 10 µg de fração em cada poço do gel, e um padrão de massa molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards – BioRAD) foi incluído na corrida, permitindo estimar a massa molecular das bandas visualizadas nas amostras. A corrida foi feita em tampão Tris-glicina, com voltagem constante (120V) com os géis corados pelo método de impregnação por prata.

3.5 Camundongos

Camundongos BALB/c, machos, adultos jovens, pesando entre 18 e 22 g, foram solicitados ao Biotério Central do Instituto Butantan, mediante aprovação dos protocolos de pesquisa junto à Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUA-IB nº1546240522). Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, em condições adequadas, com temperatura controlada, ciclo de luz, água e ração ad libitum.

3.6 Coleta de macrófagos peritoneais murinos naïve

Camundongos BALB/c naïve (n = 8) foram eutanasiados por sobredose anestésica de quetamina (300 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg), via intramuscular. A eutanásia foi realizada pela orientadora, após treinamento da via de inoculação pela Veterinária Responsável Técnica do Biotério de Imunoquímica, Renata Gêmio dos Reis. As células do exsudato peritoneal foram coletadas em duas lavagens com 5 mL de meio RPMI. As células obtidas foram lavadas e centrifugadas com meio RMPI, a 400 g, por 10 minutos, a 4°C, e ressuspensas em meio R10 (RPMI + 10% de soro fetal bovino).

A concentração celular foi calculada com base na contagem em câmara de Neubauer, na presença de azul de Trypan, e as células foram distribuídas em placas

de cultura de 96 poços (1×10^5 células/200 μ L/poço) e incubadas por duas horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. As células não aderentes foram descartadas, e as aderentes (macrófagos) lavadas com meio RPMI e adicionadas em meio R10 contendo 3 diferentes concentrações de frações de veneno de *B. jararacussu* (250 μ g/mL, 50 μ g/mL e 5 μ g/mL) em triplicatas, em volume final de 200 μ L/poço. Como controle positivo, foram utilizadas células estimuladas com LPS (5 μ g/mL), e como controle negativo, células mantidas somente com meio de cultura.

3.7 Viabilidade Celular

Os macrófagos obtidos no ensaio anterior foram incubados por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ com as frações de veneno de *B. jararacussu* em: 250 μ g/mL, 50 μ g/mL, 5 μ g/mL. Após 24 horas de incubação, os sobrenadantes de cultura foram coletados, aliquotados e congelados para posterior dosagem de óxido nítrico e citocinas. As células foram submetidas a ensaio de MTT para estimativa da viabilidade celular. Para tanto, 100 μ L de meio R10 acrescidos de 10 μ L de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT), na concentração de 5 mg/mL, foram adicionados em cada poço, e as placas foram incubadas nas mesmas condições, por 4 horas (MOSMANN, 1983).

Após esse período, 50 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados em cada poço, e as placas foram incubadas por 10 minutos nas mesmas condições. As densidades ópticas foram mensuradas em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 540 nm. A partir das absorbâncias das amostras e dos controles positivo e negativo, se calculou a viabilidade celular.

3.8 Dosagem de óxido nítrico

Os sobrenadantes das culturas, foram submetidos a ensaio de dosagem de óxido nítrico, seguindo as instruções do fabricante (BioVision).

3.9 Cytometric Bead Array (CBA)

Os sobrenadantes das culturas foram submetidos a ensaio de dosagem de citocinas e quimiocinas inflamatórias, utilizando o kit “BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit” conforme as instruções do fabricante. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo (BD FACSCanto II), e os resultados foram analisados no software BD FCAPArray.

3.10 Análise estatística

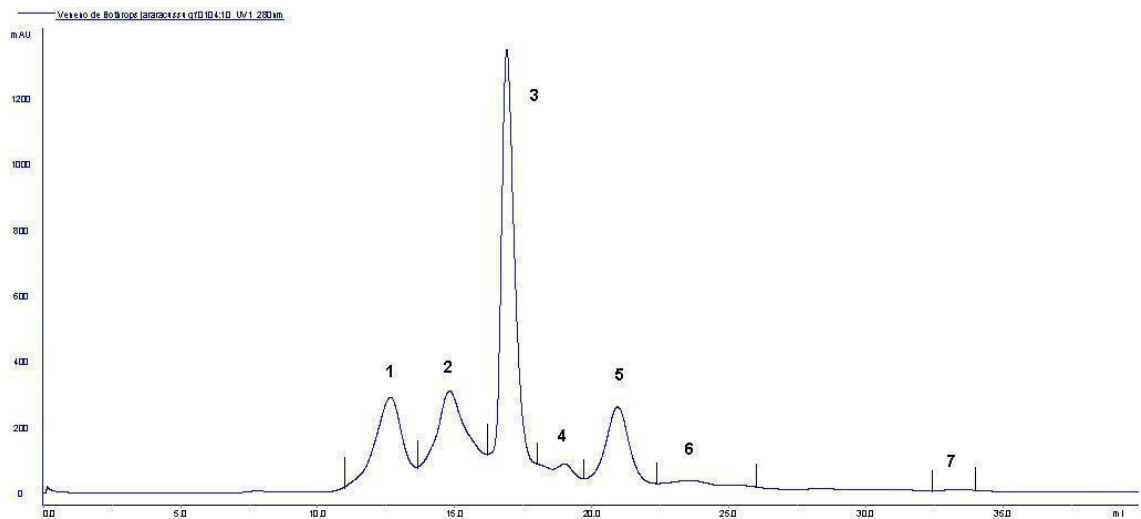
Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente, utilizando-se one-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. Foram considerados significativos os resultados com valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fracionamento do veneno

A cromatografia de exclusão molecular permitiu o fracionamento do veneno de acordo a massa molecular dos seus componentes. O monitoramento das frações proteicas a 280 nm permitiu a detecção de 7 frações, cujos picos de eluição podem ser observados na Figura 1. Os volumes de cada fração foram estimados antes do congelamento e liofilização (Tabela 1).

Figura 1 – Cromatograma do veneno de *Bothrops jararacussu*



Fonte: Fábio Carlos Magnoli

Legenda: O veneno de *Bothrops jararacussu* foi submetido a cromatografia de exclusão molecular em coluna Superose 12 HR 10/30, a uma vazão de 24 mL/h. O seu teor de proteínas foi monitorado através do registo da absorbância a 280 nm, permitindo a separação em sete frações

Tabela 1 – Volume aproximado das frações do veneno de *Bothrops jararacussu*, obtidas após separação cromatográfica.

Fração	Volume aproximado (mL)
1	33
2	30
3	20
4	20

5	30
6	45
7	25

Fonte: Fábio Carlos Magnoli

Legenda: As frações do veneno de *Bothrops jararacussu*, obtidas por separação cromatográfica por exclusão molecular, foram coletadas em tubos Falcon de 50 mL, e os volumes aproximados de cada fração foram estimados a partir da graduação dos tubos.

4.2 Dosagem Proteica

Após a liofilização, as amostras foram ressuspensas em 700 µL de PBS estéril, e a dosagem proteica foi realizada para estimar a concentração de cada fração. As frações foram diluídas em salina numa razão 1/10, para que não extrapolassem o limite de detecção da curva padrão. A Tabela 2 apresenta o resultado obtido.

Tabela 2 – Dosagem proteica

Fração	Absorbância Amostras		Amostra Diluída (µg/mL)	Concentração Final (µg/mL)
1	0,258	0,23	330,684679	3307
2	0,303	0,33	514,983557	5150
3	0,483	0,508	970,0111317	9700
4	0,148	0,157	98,08678463	981
5	0,143	0,146	77,75035671	778
6	0,104	0,101	-29,01588987	-290,159
7	0,092	0,092	-55,70745152	-557,075

Fonte: próprio autor, 2023.

Devido às últimas amostras (frações 6 e 7) apresentarem um resultado negativo, foi realizada nova dosagem dessas frações, sem a diluição em salina. A concentração final de todas as frações está representada na Tabela 3. Essa concentração, foi utilizada como base para todos os outros ensaios.

Tabela 3 – Concentração proteica das frações do veneno de *B. jararacussu*

Fração	Concentração Final($\mu\text{g/mL}$)
1	3307
2	5150
3	9700
4	981
5	778
6	600
7	95

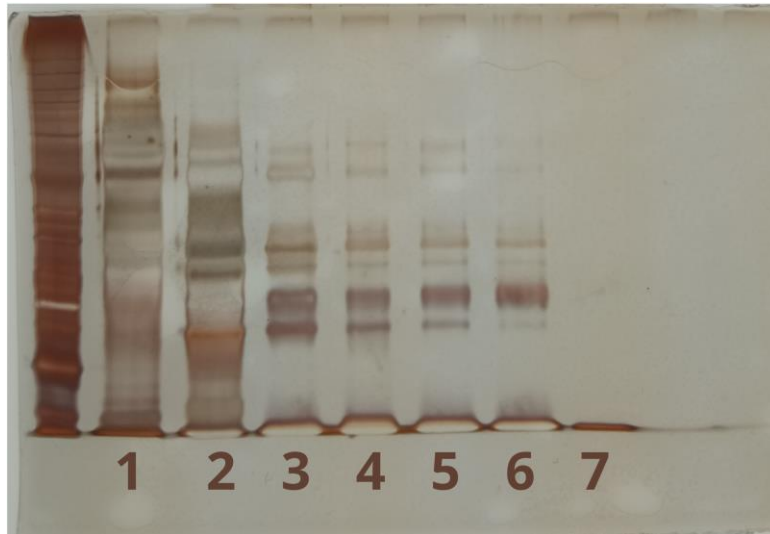
Fonte: próprio autor, 2023..

4.3 Eletroforese em Gel De Poliacrilamida 12,5%

Para que se pudesse visualizar o perfil proteico, foi realizada a corrida em gel de poliacrilamida e coloração por prata.

As amostras foram submetidas à eletroforese em tampão redutor, e o perfil proteico está representado na Figura 2. As frações de 1 a 5 foram injetadas no gel na quantidade de 10 $\mu\text{g/poço}$. As frações 6 e 7, devido à baixa concentração, foram injetadas no maior volume possível, resultando nas quantidades de 9 $\mu\text{g/poço}$ e 1,42 $\mu\text{g/poço}$, respectivamente.

Figura 2 - Corrida eletroforética das frações do veneno de *B. jararacussu* em condições redutoras



Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em condições redutoras. Cada linha marcada representa a uma fração diferente (de 1 a 7), que foram realizadas a 120 V, durante cerca de 2 horas. Os géis foram corados com prata.

Apesar do padrão molecular ter apresentado uma coloração excessiva, dificultando a estimativa das massas moleculares, foi possível verificar que o fracionamento por exclusão molecular levou a um enriquecimento de bandas com maior massa molecular nas frações 1 e 2, e bandas de massa molecular intermediária nas frações 3 a 6. A cromatografia por exclusão molecular não deve ser a única estratégia para o isolamento de toxinas e corresponde somente à primeira etapa de fracionamento. A partir dos resultados obtidos nos experimentos de ativação de macrófagos, as frações serão selecionadas para novas etapas de fracionamento e purificação. A fração 7 não apresentou nenhuma banda nessa corrida, devido à pequena quantidade de proteína na amostra e/ou à baixa massa molecular de seus componentes.

Tendo como base a eletroforese, podemos concluir que mesmo com o fracionamento, algumas proteínas continuaram repetidas em várias frações.

Cada classe de toxinas exerce um diferente papel inflamatório. As fosfolipases A₂, por exemplo causam diferentes tipos de atividades enzimáticas que levam a formação de edema, atividade miotóxica e hidrólise de ácidos graxos, os precursores dos principais mediadores inflamatórios(SOARES at al., 2005). Já as lectinas tipo C

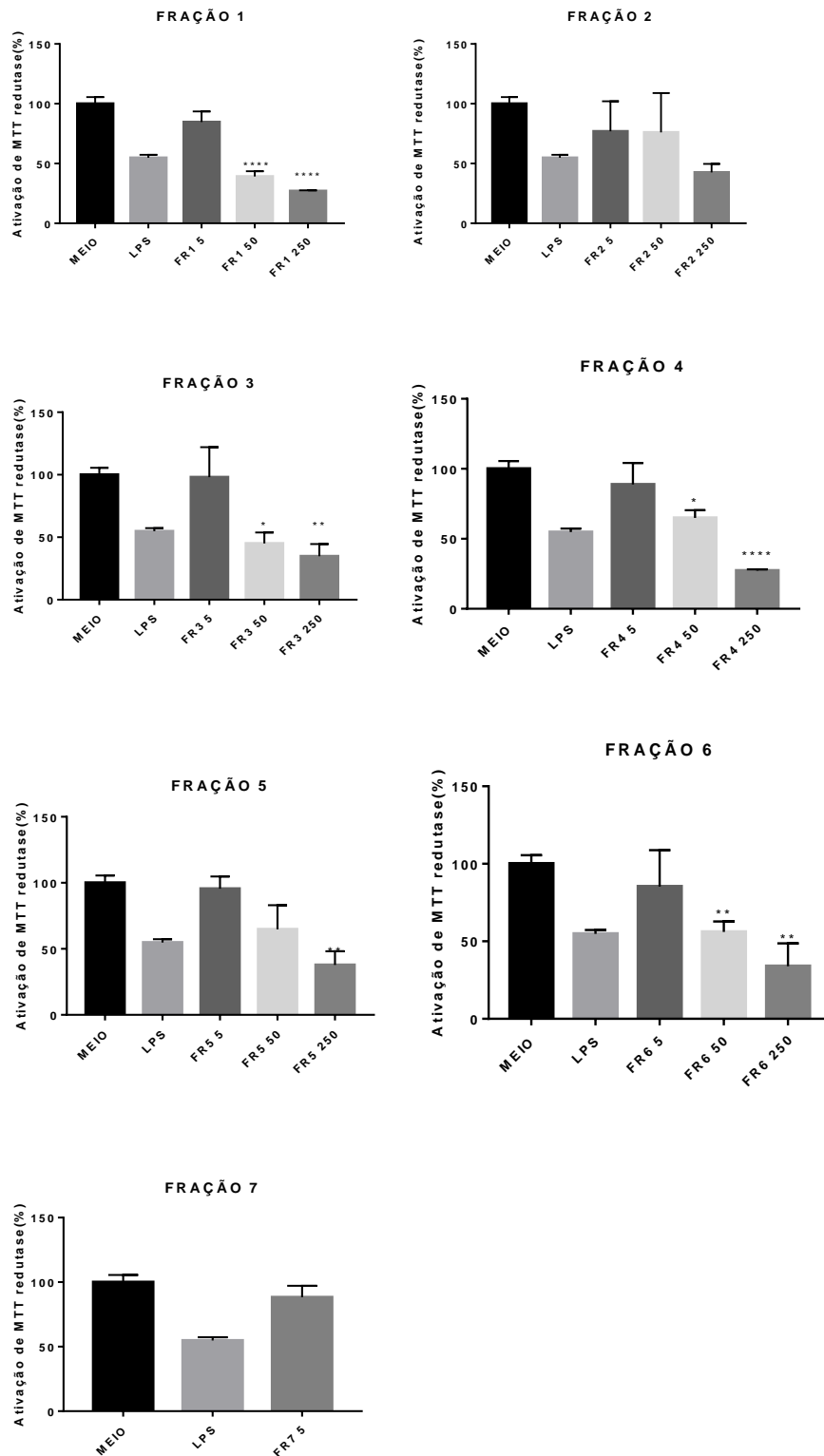
ativam mastócitos e provocam aumento da permeabilidade vascular pela mediação de histamina e fator ativador de plaqueta (PAF) (KWASNIEWSKI et al., 2022)

Essas substâncias possuem diferentes massas moleculares com isso, não se pode descartar a possibilidade de encontrar várias frações com perfil inflamatório nos ensaios de ativação de macrófagos.

4.4 Efeitos imunomoduladores sobre macrófagos peritoneais murinos

As frações foram testadas em culturas de macrófagos peritoneais murinos, em diferentes concentrações (5 µg/mL, 50 µg/mL e 250 µg/mL) comparada com controle positivo e negativo (LPS), a fim de determinar sua toxicidade. Devido à baixa concentração, a fração 7 foi testada somente na concentração de 5 µg/mL. As frações 1, 3, 4 e 6 foram tóxicas nas concentrações de 50 µg/mL e 250 µg/mL, como demonstrado pela queda estatisticamente significativa da viabilidade de macrófagos, após 24 horas de estímulo com as frações. A fração 5 apresentou toxicidade na concentração de 250 µg/mL. As frações 2 e 7 não foram tóxicas nas concentrações testadas (Figura 3).

Figura 3 – Gráfico de Viabilidade celular, Frações 1-7



Fonte: próprio autor, 2023

Legenda: Macrófagos peritoneais murinos foram incubados durante 24 horas com diferentes concentrações de fração de veneno de *B. jararacussu*. A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média de três triplicatas.

Os sobrenadantes das culturas foram coletados para dosagem de óxido nítrico, citocinas e quimiocinas. A dosagem de óxido nítrico apresentou resultados muito fora da curva, indicando a necessidade de repetir o experimento com as amostras diluídas. Ainda que fora da curva, todas as amostras foram capazes de induzir a produção de óxido nítrico (dados não mostrados). Resultados semelhantes já foram observados com venenos de outras espécies de *Bothrops*. Zamuner *et al.* observaram que, após 48 horas, macrófagos oriundos do lavado peritoneal de camundongos, estimulados com veneno de *Bothrops asper* ou *Bothrops jararaca*, produziram NO. (ZAMUNER *et al.*, 2001)

A presença de óxido nítrico indica que o veneno consegue acionar o metabolismo oxidativo de leucócitos, processo esse que se dá pela produção de intermediários reativos de oxigênio (ELIFIO-ESPOSITO *et al.*, 2011)

As amostras também foram submetidas a ensaio de CBA para dosagem de quimiocinas e citocinas. Foi possível verificar que a maioria das amostras induziu a produção de TNF, IL-6, IL-10 e MCP-1, porém os resultados também ficaram acima da curva e precisam ser repetidos com as amostras diluídas (dados não mostrados). Nenhuma amostra induziu a produção de IL-12p70 e IFN- γ .

Segundo Stone *et al* a concentração plasmática de citocinas em humanos envenenados demonstrou elevadas concentrações de IL-6, IL-10 e TNF- α (STONE *et al.*, 2013) Para Zamuner *et al*, houve aumento de TNF- α , ocorrendo a ativação de leucócitos e expressão de moléculas de adesão envolvidas no recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação (ZULIANI *et al.*, 2005).

5 CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que algumas frações de veneno de *B. jararacussu* conseguem interferir na viabilidade de macrófagos murinos, além de estimularem a produção de óxido nítrico, TNF, IL-6, IL-10 e MCP-1 *in vitro*, após estímulo por 24 horas. Apesar dos dados não serem ainda confiáveis, devido à necessidade de diluição das amostras, os resultados preliminares obtidos no presente projeto são promissores. A busca por moléculas isoladas do veneno de *B. jararacussu* com potencial imunomodulador parece ser promissora para o desenvolvimento de novos adjuvantes imunológicos. Porém, mais estudos se tornam necessários para estabelecer as ações diretas do veneno sobre esse tipo celular

REFERÊNCIAS¹

- ABUL K. ABBAS. **Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, Sixth Edition.** [s.l: s.n.]. v. 110
- BRASIL. Boletim Epidemiológico Doenças tropicais negligenciadas. **Ministério da Saúde**, 2021.
- CORREA-NETTO, C. et al. Immunome and venom of Bothrops jararacussu: A proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. **Toxicon**, v. 55, n. 7, 2010.
- DA SILVA AGUIAR, W. et al. Ontogenetic study of Bothrops jararacussu venom composition reveals distinct profiles. **Toxicon**, v. 186, 2020.
- DEL GIUDICE, G.; RAPPUOLI, R.; DIDIERLAURENT, A. M. **Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. Seminars in Immunology**, 2018.
- ELIFIO-ESPOSITO, S. et al. Human neutrophil migration and activation by BJcuL, a galactose binding lectin purified from Bothrops jararacussu venom. **BMC Immunology**, v. 12, 2011.
- GOLD, M. S. et al. Electronic temperature monitoring and feedback to correct adverse vaccine storage in general practice. **Medical Journal of Australia**, v. 171, n. 2, 1999.
- HILLEMANN, M. R. **Vaccines in historic evolution and perspective: A narrative of vaccine discoveries.** Vaccine. **Anais...2000.**
- KWASNIEWSKI, F. H. et al. Bothrops jararacussu snake venom lectin induces mast cell activation and vascular permeability enhance in an animal model. **Toxicon**, v. 205, 2022.
- MAGNOLI, F. C. Fracionamento do veneno. **Ação imunomoduladora do veneno de Bothrops jararacussu e suas frações em modelo in vitro de macrófagos peritoneais murinos.** 2023.
- MILANI, R. et al. Snake bites by the jararacucu (Bothrops jararacussu): Clinicopathological studies of 29 proven cases in Sao Paulo State, Brazil. **QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians**, v. 90, n. 5, 1997.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, 1983.

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

PLOTKIN, S. **History of vaccination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2014.

QUEIROZ, G. P. et al. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from Bothrops genus. **Toxicon**, v. 52, n. 8, 2008.

SHI, S. et al. **Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. Vaccine**, 2019.

SOARES, A.; FONTES, M.; GIGLIO, J. Phospholipase A2 Myotoxins from Bothrops Snake Venoms: Structure- Function Relationship. **Current Organic Chemistry**, v. 8, n. 17, 2005.

STONE, S. F. et al. Immune Response to Snake Envenoming and Treatment with Antivenom; Complement Activation, Cytokine Production and Mast Cell Degranulation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, 2013.

TAVARES-NETO, J. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. **Revista Baiana de Saúde Pública**, 2014.

ZAMUNER, S. R. et al. Bothrops asper and Bothrops jararaca snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. **Toxicon**, v. 39, n. 10, 2001.

ZULIANI, J. P. et al. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A 2 isolated from Bothrops asper snake venom: Role of catalytic activity. **Toxicon**, v. 45, n. 3, 2005.