

**Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Biotecnologia para a Saúde- Vacinas e Biofármacos**

Grazielly Monteiro de Sales

**Avaliação da diferenciação das células da medula óssea de camundongos
AIRmax e AIRmin tratados com DMBA e/ou crotoxina**

**São Paulo
2022**

Grazielly Monteiro de Sales

**Avaliação da diferenciação das células da medula óssea de camundongos
AIRmax e AIRmin tratados com DMBA e/ou crotoxina**

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

Orientador: Orlando Garcia Ribeiro Filho

São Paulo

2022

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

de Sales, Grazielly Monteiro

Avaliação da diferenciação das células da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin tratados com DMBA e/ou crotoxina / Grazielly Monteiro de Sales ; orientador(a) Orlando Garcia Ribeiro Filho - São Paulo, 2022.

27 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Crotoxina 2. Câncer. 3. Diferenciação celular. 4. DMBA 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.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Grazielly Monteiro de Sales, aluna do Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos 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.

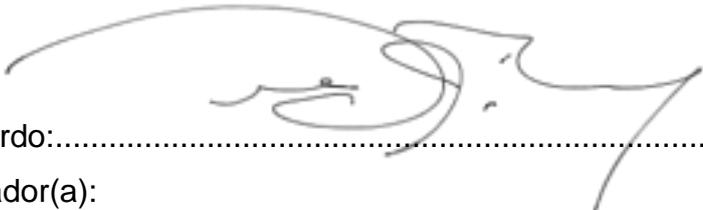
Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
 06 meses
 12 meses
 Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 14 de Dezembro de 2022

.....
aluno(a) Grazielly M. Sales

De acordo:.....
Orientador(a):



Aos meus pais por todo apoio e carinho recebido durante essa etapa intrínseca na minha vida profissional e pessoal. Serei eternamente grata!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Orlando Garcia Ribeiro Filho pelo apoio, dedicação e ensinamentos.

Aos amigos e colegas do curso que tornaram essa experiência ainda melhor.

À minha namorada pelo apoio, paciência e cuidado.

À Ana Paula, Jessica, Nathalia, Nayara, Suelen, aos colegas do Laboratório de Imunogenética e a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

“O que sabemos é uma gota. O que não sabemos é um oceano”.

Dark

RESUMO

DE SALES, Grazielly Monteiro. **Avaliação da diferenciação das células da medula óssea de camundongos AIRmax E AIRmin tratados com DMBA e/ou crotoxina.** 2022. 29 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

O desenvolvimento da leucemia está relacionado a fatores ambientais e genéticos. Quando expostos a hidrocarbonetos aromáticos (HPA), como o carcinogênico e imunossupressor 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA), os indivíduos podem desenvolver neoplasias. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos modulatórios da crotoxina sob a ação da DMBA na medula óssea de camundongos da linhagem AIR. A crotoxina é o principal componente do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, responsável pela alta toxicidade, e tem efeito imunomodulador, anti-inflamatório e analgésico com importante potencial terapêutico. Neste trabalho, foram utilizados camundongos fenotipicamente selecionados para resposta inflamatória aguda máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) e que apresentam alelos de baixa afinidade (*Ahr^d*) ou alta (*Ahr^{b1}*) ao receptor de hidrocarboneto de aril (AHR), conferindo resistência ou suscetibilidade ao risco de desenvolver câncer. Os camundongos foram tratados por via intraperitoneal com 50mg/kg de DMBA e subcutaneamente com 54µg/kg de Crotoxina e após 48 horas, células da medula óssea foram obtidas para contagens totais e diferenciais. Os resultados mostraram que o tratamento com DMBA causou a depleção de populações imaturas de neutrófilos e monócitos da medula óssea apenas em camundongos AIRmin. A administração de crotoxina proporcionou uma recuperação dessas populações nesses camundongos. Os resultados também mostraram a importância do polimorfismo do gene *Ahr* em relação à resistência ou suscetibilidade aos HPA, sugerindo uma inibição do ciclo celular pela DMBA e uma reversão desse efeito pela Crotoxina. Assim, novas abordagens devem ser exploradas para avaliar o papel do DMBA no ciclo celular de diferentes populações celulares e o papel da Crotoxina como ação protetora.

Palavras-chave: Crotoxina. Câncer. Diferenciação celular. DMBA.

ABSTRACT

DE SALES, Grazielly Monteiro. **Evaluation of the differentiation of bone marrow cells from AIRmax and AIRmin mice treated with DMBA and/or crotoxin.** 2022. 29 p. Monograph (Specialist in Biotechnology for Health – Vaccines and Biopharmaceuticals) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

The development of leukemia is related to environmental and genetic factors. When exposed to aromatic hydrocarbons (PAH), such as the carcinogen and immunosuppressant 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA), the individuals can develop neoplasias. The objective of the present study was to investigate the modulatory effects of crotoxin under the action of DMBA in the bone marrow of mice of the AIR lines. Crotoxin is the main component of *Crotalus durissus terrificus* venom, responsible for high toxicity, and has an immunomodulatory, anti-inflammatory, and analgesic effect with significant therapeutic potential. In this work, we used mice phenotypically selected for maximum (AIRmax) or minimum (AIRmin) acute inflammatory response and that have low (*Ahr^d*) or high (*Ahr^{b1}*) affinity alleles of the aryl hydrocarbon receptor (AHR), conferring resistance or susceptibility to the risk of developing cancer. Mice were treated intraperitoneally with 50mg/kg DMBA and subcutaneously with 54µg/kg of Crotoxin and after 48 hours, bone marrow cells were obtained for total and differential counts. The results showed that DMBA treatment caused the depletion of immature neutrophil and monocyte bone marrow populations only in AIRmin mice. The administration of crotoxin provided a recovery of these populations in these mice. The results also showed the importance of the polymorphism of the *Ahr* gene concerning resistance or susceptibility to PAHs, suggesting an inhibition of the cell cycle by DMBA and a reversal of this effect by Crotoxin. Thus, new approaches should be explored to evaluate the DMBA's role in the cell cycle of different cell populations and the role of Crotoxin as a protector action.

Keywords: Crotoxin. Cancer. Cell Differentiation. DMBA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Seleção das linhagens AIRmax e AIRmin.....	13
Figura 2 - Resposta da medula óssea de AIRmax e AIRmin aos efeitos do DMBA e Crotoxina.....	17
Figura 3 - Análise morfológica das células da medula óssea de camundongos AIRmax	18
Figura 4 - Contagem diferencial das células da medula óssea de AIRmax e AIRmin	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Hidrocarbonetos Poli-cíclicos Aromáticos (HPA)	10
1.2	Receptor de Hidrocarbonetos Aromáticos (AHR)	11
1.3	Crotoxina.....	12
1.4	Camundongos fenotipicamente selecionados para máxima ou mínima reatividade inflamatória aguda como modelo experimental	12
2	OBJETIVOS.....	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1	Camundongos	15
3.2	Tratamento com DMBA.....	15
3.3	Tratamento com Crotoxina.....	15
3.4	Avaliação da diferenciação celular	16
3.5	Análise estatística	16
4	RESULTADOS.....	17
4.1	Efeito do DMBA e/ou da Crotoxina na resposta celular em AIRmax e AIRmin.....	17
5	DISCUSSÃO	21
6	CONCLUSÃO	23
	REFERÊNCIAS.....	24

1 INTRODUÇÃO

O risco do desenvolvimento de câncer em humanos é associado a fatores ambientais como radiação ou exposição a substâncias tóxicas do tipo dos hidrocarbonetos aromáticos (HPA) juntamente com fatores genéticos (BALMAIN; NAGASE, 1998) que conferem resistência ou susceptibilidade ao desenvolvimento de alterações hematológicas, como o acúmulo de células nas formas blásticas anormais, levando ao desenvolvimento de quadros leucêmicos linfóides ou mielóides nas suas formas agudas ou crônicas (WISEMAN; HALLIWELL, 1996).

As células mielóides compõem a imunidade inata, caracterizada por ser a primeira linha de defesa do organismo, independentemente de estímulo prévio (CRUVINEL *et al.*, 2010) que incluem fagócitos mononucleares e polimorfonucleares. Os macrófagos são fagócitos mononucleares derivados de monócitos do sangue, envolvidos na eliminação de células/partículas estranhas ao organismo (NEVES, 2015) e iniciam a resposta imune adaptativa apresentando antígeno às células T CD4+, através da liberação de citocinas quimiotáticas. Os fagócitos polimorfonucleares são recrutados para o local da infecção. Os polimorfonucleares incluem os neutrófilos que são de fundamental importância na contenção da infecção (BEUTLER, 2004). Os neutrófilos são as primeiras células a responder à infecção ou inflamação com rápida geração e secreção de mediadores pró-inflamatórios (LAWRENCE *et al.*, 2020), e estão presentes na medula óssea com núcleo segmentado (indicativo de neutrófilos maduros), e o núcleo em forma de anel como células imaturas (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Os linfócitos são células linfóides que fazem parte da imunidade adaptativa e atuam na produção de anticorpos, na morte mediada por células, incluindo células tumorais ou infectadas e na regulação da resposta imune (ABBAS, 2015).

1.1 Hidrocarbonetos Poli-cíclicos Aromáticos (HPA)

Os Hidrocarbonetos Poli-cíclicos Aromáticos (HPA) são contaminantes ambientais produzidos durante processos de combustão incompleta de matérias orgânicas, especialmente na fumaça do cigarro (BOSTRÖM *et al.*, 2002; HEIDEL *et al.*, 2000). A maioria dos membros da família HPA são potentes carcinógenos e

imunotóxicos para humanos e outras espécies (KERKVLIE *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2005; SPARFEL *et al.*, 2010) e provocam uma variedade de efeitos biológicos relacionados a desordens hematológicas. Tanto os dados toxicológicos quanto os epidemiológicos associaram a exposição aos HPAs a várias formas de câncer, doenças cardiovasculares, asma/efeitos imunológicos, efeitos neurológicos, efeitos reprodutivos e de desenvolvimento (N'JAI *et al.*, 2010). Dentre elas, ressaltamos a leucemia, anemia aplásica, trombocitopenia e leucopenia.

O 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) é um protótipo de HPA sintético que possui efeitos citotóxicos e genotóxicos (GALVÁN *et al.*, 2006; SPARFEL *et al.*, 2010) relatado como sendo um carcinógeno e imunossupressor (DEAN *et al.*, 1985; LADICS *et al.*, 1991; GALVÁN *et al.*, 2003), causando depleção nas células da medula óssea. Após a exposição ao estresse genotóxico causado pelo DMBA, as células bloqueiam a replicação do DNA para permitir seu reparo (AGRAWAL; PANDEY, 2009) devido à formação de adutos no DNA que induzem mutações, e inicia um processo leucêmico (HEIDEL *et al.*, 2000).

1.2 Receptor de Hidrocarbonetos Aromáticos (AHR)

O receptor de hidrocarboneto aril (AHR) é um fator de transcrição ativado por ligante que medeia os efeitos tóxicos do HPA (TAMMY, 2020) modulados por variantes alélicas do gene *Ahr* (KATZ *et al.*, 2014) e altamente polimórfico em camundongos e humanos (THOMAS *et al.*, 2002; YOON *et al.*, 2002).

Em seu estado inativado, o AHR reside no citosol até ser ligado ao DMBA (DENISON; NAGY, 2003; NGUYEN; BRADFIELD, 2008; STEJSKALOVA *et al.*, 2011). A ligação induz uma mudança conformacional e translocação do AHR para o núcleo onde forma um heterodímero com o translocador nuclear de AHR (ARNT) (SWANSON *et al.*, 1995; BACSI; HANKINSON, 1996) e se liga a uma sequência específica do DNA localizada na região dos genes alvos do AHR, como CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1, que são enzimas envolvidas no metabolismo dos PAHs (HANKINSON, 1995, YOON *et al.*, 2002; GALVÁN *et al.*, 2003; SHIMADA *et al.*, 2003). Há evidências que apoiam um papel fisiológico do AHR em vários processos celulares, como regulação do ciclo celular e diferenciação celular, bem como estados de doença associados a esses processos (BAROUKI *et al.*, 2007).

1.3 Crotoxina

As serpentes do gênero *Crotalus*, conhecidas popularmente como cascavéis, pertencem à família *Viperidae* representada por somente uma espécie no Brasil, *Crotalus durissus*, e as subespécies encontradas com maior frequência *C. d. terrificus*, *C. d. cascavella* e *C. d. collilineatus* distribuídas de forma irregular pelo território brasileiro. Essas serpentes são responsáveis por aproximadamente 7,7% dos acidentes ofídicos brasileiros e apresentam o maior entre todos os demais acidentes ofídicos dentro do coeficiente de letalidade (PINHO; PEREIRA, 2001).

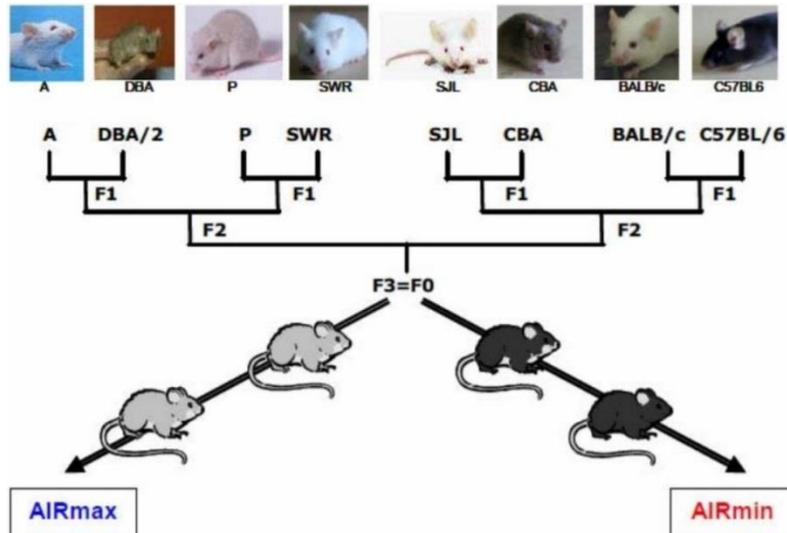
A crotoxina é o componente principal do veneno da cascavel responsável pela alta toxicidade (BON *et al.*, 1989) e corresponde a 60% da composição total do veneno que contribui com cerca de 80% da letalidade do veneno bruto (BRAZIL, 1934). Apesar de apresentar atividades neurotóxica, miotóxica e coagulante (MALAQUE; GUTIÉRREZ, 2015), vários estudos experimentais e dados clínicos têm evidenciado que a crotoxina apresenta, em doses não-tóxicas, efeito imunomodulatório, anti-inflamatório e analgésico (CARDOSO *et al.*, 2001; Nunes *et al.*, 2010; SAMPAIO *et al.*, 2010; SANT'ANNA *et al.*, 2019). Além disso, foi demonstrado que a crotoxina modula as atividades de macrófagos e neutrófilos (SILVA *et al.*, 1996; NUNES *et al.*, 2010). Portanto, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar as contribuições da Crotoxina na resposta anti-inflamatória (SARTIM *et al.*, 2018).

1.4 Camundongos fenotipicamente selecionados para máxima ou mínima reatividade inflamatória aguda como modelo experimental

Linhagens de camundongos fenotipicamente selecionados para máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) reatividade inflamatória aguda, segundo o número de leucócitos infiltrados e o teor de proteínas extravasadas em resposta à injeção subcutânea de microesferas de poliacrilamida (Biogel) após 24 horas (IBANEZ *et al.*, 1992), foram obtidas por Seleção Fenotípica Bidirecional a partir de uma população geneticamente heterogênea (F0) constituída por cruzamentos equilibrados entre oito linhagens isogênicas (A/J, BALB/cJ, C57BL/6J, CBA/J, DBA/2J, P/J, SJL/J e SWR/J), híbridos F1 e segregantes F2 (STIFFEL *et al.*, 1990) repetidos em gerações consecutivas, até ser atingido o limite máximo de separação entre as duas linhagens

ao redor da vigésima geração de acasalamentos seletivos, de acordo com o esquema abaixo:

Figura 1 - Seleção das linhagens AIRmax e AIRmin



Fonte: Ibanez, O.M., 1992

Observou-se a conservação dos fenótipos extremos nas gerações posteriores, indicando que os genes relacionados aos caracteres selecionadores foram fixados em homozigose em cada linhagem mantendo-se, entretanto, um fundo genético heterogêneo (IBANEZ *et al.*, 1992). Estes animais apresentaram predominância de alelos de resistência ou de susceptibilidade ao desenvolvimento tumoral em diferentes tecidos (BANGRAZI *et al.*, 1990, DRAGANI *et al.*, 1995, DRAGANI; MANENTI, 1997, BIOZZI *et al.*, 1998, MARIA *et al.*, 2001) e foram constatadas diferenças significativas em estudos sobre os mecanismos inflamatórios e imunes que interferem no desenvolvimento de doenças auto-imunes sendo os AIRmax mais suscetíveis (VIGAR *et al.*, 2000).

A seleção fenotípica resultou na segregação dos alelos de baixa (Ahr^d) e alta (Ahr^{b1}) afinidade de ligação ao receptor de hidrocarbonetos aromáticos em camundongos AIRmax e AIRmin, respectivamente (DE SOUZA *et al.*, 2009; KATZ *et al.*, 2014). Portanto, estes camundongos constituem um modelo apropriado e original para serem utilizados no estudo da influência dos caracteres inflamatórios selecionados na predisposição à carcinogênese.

2 OBJETIVOS

Neste trabalho nos propomos a analisar os efeitos do DMBA, da crotoxina e a associação DMBA+Crotoxina sobre a medula óssea dos animais AIRmax e AIRmin, já que as linhagens apresentam polimorfismo genético no gene *Ahr* que determina AHR de baixa (AIRmax) ou alta (AIRmin) afinidade à ligação ao DMBA. Para isso foram realizados as seguintes abordagens:

- a) o tratamento com DMBA por via intraperitoneal e a Crotoxina por via subcutânea, observando eventuais sinais tóxicos nos animais;
- b) a obtenção das células da medula óssea, contagem e caracterização microscópica por coloração HE e;
- c) a avaliação da diferenciação das células por microscopia óptica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Camundongos

Foram utilizados camundongos AIRmax e AIRmin machos da 48^o geração de seleção genética, produzidos e mantidos no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan sob as condições padrões de criação. Os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com os princípios da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB, protocolo nº 2282280622).

3.2 Tratamento com DMBA

Os camundongos foram injetados com 50mg/kg 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, EUA) intra-peritoneal em azeite ou com um volume equivalente do veículo no grupo de controle na proporção de 100µL/10g peso corporal. Essa dose foi escolhida devido à toxicidade máxima nas células da medula óssea de camundongos do tipo selvagem (HEIDEL *et al.*, 2000; KATZ *et al.*, 2014).

3.3 Tratamento com Crotoxina

A crotoxina foi purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* no Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, por cromatografia de troca aniônica conforme descrito anteriormente (FAURE; BON, 1987; ARAÚJO *et al.*, 1987). Os camundongos foram injetados com Crotoxina na dose de 0,1 da DL50 por via subcutânea, ou seja, 54µg/kg de peso corpóreo em solução salina tamponada com fosfato (PBS), na proporção de 0,2 mL por animal, concentração determinada com base nos dados já existentes na literatura da DL50 da crotoxina em camundongos C57BL/6 (SANT'ANNA *et al.*, 2019).

3.4 Avaliação da diferenciação celular

Em condições não estéreis, as células da medula óssea foram obtidas pela perfusão dos fêmures com PBS. Após homogeneização, as suspensões foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram submetidas à lise das hemácias em tampão de lise (4,15 g de Cloreto de amônia, 0,84 g de Bicarbonato de Sódio e 1 mL EDTA 0,5M pH 8,0 em 500 mL de H₂O destilada) e, após centrifugação, foram ressuspendidas em 1 mL PBS. As células foram recolhidas e diluídas em Azul de Trypan a 0,2% para contagem em câmara hemocitométrica de Malassez para determinação do total de células/mL. Alíquotas das suspensões foram utilizadas na preparação de lâminas para a determinação das subpopulações celulares presentes na medula óssea. Para tanto, suspensões na concentração de 5×10^4 /mL foram submetidas a citocentrifugação 800 rpm por 5 minutos e coradas com kit Panótico. Foram analisadas no mínimo 200 células e determinada a porcentagem de cada população celular.

3.5 Análise estatística

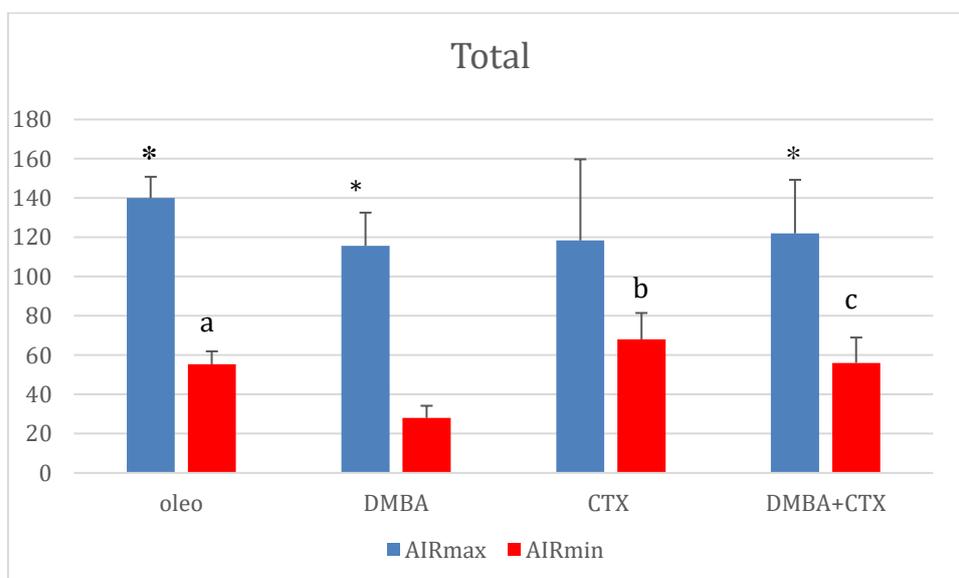
As diferenças entre as médias foram calculadas pelo teste ANOVA, considerando significativos aqueles valores de $p < 0,05$ bicaudal.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do DMBA e/ou da Crotoxina na resposta celular em AIRmax e AIRmin

Para avaliar a ação do DMBA ou da Crotoxina nas células da medula óssea de AIRmin e AIRmax determinamos o número absoluto das células obtidas da medula óssea, representada na figura 2. Para tanto, as células foram coradas e contadas em câmara de Malassez após 48 horas do tratamento com 50mg/kg de DMBA por via intraperitoneal associado ou não à 54µg/kg de Crotoxina por via subcutânea. Assim foi possível observar uma depleção nas células da medula óssea de camundongos AIRmin tratados com DMBA, diferentemente dos animais AIRmax que não apresentaram diferença significativa no número total de células. Não houve diferença significativa entre AIRmin tratado com Crotoxina em relação aos não tratados, e nem mesmo entre os tratados com DMBA e Crotoxina e os tratados somente com DMBA. Houve diferença significativa entre as linhagens AIRmax e AIRmin em todos os tratamentos, exceto crotoxina, visto que AIRmin apresenta o receptor de alta afinidade ao DMBA.

Figura 2 - Resposta da medula óssea de AIRmax e AIRmin aos efeitos do DMBA e Crotoxina



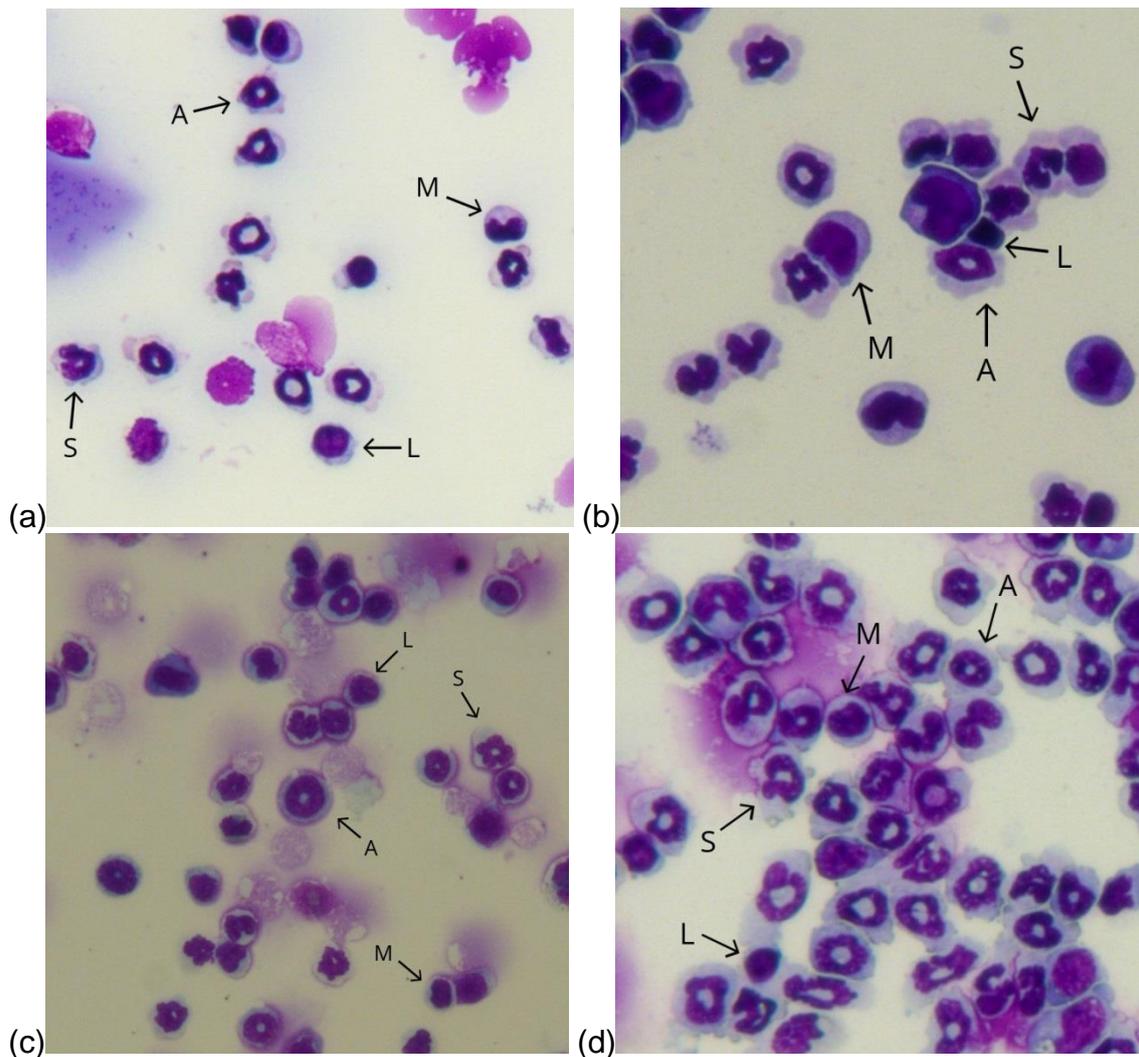
Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Contagem total das células da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin em resposta a 50mg/kg de DMBA e/ou 54µg/kg de Crotoxina após 48 horas do tratamento por via intra-

peritoneal e subcutânea, respectivamente. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. * diferença entre AIRmax e AIRmin; ^a diferença entre AIRmin óleo e DMBA; ^b diferença entre AIRmin CTX e DMBA e ^c diferença entre AIRmin DMBA+CTX e DMBA. Considerado significativo quando $p < 0,05$.

Com o auxílio de citocentrífuga e coloração por kit Panótico, foram realizadas preparações de lâminas citológicas das células da medula óssea dos camundongos AIRmax e AIRmin após 48 horas dos tratamentos com DMBA, crotoxina e a associação DMBA e Crotoxina para determinação das porcentagens das diferentes populações das séries mielóide e linfóide. Foram analisadas cerca de 200 células por animal quanto à morfologia nuclear e a coloração dos grânulos citoplasmáticos (figura 3). Consideramos neste trabalho os neutrófilos com núcleo em anel ou segmentado, macrófagos, monócitos e linfócitos.

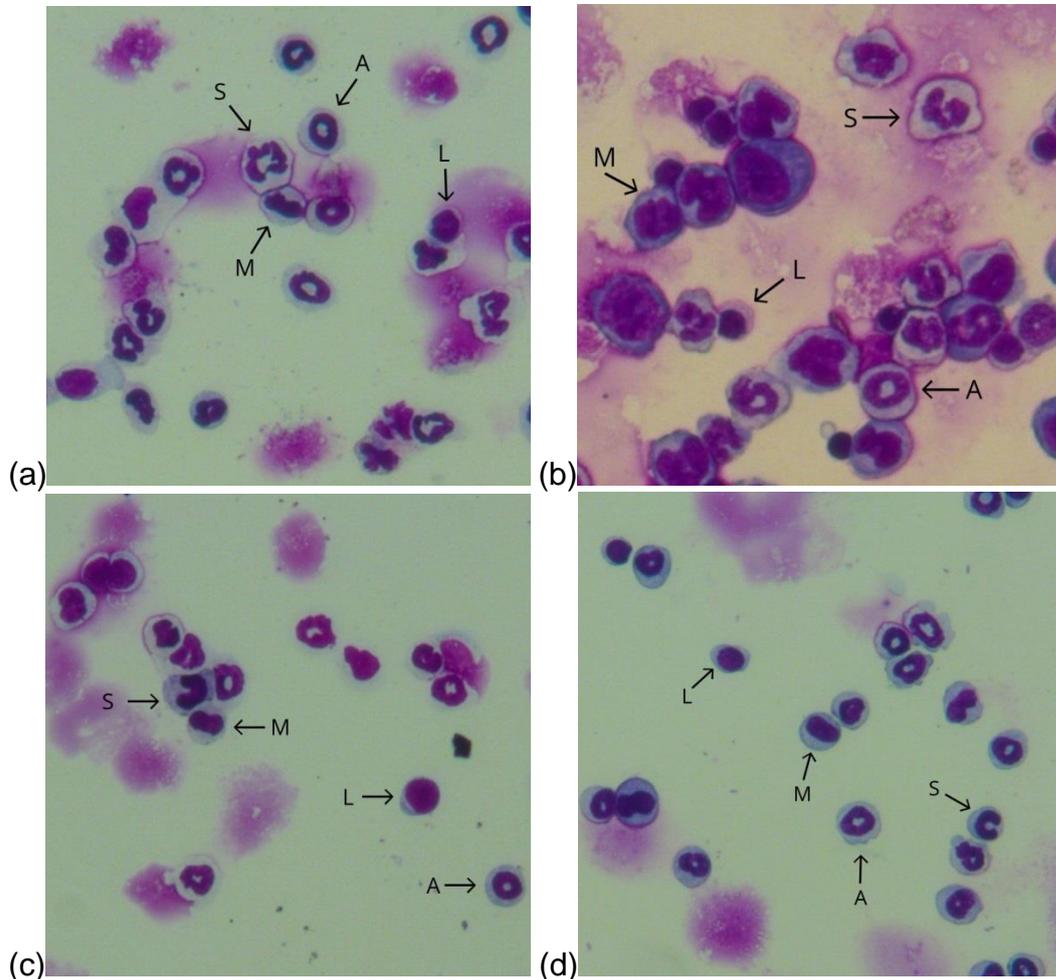
Figura 3 - Análise morfológica das células da medula óssea de camundongos AIRmax



Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Figura 3 A - Morfologia das células das séries mielóide e linfóide obtidas da medula óssea de camundongos AIRmax não tratados (a) ou após 48 horas de tratamento com 50mg/kg de DMBA por

via intraperitoneal (b), com 54µg/kg de Crotoxina por via subcutânea (c) e tratados com DMBA e Crotoxina (d). As células identificadas são neutrófilos segmentados (S), neutrófilos com núcleo em anel (A), macrófagos e monócitos (M), e linfócitos (L).



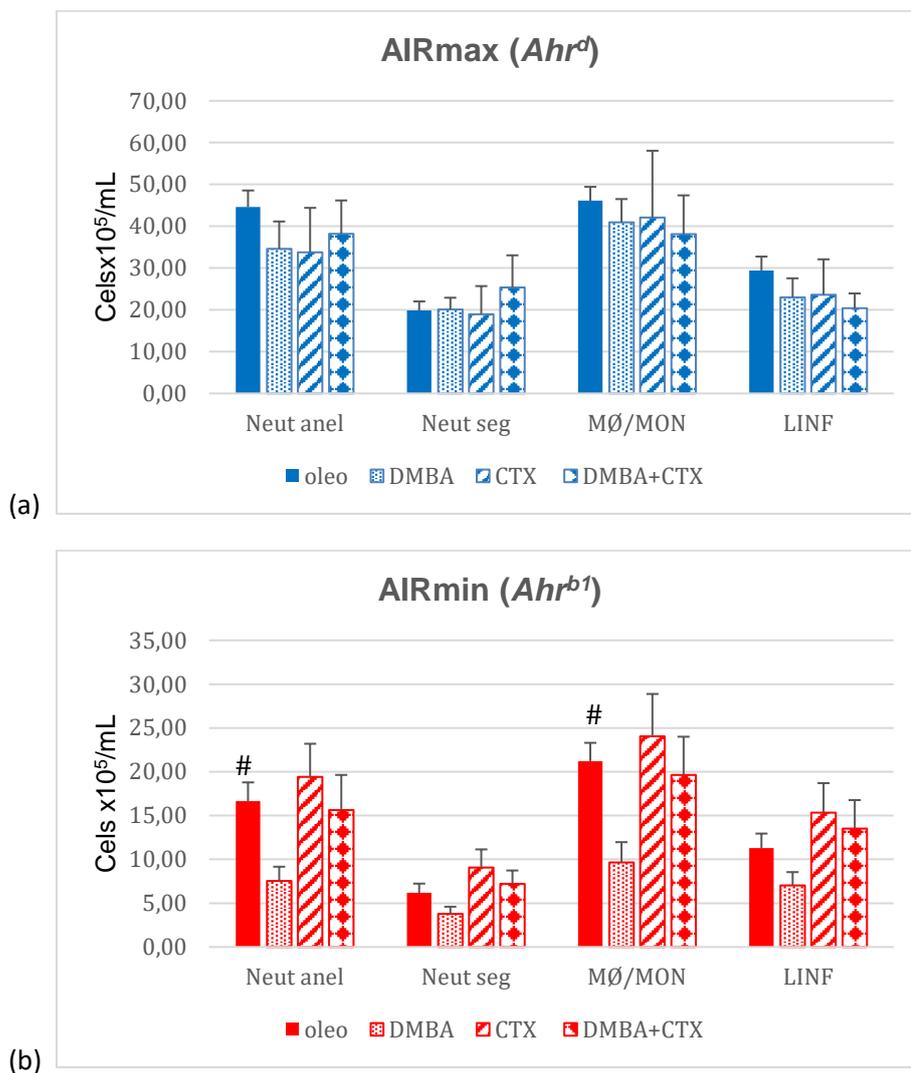
Fonte: próprio autor.

Legenda: Figura 3 B - Morfologia das células das séries mielóide e linfóide obtidas da medula óssea de camundongos AIRmin não tratados (a) ou após 48 horas de tratamento com 50mg/kg de DMBA por via intraperitoneal (b), com 54µg/kg de Crotoxina por via subcutânea (c) e tratados com DMBA e Crotoxina (d). As células identificadas são neutrófilos segmentados (S), neutrófilos com núcleo em anel (A), macrófagos e monócitos (M), e linfócitos (L).

As diferenças no número de células totais encontradas entre AIRmax e AIRmin repercutem também nos diferentes tipos celulares analisados (figura 4). Foi possível constatar que a depleção nas células totais de AIRmin tratados com DMBA em relação aos não tratados é caracterizada pela diferença na quantidade de células mononucleares, macrófagos e monócitos, e neutrófilo com núcleo em anel, sendo essas células encontradas em maior quantidade nos camundongos AIRmin não tratados. Quando comparados camundongos AIRmin tratados com DMBA e Crotoxina e os tratados somente com DMBA é possível perceber uma recuperação no número de células neutrofílicas imaturas (Núcleo em anel) e macrófagos/Monócitos. Os

tratados somente com Crotoxina apresentaram maior quantidade de células mielóides e linfóides comparado aos AIRmin não tratados. Apesar dos camundongos AIRmax apresentarem uma maior quantidade de células totais comparado ao AIRmin, as células na contagem diferencial não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, demonstrando que o DMBA ou a associação DMBA+crotoxina têm um menor efeito nessa linhagem.

Figura 4 - Contagem diferencial das células da medula óssea de AIRmax e AIRmin



Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Contagem diferencial das células da medula óssea de camundongos AIRmax em resposta a 50mg/kg de DMBA por via intraperitoneal (a) e AIRmin em resposta a 54µg/kg de Crotoxina por via subcutânea (b) após 48 horas do tratamento. Os resultados estão expressos como média dos valores \pm erro padrão. # Diferença significativa entre os animais tratados com DMBA e os demais grupos, considerado significativo quando $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos os efeitos do DMBA, da crotoxina e a associação DMBA e CTX na diferenciação das células da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin. Estudos anteriores demonstraram que o tratamento com DMBA causou hipocelularidade da medula óssea em camundongos AIRmin, provavelmente devido a uma alteração na capacidade de diferenciação das células mielóides nas primeiras 24h após o tratamento. Essas alterações na medula óssea indicaram uma parada do ciclo celular no estágio da célula precursora (KATZ *et al.*, 2014). Para refletir o que ocorre com uma população natural como a humana, geneticamente heterogênea, 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 predisposição à carcinogênese produzida por 7-12 dimetilbenzantraceno (DMBA) devido à presença de alelos de baixa (*Ahr^d*) e alta (*Ahr^{b1}*) afinidade de ligação ao receptor de hidrocarbonetos aromáticos (DE SOUZA *et al.*, 2009; KATZ *et al.*, 2014).

A crotoxina isolada do veneno de *C.d. terrificus* possui grande potencial terapêutico com efeito anti-inflamatório, ação imunomodulatória e analgésica (CARDOSO *et al.*, 2001; NUNES *et al.*, 2010; SAMPAIO *et al.*, 2010; SANT'ANNA *et al.*, 2019). Assim, investigamos os efeitos do DMBA e da Crotoxina na diferenciação das células da medula óssea de camundongos AIRmax e AIRmin 48h após tratamento com 50mg/kg de DMBA intraperitoneal e 54µg/kg de Crotoxina subcutânea por meio de caracterização morfológica das células em preparações citológicas visualizadas em microscópio óptico.

Em nossos resultados observamos uma redução de granulócitos imaturos e na população de monócitos/macrófagos na medula óssea de camundongos AIRmin 48 horas após o tratamento com DMBA, enquanto linfócitos e células neutrofílicas maduras estavam inalteradas. Por outro lado, essas alterações não foram observadas em camundongos AIRmax tratados com DMBA, indicando que o DMBA afeta a diferenciação de células mielóides e a resposta inflamatória em animais que possuem o alelo *Ahr^{b1}* de alta afinidade aos hidrocarbonetos aromáticos.

A crotoxina administrada com DMBA apresentou efeito modulatório sob à depleção das células totais observadas na administração do DMBA, somente, em camundongos AIRmin, sendo possível identificar uma elevação no número de células maduras, neutrófilos segmentados, monócitos e macrófagos, o que mostra que a crotoxina pode ter um efeito modulatório na diferenciação celular, mesmo na presença desse carcinógeno.

Os camundongos AIRmax apresentam um maior número de células na medula óssea do que camundongos AIRmin, isso é devido à alta atividade de produção de células pela medula óssea (Ribeiro et al., 2003), característica decorrente do processo seletivo para a alta resposta inflamatória aguda que permite uma maior concentração de células na medula óssea. Esses camundongos não apresentam diferença significativa entre os tratamentos devido à presença do receptor de baixa afinidade ao DMBA, *Ahr^d*. A crotoxina não teve efeito significativo sobre as células da medula óssea desses animais.

6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que camundongos AIRmin são mais suscetíveis do que os AIRmax à toxicidade induzida por DMBA devido à diminuição de granulócitos imaturos na medula óssea, o que pode afetar a resposta inflamatória aguda e a imunidade inata a diferentes infecções. Tais efeitos podem ser influenciados pela ligação de alta afinidade do receptor AHR ao DMBA, afetando a diferenciação celular e impedindo o fornecimento de células funcionais ao sistema imunológico, dificultando a resposta imune, o que pode estar relacionado à alta suscetibilidade de camundongos AIRmin à infecções bacterianas (ARAUJO *et al.*, 1998) e à carcinogênese induzida pelo DMBA (DE SOUZA *et al.*, 2009).

A crotoxina apresentou efeito imunomodulatório sob a depleção celular causada pelo DMBA na medula óssea de camundongos AIRmin, recuperando o número basal de células promovendo a diferenciação celular e um maior número de células maduras. A crotoxina não influenciou no fenótipo do AIRmax.

Assim, se faz necessário outros ensaios para estudar a ação da crotoxina na modulação da diferenciação celular sob efeito de hidrocarbonetos aromáticos e a resposta diferenciada entre AIRmax e AIRmin com o objetivo de avaliar o efeito amplamente descrito da crotoxina como agente imunomodulador e anti-inflamatório.

Um estudo do ciclo celular das diferentes populações poderá esclarecer total ou parcialmente os mecanismos operantes na recuperação da celularidade pela Crotoxina.

REFERÊNCIAS¹

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. AND PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 8th Edition, Elsevier **Saunders, Philadelphia**, 199-337, 2015.
- AMORIM, M.F., FRANCO DE MELLO, R. SALIBA, F. Envenenamento botrópico e crotálico. *Memórias Instituto Butantan* v. 23, p. 63-108, 1951.
- AGRAWAL, R. C.; PANDEY, S. Evaluation of anticarcinogenic and antimutagenic potential of *Bauhinia variegata* extract in Swiss albino mice. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 10, n. 5, p. 913–916, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20104989>>.
- ARAÚJO, A. L. DE; DE ARAÚJO, A. L.; RADVANYI, F. Determination of phospholipase A2 activity by a colorimetric assay using a pH indicator. **Toxicon**, 1987. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90136-x](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(87)90136-x)>.
- ARAUJO, L. M. M.; RIBEIRO, O. G.; SIQUEIRA, M.; *et al.* Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. **European Journal of Immunology**, 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)>.
- BACSI, S. G.; HANKINSON, O. Functional characterization of DNA-binding domains of the subunits of the heterodimeric aryl hydrocarbon receptor complex imputing novel and canonical basic helix-loop-helix protein-DNA interactions. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 15, p. 8843–8850, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.15.8843>>.
- BALMAIN, A.; NAGASE, H. Cancer resistance genes in mice: models for the study of tumour modifiers. **Trends in Genetics**, 1998. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0168-9525\(98\)01422-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-9525(98)01422-x)>.
- BAROUKI, R.; COUMOUL, X.; FERNANDEZ-SALGUERO, P. M. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. **FEBS letters**, v. 581, n. 19, p. 3608–3615, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.046>>.
- BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular immunology**, v. 40, n. 12, p. 845–859, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.005>>.
- BOSTRÖM, C.-E.; GERDE, P.; HANBERG, A.; *et al.* Cancer Risk Assessment, Indicators, and Guidelines for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Ambient Air. **Environmental Health Perspectives**, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.02110s3451>>.
- BRAZIL, V. Do emprego da peçonha na terapêutica, São Paulo, 1934.

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

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>>.

CRUVINEL, W. DE M.; DE MELO CRUVINEL, W.; JÚNIOR, D. M.; *et al.* Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0482-50042010000400008>>.

DENISON, M. S.; NAGY, S. R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 43, p. 309–334, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828>>.

DE SOUZA, V. R. C.; CABRERA, W. K.; GALVAN, A.; *et al.* Aryl hydrocarbon receptor polymorphism modulates DMBA-induced inflammation and carcinogenesis in phenotypically selected mice. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 124, n. 6, p. 1478–1482, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.24066>>.

FAURE, G.; BON, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 25, n. 2, p. 229–234, 1987. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90246-7](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(87)90246-7)>.

GALVÁN, N.; JASKULA-SZTUL, R.; MACWILLIAMS, P. S.; CZUPRYNSKI, C. J.; JEFCOATE, C. R. Bone marrow cytotoxicity of benzo[a]pyrene is dependent on CYP1B1 but is diminished by Ah receptor-mediated induction of CYP1A1 in liver. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 193, n. 1, p. 84–96, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0041-008x\(03\)00338-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0041-008x(03)00338-7)>.

GALVÁN, N.; PAGE, T. J.; CZUPRYNSKI, C. J.; JEFCOATE, C. R. Benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene differentially affect bone marrow cells of the lymphoid and myeloid lineages. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2005.09.018>>.

GAO, J.; LAUER, F. T.; DUNAWAY, S.; BURCHIEL, S. W. Cytochrome P450 1B1 Is Required for 7,12-Dimethylbenz(a)-anthracene (DMBA) Induced Spleen Cell Immunotoxicity. **Toxicological Sciences**, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfi176>>.

HEIDEL, S. M.; MACWILLIAMS, P. S.; BAIRD, W. M.; *et al.* Cytochrome P4501B1 mediates induction of bone marrow cytotoxicity and preleukemia cells in mice treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. **Cancer research**, v. 60, n. 13, p. 3454–3460, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10910056>>.

IBANEZ, O. M.; STIFFEL, C.; RIBEIRO, O. G.; *et al.* Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **European Journal of Immunology**, 1992. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830221014>>.

KATZ, I. S. S.; ALBUQUERQUE, L. L.; SUPPA, A. P.; *et al.* 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced myelotoxicity differs in mice selected for high or low acute inflammatory response: relationship with aryl hydrocarbon receptor polymorphism. **International journal of toxicology**, v. 33, n. 2, p. 130–142, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/1091581814522837>>.

KERKVLIT, N. I.; SHEPHERD, D. M.; BAECHER-STEPAN, L. T lymphocytes are direct, aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): AhR expression in both CD4+ and CD8+ T cells is necessary for full suppression of a cytotoxic T lymphocyte response by TCDD. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 185, n. 2, p. 146–152, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1006/taap.2002.9537>>.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3399>>.

LAWRENCE, S. M.; CORRIDEN, R.; NIZET, V. How Neutrophils Meet Their End. **Trends in immunology**, v. 41, n. 6, p. 531–544, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2020.03.008>>.

Neves, E. M. S. F. T. Macrófago: Biologia, Diversidade e Função. Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2015.

NGUYEN, L. P.; BRADFIELD, C. A. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. **Chemical research in toxicology**, v. 21, n. 1, p. 102–116, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/tx7001965>>.

N'JAI, A. U.; LARSEN, M.; SHI, L.; JEFCOATE, C. R.; CZUPRYNSKI, C. J. Bone marrow lymphoid and myeloid progenitor cells are suppressed in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) treated mice. **Toxicology**, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2010.02.009>>.

NUNES, F. P. B.; ZYCHAR, B. C.; DELLA-CASA, M. S.; *et al.* 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**, v. 55, n. 6, p. 1100–1106, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.12.011>>.

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

RIBEIRO, O. G.; MARIA, D. A.; ADRIOUCH, S.; *et al.* Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection

for high acute inflammatory response. **Journal of leukocyte biology**, v. 74, n. 4, p. 497–506, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0103039>>.

SAMPAIO, S. C.; HYSLOP, S.; FONTES, M. R. M.; *et al.* Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxicology**, v. 55, n. 6, p. 1045–1060, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.011>>.

SANT'ANNA, M. B.; LOPES, F. S. R.; KIMURA, L. F.; *et al.* Crotoxin Conjugated to SBA-15 Nanostructured Mesoporous Silica Induces Long-Last Analgesic Effect in the Neuropathic Pain Model in Mice. **Toxins**, 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**, v. 24, p. 39, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40409-018-0178-3>>.

SILVA, M. C.; GONÇALVES, L. R.; MARIANO, M. The venom of South American rattlesnakes inhibits macrophage functions and is endowed with anti-inflammatory properties. **Mediators of inflammation**, v. 5, n. 1, p. 18–23, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/S0962935196000038>>.

SPARFEL, L.; PINEL-MARIE, M.-L.; BOIZE, M.; *et al.* Transcriptional Signature of Human Macrophages Exposed to the Environmental Contaminant Benzo(a)pyrene. **Toxicological Sciences**, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfq007>>.

STEJSKALOVA, L.; DVORAK, Z.; PAVEK, P. Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. **Current drug metabolism**, v. 12, n. 2, p. 198–212, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2174/138920011795016818>>.

SWANSON, H. I.; CHAN, W. K.; BRADFIELD, C. A. DNA Binding Specificities and Pairing Rules of the Ah Receptor, ARNT, and SIM Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, 1995. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.44.26292>>.