

Janaína dos Santos Ferreira

Estudo da ação modulatória da crotoxina em animais  
selecionados fenotipicamente para resposta inflamatória aguda  
submetidos à carcinogênese cutânea por 7,12  
dimetilbenzantraceno

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia  
do Instituto Butantan para obtenção do  
título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2023

Janaína dos Santos Ferreira

Estudo da ação modulatória da crotoxina em animais  
selecionados fenotipicamente para resposta inflamatória aguda  
submetidos à carcinogênese cutânea por 7,12  
dimetilbenzantraceno

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia  
do Instituto Butantan para obtenção do  
título de Mestre em Ciências.

Orientador: Orlando Garcia Ribeiro Filho

São Paulo


2023

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 26 de outubro, 2023.

  
\_\_\_\_\_

Aluna: Janaína dos Santos Ferreira

De acordo:   
\_\_\_\_\_

Orientador: Orlando Garcia Ribeiro Filho

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

Ferreira, Janaína dos Santos

Estudo da ação modulatória da crotoxina em animais selecionados fenotipicamente para resposta inflamatória aguda submetidos à carcinogênese cutânea por 7,12 dimetilbenzantraceno / Janaína dos Santos Ferreira ; orientador(a) Orlando Garcia Ribeiro Filho - São Paulo, 2023.

87 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Butantan, Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia. Linha de pesquisa: Biologia integrada à toxicologia.  
Versão corrigida final

1. Inflamação 2. Camundongos. 3. Crotoxina. 4. Células do sistema imune I. Filho, Orlando Garcia Ribeiro. II. Instituto Butantan. III. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia. IV. Título.

## AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DO TRABALHO

Eu, Janaína dos Santos Ferreira, aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia do Instituto Butantan, autorizo a divulgação de minha dissertação por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total desta dissertação após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação da dissertação/tese após a data da defesa:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 26 de outubro de 2023

.....  
Aluna: Janaína dos Santos Ferreira

De acordo: .....  
Orientador: Orlando Garcia Ribeiro Filho

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS-TOXINOLOGIA  
INSTITUTO BUTANTAN




RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MESTRADO

NOME DA ALUNA: Janaína dos Santos Ferreira

DATA DO EXAME: 29/09/2023

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovada	Reprovada
Orlando Garcia Ribeiro Filho		(X)	( )
Luís Roberto de Camargo Gonçalves		(X)	( )
Iana Suly Santos Katz		(X)	( )

DECISÃO FINAL: APROVADA (X)

REPROVADA ( )

*Comentários da Banca (opcional):*

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da ação modulatória da crotoxina sobre os efeitos do alelo b1 do gene Ahr na evolução de lesões papilomatosas cutâneas induzidas por 7,12 dimetilbenzantraceno.", protocolada sob o CEUA nº 1311160321 (ID 002353), sob a responsabilidade de **Orlando Garcia Ribeiro Filho e equipe; Janaína dos Santos Ferreira; Bruna Cristina Favoretto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 14/07/2021.

We certify that the proposal "Study of the modulatory action of crotoxin on the effects of the b1 allele of the Ahr gene on the evolution of cutaneous papillomatous lesions induced by 7,12 dimethylbenzanthracene.", utilizing 60 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 1311160321 (ID 002353), under the responsibility of **Orlando Garcia Ribeiro Filho and team; Janaína dos Santos Ferreira; Bruna Cristina Favoretto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 07/14/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 07/2021 a 07/2024

Área: [Imunogenética](#)

Origem:	<a href="#">Biotério Imunogenética</a>	sexo:	<a href="#">Machos e Fêmeas</a>	idade:	<a href="#">2 a 3 meses</a>	N:	<a href="#">30</a>
Espécie:	<a href="#">Camundongos heterogênicos</a>			Peso:	<a href="#">20 a 30 g</a>		
Linhagem:	<a href="#">AIRmax</a>						
Origem:	<a href="#">Biotério Imunogenética</a>	sexo:	<a href="#">Machos e Fêmeas</a>	idade:	<a href="#">2 a 3 meses</a>	N:	<a href="#">30</a>
Espécie:	<a href="#">Camundongos heterogênicos</a>			Peso:	<a href="#">20 a 30 g</a>		
Linhagem:	<a href="#">AIRmin</a>						

Local do experimento: Laboratório de Experimentação situado no Biotério do Lab. de Imunogenética

São Paulo, 14 de julho de 2021



Maria Leonor Sarno de Oliveira  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan



Nancy Oguiura  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Orlando Garcia Ribeiro Filho  
Área: Imunogenética

Título da proposta: "Estudo da ação modulatória da crotoxina sobre os efeitos do alelo b1 do gene Ahr na evolução de lesões papilomatosas cutâneas induzidas por 7,12 dimetilbenzantraceno."

**Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais IB** (ID 004833)

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 02/setembro/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Conforme determinação da CEUA, realizamos, preliminarmente, o experimento de determinação da DL50 da Crotoxina na pele (aplicação cutânea) nas doses de 160 a 1280 ug/Kg de peso corpóreo, 5 vezes consecutivas, para avaliar sua toxicidade. Como a Crotoxina foi diluída em Acetona, verificamos eventual toxicidade desse veículo. Durante o período de 7 dias de observação diária, não constatamos qualquer efeito tóxico caracterizado por mortalidade ou sintomas clínicos observados nestas mesmas linhagens quando submetidas à Crotoxina por outras vias, tais como: intra-peritoneal, subcutânea ou ainda, por via oral. Assim, com esses resultados, podemos dar continuidade à proposta inicial de mestrado da aluna Janaina Ferreira, avaliando os aspectos moduladores da Crotoxina sobre o aparecimento de lesões papilomatosas cutânea em decorrência do tratamento epicutâneo de DMBA em Acetona em 5 aplicações diárias consecutivas ou em protocolo clássico de dois estágios com DMBA/TPA. O objetivo de continuidade deste projeto é estudar a relação das células presentes na pele sob os efeitos do DMBA ou DMBA/TPA aplicados epicutaneamente no dorso dos camundongos das linhagens AIRmax e AIRmin. Antes, durante e após a indução dos papilomas, aplicaremos a crotoxina, para avaliar as possíveis mudanças na evolução das lesões cutâneas e a dinâmica das populações celulares presentes da derme e epiderme. Os seguintes grupos são propostos: 1-Avaliar a possível modulação do aparecimento de papilomas por DMBA 5X, utilizando, como moduladores, duas doses de Crotoxina: 320 e 1280ug/kg de peso corpóreo: Utilizaremos 45 animais de cada linhagem (AIRmax e AIRmin), totalizando 90 camundongos fêmeas Controle DMBA 5x diariamente - 5 animais/linhagem Crotoxina 3x - DMBA 5x - 10 animais/linhagem (320 e 1280 ug/kg) DMBA 5x - Crotoxina 3x - 10 animais/linhagem (320 e 1280 ug/kg) Ctx 3x-DMBA5x-Ctx 3x - 10 animais/linhagem (320 e 1280 ug/kg) Crotoxina - 10 animais de cada linhagem (320 e 1280 ug/kg) 2-Repetir o experimento 2 só que, no lugar de DMBA 5x, usaremos o protocolo clássico com a associação de DMBA/TPA (DMBA 1x e TAPA 2x/semana por 12 semanas) e a dose de Crotoxina (Ctx) mais eficaz (320 ou 1280ug/kg de peso) e nas mesmas condições anteriores: Serão 50 animais, 25 de cada linhagem: Controle = DMBA/TPA- 5 animais/linhagem Ctx 3x □ DMBA/TPA - 5 animais/linhagem DMBA/TPA - Ctx 3x - 5 animais/linhagem Ctx 3x-DMBA5x-Ctx 3x - 5 animais/linhagem Crotoxina 3x - 5 animais/linhagem 3- Repetição do protocolo que apresentar maior modulação pela Crotoxina (DMBA 5x ou DMBA/TPA): 40 animais, 20 de cada linhagem. Total de animais= 90 camundongos AIRmax e 90 AIRmin, fêmeas de 20 a 30g. "

Comentário da CEUA: ""

**Animais a serem adicionados**

Origem:	Biotério Imunogenética	sexo:	Fêmeas	idade:	2 a 3 meses	N:	90
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	20 a 30 g		
Linhagem:	AIRmax						

**Animais a serem adicionados**

Origem:	Biotério Imunogenética	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	2 a 3 meses	N:	90
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	20 a 30 g		
Linhagem:	AIRmin						



Maria Leonor Sarno de Oliveira  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan



Nancy Oguiura  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan

*Dedico à minha família que sempre me apoiou e esteve comigo nos momentos mais difíceis. O apoio de vocês foi fundamental para o meu crescimento.*

*Obrigada!*



## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço, primeiramente, a Deus, pela sua proteção e por me amparar nos momentos mais difíceis.*

*Ao meu marido, Tales, pela paciência, apoio, carinho e compreensão que foram muito importantes durante todo o processo, me dando forças para continuar. E a minha amada, Candy, por seu carinho infinito e por me ajudar nos momentos que a ansiedade foi mais forte do que eu.*

*À minha mãe Marli, meu irmão Marco Aurélio e sua esposa Patrícia, meus avós Maria e José, meus sogros Vilma e Jânio, meus cunhados Douglas e Flávia e meu sobrinho Joaquim que mesmo distante estava presente dando todo apoio que eu precisava.*

*Ao meu pai, Joaquim, que mesmo não estando entre nós, estará sempre em minha memória.*

*Ao meu orientador, Dr. Orlando, por todo comprometimento e orientação que foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e pela confiança dada a mim para seguir nesse projeto. Meus sinceros agradecimentos.*

*Aos pesquisadores do laboratório de Imunogenética por estarem sempre presentes e pelo bom convívio.*

*À Bruna, que sempre me ajudou durante toda trajetória, com muita paciência, incentivo, companheirismo e carinho. Sua presença e apoio foram essenciais. Meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos e pela amizade construída.*

*À Fernanda, Aline e Mara e Rita que estavam sempre dispostas a me ajudar e dar os melhores conselhos, além de proporcionarem sempre momentos divertidos e felizes. Obrigada pelo companheirismo e amizade.*

*À todas as amigas que construí durante o percurso que, de alguma forma, foram essenciais para o meu crescimento profissional e pessoal.*

*Aos funcionários do laboratório e biotério que, de certo modo, colaboraram para a realização deste estudo.*

*Aos professores, grandes pesquisadores, da Pós-graduação que contribuíram para meu crescimento intelectual e proporcionaram bons momentos de aprendizado.*

*Ao doutor Silas Eto do Centro de Desenvolvimento e Inovação pela colaboração e ajuda nas análises histológicas que foram fundamentais e de extrema importância.*

*Aos pesquisadores do laboratório de Imunopatologia por terem sido sempre atenciosos e dispostos a ajudar na purificação da crotoxina que foi utilizada nos experimentos.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro – código de financiamento 001.*

*A todos, meu muito obrigada.*

*“Não importa o que dizem a você, palavras e ideias podem mudar o mundo”*  
*(Sociedade dos Poetas Mortos)*

## RESUMO

FERREIRA, Janaína dos Santos. **Estudo da ação modulatória da crotoxina em animais selecionados fenotipicamente para resposta inflamatória aguda submetidos à carcinogênese cutânea por 7,12 dimetilbenzantraceno**. 2023. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Toxinologia). Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

O sistema imunológico da pele é formado por células da imunidade inata e adaptativa que atuam na defesa contra agentes externos, porém, podem ser afetadas quando expostas a carcinógenos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), e sofrer com seus efeitos citotóxicos. Um exemplo de HPA é o 7,12 dimetilbenzantraceno (DMBA), que tem efeitos tóxicos ao interagir com a pele. Nossa análise tomou como foco os impactos do DMBA, isolado ou associado ao TPA, na pele de camundongos fenotipicamente selecionados para resposta inflamatória aguda máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin), frente ao surgimento de lesões papilomatosas. Sobretudo, estudamos a influência da Crotoxina (CTX) ou do veneno crotálico bruto na evolução dessas lesões. Em um primeiro experimento, animais de ambas as linhagens receberam os seguintes tratamentos: acetona (controle), DMBA 5x e CTX, avaliados por 80 dias. Em um protocolo subsequente, associamos DMBA e TPA, com os seguintes grupos: acetona (controle), DMBA/TPA, DMBA/TPA/CTX EPI 2x e DMBA/TPA/Veneno avaliados por 7, 20, 80 e 120 dias. Um último protocolo de dois estágios foi realizado com aplicações de CTX EPI 1x por semana e administração por via subcutânea igualmente por vez, e os animais foram avaliados por períodos de 20, 40 e 80 dias. Nossas descobertas revelaram que no primeiro protocolo, os AIRmin foram mais sensíveis ao DMBA, especialmente ao considerar a multiplicidade e incidência de lesões. Já no segundo protocolo (DMBA/TPA), os AIRmax exibiram alta incidência de lesões que se assemelhavam a carcinomas, principalmente nos grupos que foram expostos a CTX ou veneno. Na última abordagem, também com o protocolo de dois estágios, identificamos que a aplicação de CTX EPI 1x por semana, inibiu a progressão das lesões nas duas linhagens, algo que não foi evidenciado com a administração subcutânea de CTX. No entanto, dados histopatológicos sugerem que a via subcutânea para administração de CTX é importante na inibição da evolução maligna. Adicionalmente, ao avaliar as populações celulares, distinguimos duas subpopulações de linfócitos  $\gamma\delta$  que podem desempenhar uma função importante na progressão tumoral. Isso destaca a importância da CTX como agente imunomodulador em estudos sobre a sensibilidade a carcinógenos do tipo HPA.

**Palavras-chave:** Inflamação. Camundongos. Crotoxina. Células do sistema imune.

## ABSTRACT

FERREIRA, Janaína dos Santos. **Study of the modulatory action of crotoxin in animals phenotypically selected for acute inflammatory response submitted to cutaneous carcinogenesis by 7,12 dimethylbenzanthracene.** 2023. 87p. Master's dissertation (Master's degree in Sciences - Toxinology) – Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

The skin's immune system is made up of innate and adaptive immunity cells that act in defense against external agents, however, they can be affected when exposed to carcinogens such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), and suffer from their cytotoxic effects. An example of a PAH is 7,12 dimethylbenzanthracene (DMBA), which has toxic effects when interacting with the skin. Our analysis focused on the impacts of DMBA, alone or associated with TPA, on the skin of mice phenotypically selected for maximum (AIRmax) or minimum (AIRmin) acute inflammatory response, in the face of the appearance of papillomatous lesions. Above all, we studied the influence of Crotoxin (CTX) or crude crotalic venom on the evolution of these lesions. In a first experiment, animals from both lines received the following treatments: acetone (control), DMBA 5x and CTX, evaluated for 80 days. In a subsequent protocol, we associated DMBA and TPA, with the following groups: acetone (control), DMBA/TPA, DMBA/TPA/CTX EPI 2x and DMBA/TPA/Poison evaluated for 7, 20, 80 and 120 days. A final two-stage protocol was carried out with CTX EPI applications 1x per week and subcutaneous administration equally at a time, and the animals were evaluated for periods of 20, 40 and 80 days. Our findings revealed that in the first protocol, AIRmin were more sensitive to DMBA, especially when considering the multiplicity and incidence of injuries. In the second protocol (DMBA/TPA), AIRmax exhibited a high incidence of lesions that resembled carcinomas, especially in the groups that were exposed to CTX or poison. In the last approach, also with the two-stage protocol, we identified that the application of CTX EPI 1x per week inhibited the progression of lesions in both lineages, something that was not evidenced with the subcutaneous administration of CTX. However, histopathological data suggest that the subcutaneous route of CTX administration is important in inhibiting malignant evolution. Additionally, by evaluating cell populations, we distinguished two subpopulations of  $T\gamma\delta$  lymphocytes that may play an important role in tumor progression. This highlights the importance of CTX as an immunomodulatory agent in studies on sensitivity to HPA-type carcinogens.

**Keywords:** Inflammation. Mice. Crotoxin. Immune system cells.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AHR</b>	Receptor de Aril Hidrocarboneto
<b>Ahr</b>	Gene codificante
<b>AIR</b>	Resposta Inflamatória Aguda
<b>AIRmax</b>	Resposta Inflamatória Aguda Máxima
<b>AIRmin</b>	Resposta Inflamatória Aguda Mínima
<b>Anti-CTX</b>	Anti-crotoxina
<b>ARNT</b>	Receptor Nuclear Translocator
<b>bHLH</b>	Basic helice-loop-helice
<b>Cdt</b>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
<b>CdtV</b>	Veneno de <i>Cdt</i>
<b>CTX</b>	Crotoxina
<b>CTX<sup>epi</sup></b>	Crotoxina epicutânea
<b>CTX<sup>sub</sup></b>	Crotoxina subcutânea
<b>DMBA</b>	7,12 dimetilbenzantraceno
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>eRAPA</b>	Rapamicina
<b>FPR</b>	Receptor Peptídeo Formil
<b>HPA</b>	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	Interleucina - 1 $\alpha$
<b>IL-17</b>	Interleucina - 17
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>SI</b>	Sistema Imunológico
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de Crescimento e Transformação- $\beta$
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$
<b>TPA</b>	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate
<b>UVR</b>	Raios Ultravioleta
<b>WHO</b>	World Health Organization

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Seleção genética das linhagens AIRmax e AIRmin.....	28
<b>Figura 2</b> - Produção de anticorpos anti-CTX.....	37
<b>Figura 3</b> - Presença de CTX no macerado de pele dos animais tratados com diferentes concentrações aplicadas epicutâneamente no dorso de camundongos AIRmax e AIRmin .....	38
<b>Figura 4</b> - Imunohistoquímica da pele de um camundongo tratado com acetona e um tratado com CTX 1.280µg/Kg da linhagem AIRmax.....	40
<b>Figura 5</b> - Evolução da multiplicidade e incidência de papilomas em camundongos AIRmin e AIRmax nas concentrações de 1.280µg/kg e 320µg/Kg de CTX.....	43
<b>Figura 6</b> - Avaliação de 70 dias da pele do dorso dos animais no tratamento com a CTX na concentração de 1.280µg/Kg. ....	44
<b>Figura 7</b> - Avaliação de 70 dias da pele do dorso dos animais no tratamento com a CTX na concentração de 320µg/kg.....	44
<b>Figura 8</b> - Cortes histológicos da pele do dorso dos animais AIRmin e AIRmax do experimento feito na concentração de 1.280µg/kg.....	46
<b>Figura 9</b> - Estratégia de análise realizada por citometria de fluxo.....	49
<b>Figura 10</b> - População celular dos animais tratados com Acetona, DMBA ou CTX [1.280µg/kg].....	50
<b>Figura 11</b> - A) Incidência e B) Multiplicidade de lesões de camundongos AIRmax tratados com Acetona, DMBA/TPA, DMBA/TPA/CTX ou DMBA/TPA/Veneno duas vezes por semana durante 120 dias. C) Representações das lesões desenvolvidas no dorso dos animais aos 115 dias de tratamento. ....	52
<b>Figura 12</b> - A) Incidência e B) Multiplicidade de lesões de camundongos AIRmin tratados com Acetona, DMBA/TPA, DMBA/TPA/CTX ou DMBA/TPA/Veneno duas vezes por semana durante 120 dias. C) Representações das lesões desenvolvidas no dorso dos animais aos 115 dias de tratamento. ....	53
<b>Figura 13</b> - Representação gráfica da população celular dos camundongos AIRmax e AIRmin nos tratamentos com DMBA/TPA, CTX ou veneno ao longo dos diferentes tempos de experimentação.....	56
<b>Figura 14</b> - A) Incidência e B) Multiplicidade de lesões de camundongos AIRmax tratados com Acetona, DMBA/TPA, DMBA/TPA/CTX <sup>epi</sup> ou DMBA/TPA/CTX <sup>sub</sup> uma	

vez por semana por um período de 80 dias e, C) Representações das lesões desenvolvidas no dorso dos animais aos 80 dias de tratamento.....	58
<b>Figura 15</b> - A) Incidência e B) Multiplicidade de lesões de camundongos AIRmin tratados com Acetona, DMBA/TPA, DMBA/TPA/CTX <sup>epi</sup> ou DMBA/TPA/CTX <sup>sub</sup> uma vez por semana por um período de 80 dias e, C) Representações das lesões desenvolvidas no dorso dos animais aos 80 dias de tratamento.....	60
<b>Figura 16</b> - Efeito terapêutico da CTX na tumorigênese de pele em camundongos da linhagem AIRmax induzida por DMBA e TPA.....	62
<b>Figura 17</b> - Efeito terapêutico da CTX na tumorigênese de pele em camundongos da linhagem AIRmin induzida por DMBA e TPA.....	64
<b>Figura 18</b> - Representação gráfica da população de linfócitos Tγδ (CD3 <sup>+</sup> Tγδ <sup>+</sup> ) nos camundongos AIRmax e AIRmin nos tratamentos com DMBA/TPA, CTX ou veneno ao longo dos diferentes tempos de experimentação e nos diferentes modelos de tratamento .....	66
<b>Figura 19</b> - Representação gráfica da população celular de linfócitos Tγδ e Tαβ, respectivamente, dos camundongos AIRmax e AIRmin nos tratamentos com DMBA/TPA, CTX <sup>epi</sup> x ou CTX <sup>sub</sup> ao longo dos diferentes tempos de experimentação. ....	68
<b>Figura 20</b> - Representação gráfica da correlação das subpopulações de linfócitos Tγδ (Tγδ <sup>high</sup> /Tγδ <sup>low</sup> ) e lesões papilomatosas nos camundongos AIRmax e AIRmin.....	69
<b>Figura 21</b> - Esquema resumido da atividade da CTX em todos os protocolos utilizados. ....	70



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1 Processo Inflamatório.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2 Carcinogênese de Pele.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA).....</b>	<b>22</b>
<b>1.4 Receptor Aril Hidrocarboneto (AHR).....</b>	<b>23</b>
<b>1.5 Veneno da serpente Crotalus durissus terrificus e a crotoxina.....</b>	<b>24</b>
1.5.1 Ação anti-inflamatória e imunomodulatória da crotoxina.....	25
<b>1.6 Modelo Experimental.....</b>	<b>27</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Camundongos.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2 Produção de anticorpos anti-crotoxina em camundongos AIRmax e AIRmin.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3 Determinação da dose não tóxica de crotoxina para aplicação epicutânea em camundongos AIRmax e AIRmin.....</b>	<b>30</b>
<b>3.4 Imunohistoquímica da pele na concentração de 1.280µg/kg de crotoxina.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5 Efeito modulatório da crotoxina nas concentrações de 1.280µg/kg e 320µg/kg.....</b>	<b>31</b>
<b>3.6 Indução de carcinogênese em dois estágios (DMBA/TPA) e tratamento com crotoxina e veneno bruto.....</b>	<b>32</b>
<b>3.7 Indução a carcinogênese em dois estágios (DMBA/TPA) e tratamento com crotoxina epicutânea ou subcutânea.....</b>	<b>33</b>
<b>3.8 Análise histológica da pele.....</b>	<b>33</b>
<b>3.9 Processo de extração da pele dorsal para obtenção das células.....</b>	<b>34</b>
<b>3.10 Imunofenotipagem das células.....</b>	<b>35</b>
<b>3.11 Análise estatística.....</b>	<b>35</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Produção de anticorpos anti-crotoxina.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2 Determinação da dose não tóxica de crotoxina.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3 Interação da crotoxina com a pele.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4 Efeito da crotoxina nas lesões papilomatosas induzidas por DMBA 5x.....</b>	<b>41</b>

4.4.1 Avaliação dos Papilomas.....	41
4.4.2 Análise histológica.....	45
4.4.3 Imunofenotipagem das células da pele.....	47
<b>4.5 Efeito da crotoxina e do veneno nas lesões papilomatosas induzidas por DMBA/TPA.....</b>	<b>51</b>
4.5.1 Avaliação dos Papilomas.....	51
4.5.2 Imunofenotipagem das células da pele.....	54
<b>4.6 Efeito da crotoxina epicutânea ou subcutânea nas lesões papilomatosas induzidas por DMBA/TPA.....</b>	<b>56</b>
4.6.1 Avaliação dos Papilomas.....	57
4.6.2 Análise Histológica.....	61
4.6.3 Imunofenotipagem das células CD3 <sup>+</sup> Tγδ <sup>+</sup> extraídas da pele.....	65
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O sistema imunológico (SI) possui uma rede de células e moléculas que trabalham em prol da proteção do organismo contra agentes patogênicos e substâncias nocivas. Atua na defesa de potenciais ameaças utilizando uma série de mecanismos complexos destinados a identificar, neutralizar e eliminar aquilo que ele reconhece como sendo não-próprio ou danoso (Chaplin, 2010).

Estes mecanismos de defesa imunológica podem ser categorizados, em uma visão simplificada, em duas principais vertentes: a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa (Abbas; Lichtman, 2011). A resposta imune inata é a defesa primária do corpo, é geral e imediata, atuando como a primeira linha de resistência contra invasores (Delves; Roitt, 2000). Células específicas reconhecem padrões de patógenos e agem rapidamente para contê-los. Já a resposta imune adaptativa é mais especializada e se desenvolve ao longo do tempo, baseando-se em experiências anteriores do sistema imune com patógenos específicos. As células da resposta adaptativa são capazes de “lembrar” de agentes patogênicos específicos e montar uma resposta mais rápida e eficiente em encontros subsequentes (Chaplin, 2010).

A resposta imunológica possui capacidade de ser iniciada por meio estímulos, podendo ser eles endógenos ou exógenos, levando a uma série de reações coordenadas pelo SI (Abbas; Lichtman, 2015). Em alguns casos, substâncias que não são necessariamente infecciosas podem ser percebidas como estranhas pelo organismo, desencadeando uma resposta imune. O organismo tem uma habilidade de distinguir entre o próprio e o não-próprio por meio de mecanismos de reconhecimento que detectam componentes que possam desequilibrar a homeostase do corpo (Brodin; Davis, 2016).

Neste contexto, a resposta imunológica pode ser compreendida, em termos mais amplos, como uma reação a macromoléculas presentes tanto em agentes patogênicos quanto em substâncias químicas, sejam elas tóxicas ou não para o organismo (Abbas; Lichtman, 2011).

## 1.1 Processo Inflamatório

Na vigência de uma resposta imunológica, a inflamação emerge como uma das principais reações do SI frente à lesão tecidual provocada por objetos estranhos ou agentes patogênicos (Muller, 2006). Esta reação manifesta-se por meio de diversos sintomas característicos, como dor, aumento da temperatura local (calor), vermelhidão (rubor), inchaço (edema), e em alguns casos, pode levar a perda da função do tecido ou órgão afetado (Nair et al., 2021).

A inflamação é desencadeada, fundamentalmente, pelos mecanismos associados ao sistema imune inato. Este sistema destaca-se pela presença de células como, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos  $T\gamma\delta$ , entre outros. Posteriormente, o SI inicia sua atividade de resposta específica que atua a longo prazo reparando também os tecidos que foram prejudicados durante o processo (Muller, 2006).

Durante o processo de reparação tecidual, as células fagocitárias desempenham um papel crucial, especialmente em resposta à liberação de determinadas citocinas. Uma dessas citocinas, a interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), é fundamental na regulação e proliferação de queratinócitos, além de estimular contribuir para ativação de produção celular na medula óssea. Outra citocina de destaque é o Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), uma proteína pró-inflamatória produzida predominantemente por linfócitos, monócitos e macrófagos maduros. Ela tem papel fundamental na modulação da resposta imunológica, especialmente ao ativar células que irão desempenhar funções na inflamação (Muller, 2006). Adicionalmente, o TNF- $\alpha$  é capaz de estimular o SI a recrutar mais células de defesa para o local da lesão. Esta ação potencializa a liberação de quimiocinas com propriedades quimiotáticas intensificando a resposta inflamatória e, assim, favorecendo a resolução da situação infecciosa (Vitale; Ribeiro, 2007). Por fim, o Fator de Crescimento e Transformação- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) é uma proteína que possui o potencial de induzir a apoptose celular e o reparo tecidual nas células epiteliais, além disso, tem ação supressora em tumores reprimindo o crescimento e a progressão de células alteradas (Kimura et al., 2007).

Desregulações nos processos imunológicos podem conduzir ao desenvolvimento de neoplasias (Coussens; Werb, 2002), interferindo na capacidade do SI de se defender de agentes patogênicos e comprometendo a liberação adequada

de citocinas e quimiocinas. Essas substâncias são vitais para o recrutamento, ativação e diferenciação correta das células (Vitale; Ribeiro, 2007).

No contexto da inflamação aguda, as células pertencentes à resposta imune inata geralmente desempenham um papel satisfatório para restaurar a homeostasia no local afetado. No entanto, em certas circunstâncias, essa resposta pode se desequilibrar, evoluindo para uma inflamação de caráter crônico. Esta inflamação crônica pode, eventualmente, favorecer o surgimento de processos tumorais, visto que o ambiente inflamatório contínuo desafia a manutenção do equilíbrio e da regulação adequada da proliferação celular (Galdiero; Marone; Mantovani, 2018).

A inflamação de caráter crônico pode ser desencadeada por uma série de fatores, incluindo infecções de origem viral, bacteriana ou parasitária. Além dessas causas biológicas, agentes externos, como determinadas substâncias químicas, também podem ser responsáveis por iniciar esse processo (Galdiero; Marone; Mantovani, 2018; Bonavita et al., 2015). A inflamação não apenas desempenha um papel em condições imediatas de resposta a danos ou infecções, mas também tem uma relevância significativa no contexto da tumorigênese. Isso porque certas respostas inflamatórias podem atuar como elementos catalisadores, favorecendo a progressão tumoral e contribuindo para o surgimento e evolução do câncer (Grivennikov; Greten; Karin, 2010). A instauração de uma inflamação crônica propicia um ambiente no qual mutações e crescimento celular podem acontecer, frequentemente estabelecendo condições favoráveis para a progressão do câncer. A inflamação crônica está associada a uma série de condições patológicas, tais como diabetes, artrite, doenças pulmonares, distúrbios autoimunes, doença de Alzheimer e, notavelmente, câncer (Singh, et al., 2019).

## **1.2 Carcinogênese de Pele**

Um fator importante para a associação da inflamação e tumorigênese deve-se pela presença de leucócitos e mediadores inflamatórios como citocinas e enzimas presentes no microambiente tumoral. A maior parte das células que constituem este microambiente são derivadas da linhagem mieloide totalizando 50% de sua composição. Todavia, nem todos os tumores são desencadeados devido a uma inflamação crônica, mas, é possível observar que em todos eles há um microambiente de infiltrado inflamatório. Nesse caso, a inflamação está relacionada à ativação de

oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor que juntos promovem uma proliferação celular estimulando a transcrição de genes codificantes de citocinas e quimiocinas que irão desencadear uma resposta inflamatória completa (Bonavita et al., 2015).

Uma inflamação crônica não resolvida aumenta em torno de 20% as chances de desenvolvimento de cânceres. No ano de 2018, estimou-se em uma pesquisa realizada pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) que ocorreram no mundo 18 milhões de novos casos de cânceres com 9,6 milhões óbitos. E, em 2020, a World Health Organization (WHO) mostrou mais de 1 milhão de novos casos de câncer de pele não melanoma em homens e mulheres.

Segundo o Centro de Câncer A.C. Camargo (2022), o câncer de pele não melanoma possui a maior incidência no mundo, mas apresenta a menor taxa de mortalidade quando tem o devido tratamento. Os cânceres de pele não melanoma englobam: o carcinoma basocelular ou de células basais têm origem nas células basais da epiderme e representa 75% dos casos de câncer de pele. É mais comum em pessoas de meia-idade e idosos e, geralmente, aparece em áreas muito expostas ao sol ao longo da vida. O carcinoma espinocelular ou de células escamosas que tem origem na camada mais externa da epiderme responde por 20% do total de casos.

A carcinogênese cutânea é uma neoplasia agressiva que possui grande capacidade de formação de metástase (Lewis et al., 2015) sendo estimulada principalmente pelo contato com raios ultravioleta (UVR). Entretanto, o carcinoma de pele não melanoma também pode ser induzido pelos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (Clausen; Grabbe, 2015). Essas substâncias químicas estão frequentemente em contato com as células efetoras do epitélio, pois estão presentes em abundância no ambiente e podem propiciar o desenvolvimento de neoplasias (Lewis et al., 2015).

### **1.3 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)**

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) representam uma categoria de xenobióticos oriundos da combustão incompleta de materiais orgânicos. Fontes comuns destes compostos incluem emissões de motores a diesel ou gasolina, queima de carvão e a fumaça originada pelo tabagismo, por exemplo (Boström et al., 2002).

Quando em contato com a pele, os HPA podem ser absorvidos pelo epitélio e, devido à sua natureza tóxica, potencialmente desencadear processos de tumorigênese (Clausen; Grabbe, 2015).

Devido à relevância dos HPA para a saúde humana, em estudos experimentais, frequentemente se utiliza um composto modelo chamado 7,12 dimetilbenzantraceno (DMBA). Este é um protótipo sintético de HPA que mimetiza as propriedades citotóxicas dos HPA e sua capacidade de induzir a formação de tumores, assemelhando-se aos HPA presentes no ambiente (Modi et al., 2012).

Assim, neste estudo, optamos pelo uso do DMBA como agente carcinogênico, uma vez que seus efeitos são semelhantes aos do composto natural e sua metabolização se dá da mesma maneira, através do Receptor de Aril Hidrocarboneto.

#### **1.4 Receptor Aril Hidrocarboneto (AHR)**

O receptor de aril hidrocarboneto (AHR) é uma proteína, codificada pelo gene *Ahr*, presente no meio intracelular, mais especificamente no citosol das células, e desempenha papéis fundamentais em diversos processos biológicos. Pertencendo à família de receptores do tipo *basic hélice-loop-hélice* (bHLH), o AHR exibe um peso molecular que varia entre 95 a 104kDa (De Souza et al., 2009). Este receptor atua como um fator de transcrição que, ao ser ativado, regula a expressão de genes associados às enzimas do citocromo P450, além de influenciar a diferenciação celular de fagócitos, a proliferação celular e desempenhar um papel importante na produção de citocinas e quimiocinas (De Souza et al., 2009).

No cenário em que um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA), tal como o protótipo sintético DMBA entra na célula, ele se liga ao receptor AHR presente no citosol. Posteriormente, este complexo receptor-ligante é transportado para o núcleo celular, onde ocorre interação com o Receptor Nuclear Translocator (ARNT). A consequente formação deste complexo inicia uma ampla cascata de sinalizações. Mais especificamente, essa combinação interage com sequências específicas de DNA, conhecidas como elementos responsivos a xenobióticos, resultando na expressão de enzimas do citocromo P450 1A (como CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B2). Estas enzimas são fundamentais na metabolização do DMBA, convertendo-o em um elemento tóxico para o organismo (Lindhe; Granber; Brandt, 2002; Gao et al., 2005).

Várias células da pele, incluindo células de Langerhans, dendríticas clássicas e linfócitos  $T\gamma\delta$ , integram as diversas populações celulares que podem ter suas funções imunoregulatórias comprometidas na presença do DMBA. Intrigantemente, a falta destas células parece oferecer uma resistência ampliada aos impactos provocados por esse composto (Modi et al., 2012).

### 1.5 Veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* e a crotóxina

A *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*) comumente referida no Brasil como cascavel, pertence à família *Viperidae*, que abriga as víboras, e é reconhecida pela sua natureza peçonhenta (Pinho; Pereira, 2001). Essa serpente tem sua distribuição na América do Sul e seu veneno foi inicialmente descrito com propriedades hemolíticas e neurotóxicas (Rosenfeld, 1971). Entretanto, pesquisas subsequentes revelaram uma composição mais complexa. Estudos demonstraram que o veneno desta serpente possui capacidade neurotóxica, miotóxica e coagulante, potencialmente levando a vítima a letalidade (Sartim; Menaldo; Sampaio, 2018; Azevedo-Marques et al., 2009).

A ação neurotóxica é desencadeada pela crotóxina (CTX), um componente que inibe a liberação de acetilcolina, resultando em um bloqueio neuromuscular que culmina em paralisia motora. Paralelamente, os efeitos miotóxicos derivam de danos às fibras musculares esqueléticas, conhecido também como efeito de rabdomiólise. (Ministério da Saúde, 2001).

Através de uma abordagem com estudos de proteomas aplicados ao veneno da *Cdt*, foi possível identificar vários de seus componentes predominantes. Notavelmente, a CTX, revelou-se como sendo a proteína mais abundante neste veneno. Além da CTX, o veneno também apresentou outros componentes como enzimas da família das fosfolipase  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>), proteases e crotamina. A composição do veneno era passível de variação de acordo com a região geográfica em que a serpente estava localizada. Neste contexto, o veneno poderia também conter componentes como as lectinas tipo C-, L-amino ácido, entre outros (Baudou et al., 2021; Melani et al., 2015; Tasima et al., 2020).

Os pesquisadores Slotta e Fraenkel-Conrat (1938) conseguiram, pioneiramente, isolar a CTX a partir do veneno bruto de *Cdt*. Alguns anos mais tarde, em 1956, sua estrutura foi determinada e retratada por Fraenkel-Conrat e Singer.



Assim, ficou estabelecido que a CTX é uma  $\beta$ -neurotoxina heterodimérica composta pela junção não-covalente de duas subunidades distintas: uma básica e uma ácida. Estas subunidades foram identificadas como fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub> ou fração CB) e crotapotina (fração CA), respectivamente (Gopalakrishnakone et al., 1984; Stocker, 1990; Vital-Brazil, 1972).

Na CTX, a subunidade básica, onde está localizada a PLA<sub>2</sub>, exibe atividade fosfolipásica. Quando associada à subunidade ácida – crotapotina –, se unem para manifestar um potencial ampliado de neurotoxicidade e miotoxicidade em conjunto (Choumet et al., 1996). Sob essa perspectiva, postula-se que a subunidade ácida pode funcionar como uma molécula de transporte (carreadora), aprimorando a atividade tóxica da PLA<sub>2</sub> (Choumet et al., 1996; Bon et al., 1989;).

A CTX é frequentemente objeto de pesquisa devido às suas propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras (Sartim; Menaldo; Sampaio, 2018). Portanto, ela tem potencial de atuar como um coadjuvante do SI em resposta a processos inflamatórios, como aqueles provocados por agentes químicos, por exemplo.

#### 1.5.1 Ação anti-inflamatória e imunomodulatória da crotoxina

Devido à predominância de CTX presente no veneno bruto de *Cdt*, pesquisadores têm investigado sua relação com os impactos biológicos induzidos por este veneno. Em vítimas de envenenamento por essa espécie, foi identificada uma resposta inflamatória mais atenuada no local da picada, com ausência de edema ou rubor significativo (Sartim; Menaldo; Sampaio, 2018). Adicionalmente, os indivíduos afetados relataram uma dor de menor intensidade e sensação de formigamento (parestesia) no local da picada, o que sugere potencialmente um efeito analgésico associado (Rosenfeld, 1971). Pesquisas subsequentes revelaram que o veneno da *Cdt* tem o potencial de modular respostas inflamatórias (Sampaio et al., 2010), exercendo não somente efeitos neurotóxicos já conhecidos, mas também apresentando propriedades anti-inflamatórias (Sampaio et al., 2003; Nunes et al., 2010), imunomodulatórios (Faure et al., 1996; Cardoso et al., 2001; Favoretto et al., 2011), analgésicos (Sant'anna et al., 2019) e antitumorais (Cura et al., 2002).

Os elementos contidos no veneno de *Cdt* demonstraram gerar uma resposta imunológica mais contida, resultando em níveis baixos de anticorpos em comparação ao veneno de outras espécies de serpentes (Sartim; Menaldo; Sampaio, 2018). Essa

observação levantou a hipótese de que a predominância da CTX no veneno poderia estar ligada a essa reduzida produção de anticorpos. Durante a atuação da CTX no organismo, há uma liberação potencial de citocinas e corticosteróides, bem como uma modulação no fluxo de células leucocitárias. Reforçando esse entendimento, uma pesquisa realizada por Cardoso e Mota (1997) evidenciou que camundongos injetados com a CTX, momentos antes do agente promotor de inflamação, apresentaram uma diminuição significativa de anticorpos IgG.

As propriedades imunomodulatórias que, junto aos seus outros efeitos presentes na CTX, apresentam uma ação de regressão tumoral, quando administrada em pequenas concentrações, provavelmente devido a uma diminuição de angiogênese\_(Cura et al., 2002; Pimenta et al. 2019). Essa observação levanta a possibilidade de componentes imunossupressores no veneno que induzem tais efeitos (Sartim; Menaldo; Sampaio, 2018). Os estudos de Cardoso et al. (2001) identificaram várias modificações celulares após a administração subcutânea em camundongos que incluíam alterações no perfil leucocitário e elevação neutrofílica. Adicionalmente, pesquisas *in vivo* revelaram que em células esplênicas de camundongos tratados com CTX houve uma inibição da produção de IL-4 e IL-10, citocinas conhecidas por suas propriedades anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, respectivamente.

Em experimentos de colite, a CTX mostrou exercer um papel modulador, transformando o ambiente pró-inflamatório para um estado anti-inflamatório. Além disso, foi capaz de suprimir tanto a resposta imunológica inata quanto a adaptativa (Almeida et al., 2015). Estudos em células pulmonares cancerígenas mostraram efeitos inibitórios de expansão celular da CTX, notando-se um aumento de células nas fases G0 e G1 do ciclo celular. Isso sugere um possível efeito antitumoral associado à apoptose e a interrupção do ciclo celular (Ye et al., 2011).

Sampaio e colaboradores (2006), mostraram que tanto o veneno em sua totalidade quanto a CTX isoladamente conseguem suprimir a fosforilação de tirosina-quinase e a expressão das proteínas Rho GTPases, majoritariamente moduladas pela via da lipoxigenase. Isso revela a capacidade da CTX em promover a liberação de lipoxina A4, um mediador lipídico formado na via das lipoxigenases, que possui efeito anti-inflamatório (McMahon; Godson, 2004) e, que além disso, possui ação inibitória em processos que estão relacionados com o crescimento de tumores (Cezar-de-Mello et al., 2008; Fierro, 2005).

Dado que a CTX apresentou em diversos estudos propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias, avaliou-se seu potencial em impactar o desenvolvimento de lesões papilomatosas na derme de camundongos quando estimulados pelo carcinógeno DMBA.

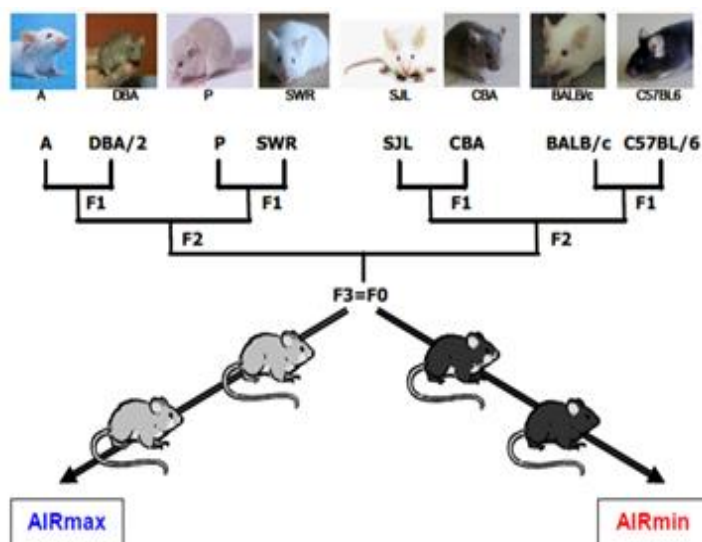
## 1.6 Modelo Experimental

Constantemente são desenvolvidos inúmeros estudos sobre o controle genético da resposta imunológica inata e adaptativa no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Esses estudos são realizados utilizando como base um modelo de camundongos com linhagens selecionadas fenotipicamente para resposta inflamatória aguda máxima (AIRmax) ou resposta inflamatória aguda mínima (AIRmin) em relação a reação do organismo na presença de corpos estranhos quimicamente inertes, como gel de poliacrilamida (Biogel) (Ibanez, et al., 1992; Stiffel et al., 1990). Cada uma dessas linhagens apresentam uma sensibilidade antagônica referente a outra quando são expostos a produtos carcinogênicos na pele (Biozzi et al., 1998a; De Souza et al., 2009), cólon (Di Pace et al., 2006), pulmão (Ribeiro et al., 2005; Maria et al., 2003), e fígado (Carvalho et al., 2019) também efeitos deletérios na medula óssea (Katz et al., 2014, 2016). Em virtude disso, este modelo de animal é frequentemente utilizado para estudos de doenças cujo as ações inflamatórias sejam relevantes.

Esses animais foram produzidos por seleção fenotípica a partir de uma população inicial (F0) geneticamente heterogênea resultante de cruzamentos entre oito linhagens de animais isogênicos (A, DBA/2, P, SWR, SJL, CBA, BALB/c e C57Bl6) (Stiffel et al., 1990). A partir de então, foram realizados cruzamentos com o propósito de distinguir a intensidade da reação inflamatória aguda (AIR) como fenótipo medido pelo influxo celular e exsudação plasmática no tecido subcutâneo produzido pela injeção subcutânea de microesferas de poliacrilamida (Biogel) (Ibanez et al., 1992; Stiffel et al., 1990). Ao final da seleção de acasalamentos de vinte gerações, alcançou-se o limite de seleção quando os alelos responsáveis pela resposta inflamatória máxima ou mínima se estabilizaram em homozigose nas linhagens AIRmax e AIRmin (Figura 1), respectivamente. Os animais resultantes destes cruzamentos são homozigotos para os genes relacionados e apresentam um fundo genético heterogêneo como o de uma população natural, como a humana, constituindo,

portanto, um modelo adequado para o estudo de características multifatoriais como neoplasias.

**Figura 1** - Seleção genética das linhagens AIRmax e AIRmin.



**Fonte:** Modificado de Ibanez, O.M. 1992

Análises realizadas sobre a tumorigênese de pele nesses animais (Biozzi et al., 1998b) demonstraram que há um polimorfismo no gene *Ahr* que codifica o receptor AHR (De Souza et al., 2009). É sabido que neste polimorfismo, no éxon 7 há uma perda do sítio de ligação que corresponde a enzima de restrição ECO47III, e verifica-se também a substituição da Valina pela Alanina no éxon 9, posição 375, que propicia alterações estruturais e funcionais. Devido a essas modificações, foi possível estabelecer se a afinidade do receptor AHR era baixa (*Ahr<sup>d</sup>*) ou alta (*Ahr<sup>b1</sup>*) aos seus ligantes nas linhagens de camundongos AIRmax e AIRmin, respectivamente.

Em razão disso, foi proposto um estudo sobre a dinâmica celular da pele sobre os efeitos epicutâneos causados pelo DMBA com a utilização da CTX como um potencial agente imunomodulador nas linhagens AIRmax e AIRmin, visto que, esses animais possuem diferenças quanto à resistência à carcinogênese cutânea, no qual a linhagem AIRmin apresenta uma susceptibilidade maior na indução de lesões papilomatosas (Biozzi et al., 1998a; De Souza et al., 2009). Além disso, Muller et al.,

(2008) apontou que a utilização de um agente promotor da inflamação, como o 12-Otetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), é capaz de induzir uma alta reatividade inflamatória local, facilitando e aumentando o número de lesões papilomatosas após a aplicação do indutor DMBA. Sendo assim, também é muito utilizado em pesquisas que envolvem indução a carcinogênese cutânea.

Estes estudos poderão auxiliar no entendimento sobre os mecanismos celulares envolvidos na carcinogênese de pele não melanoma e nos possíveis efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores da CTX. O fato destes animais apresentarem diferentes respostas inflamatórias e de possuírem um fundo genético heterogêneo, são, portanto, um modelo adequado para estudos, pois se assemelham à população humana.

## **2 OBJETIVOS**

O propósito deste estudo é analisar a influência da CTX na formação de lesões papilomatosas ou tumorais na pele dos camundongos AIRmax e AIRmin quando induzidas pelo DMBA em duas abordagens diferentes: na primeira, o DMBA é aplicado na pele uma vez ao dia por cinco dias consecutivos; na segunda, adotamos o protocolo de dois estágios, que envolve uma única aplicação de DMBA seguida de aplicações semanais de TPA. Com isso investigamos:

- O surgimento de lesões papilomatosas nos dois protocolos utilizados;
- Modificações histológicas da pele em variados momentos decorrentes dos tratamentos;
- Diferenciações celulares na pele por meio da imunofenotipagem;
- Impactos da CTX em peles com lesões papilomatosas;
- A capacidade imunomoduladora da CTX, levando em conta todas as características fenotípicas de resposta inflamatória observadas nesses animais.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Camundongos**

Foram utilizados camundongos fêmeas das linhagens AIRmax e AIRmin com 8 semanas de idade, das gerações F83-F85 de seleção. Esses animais foram mantidos no biotério de criação do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan em regime alimentar convencional e água *ad libitum*. A manipulação desses animais foi realizada sob os preceitos da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto Butantan, nº1311160321.

#### **3.2 Produção de anticorpos anti-crotoxina em camundongos AIRmax e AIRmin**

Na preparação da CTX em Alum foram misturados nas proporções de 1:10 de acordo com as doses determinadas, segundo Favoretto et al., (2011) na imunização por albumina sérica humana (HSA): Para a imunização foram preparadas duas doses de 1,4 µg de CTX para 14µg de Alum (AIRmax) e 0,9 µg de CTX para 9µg de Alum (AIRmin). As concentrações foram baseadas em experimentos realizados pelo nosso grupo do laboratório. A administração foi realizada por via subcutânea no dorso dos animais, fêmeas, AIRmax (N=20) e AIRmin (N=20). Os tempos de imunização com a CTX foram: 0, 14, 21 e 28 dias. No 35º dia foram feitas as sangrias totais. Grupos de 6 camundongos de cada linhagem foram utilizados como controle não imunizados. Para a dosagem de anticorpos anti-CTX foi feito um *pool* do soro dos animais de cada linhagem. A titulação foi realizada em ensaios de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e determinada por leitura a 492nm em leitor de ELISA.

#### **3.3 Determinação da dose não tóxica de crotoxina para aplicação epicutânea em camundongos AIRmax e AIRmin**

Com o objetivo de determinar a melhor concentração da CTX para ser aplicada na pele do dorso dos animais e que não resultasse em toxicidade para poder avaliar seu efeito modulador no aparecimento de papilomas, tratamos camundongos AIRmax e AIRmin nas concentrações de 160µg/kg, 320µg/kg, 640µg/kg e 1.280 µg/kg.

Como não há estudos sobre doses de CTX por via de aplicação epicutânea, essas concentrações foram baseadas no estudo intraperitoneal desenvolvido por Sant'Anna et al., (2019). Para a concentração de 160µg/kg foram utilizados 2 animais controles e 6 animais tratados de cada linhagem e para as outras concentrações foram utilizados 3 animais controles e 3 animais tratados de cada linhagem. Foi feita a aplicação de 100µl de CTX diluída em acetona, nas diferentes concentrações, por 5 dias consecutivos. Após o quinto dia, não observamos qualquer efeito tóxico no que concerne às manifestações clínicas de dispneia, taquicardia e prostração. Nesse momento, após eutanásia, retiramos as peles para avaliação da presença da CTX no tecido digerido dos animais tratados com as diferentes doses de CTX, seguindo o protocolo de extração de Malosse; Henri (2016) e o sobrenadante foi coletado para detecção da CTX no macerado da pele por teste de ELISA por espectrometria a 492nm. A CTX utilizada para todos os experimentos realizados foi purificada e obtida por pesquisadores do laboratório de Imunogenética em colaboração com o laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan.

#### **3.4 Imunohistoquímica da pele na concentração de 1.280µg/kg de crotoxina**

Para avaliar a presença de CTX na pele, realizamos um teste de imunohistoquímica de secções da pele do dorso tratada epicutaneamente com Acetona (controle) ou CTX na concentração de 1.280µg/kg (100µl por dia diluídos em acetona) por 5 dias consecutivos. Após o último dia de aplicação as peles dos animais foram retiradas e colocadas em agitação de formol por 24 horas para então processar os cortes histológicos e seguir o processo de incubação com soro anti-CTX produzidos em camundongos AIR ou anti-veneno produzido em coelho imunizado com veneno de *Cdt*, cedido pelo laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan. Os animais foram divididos em dois grupos: acetona = 3/linhagem e CTX 1.280µg/kg = 3/linhagem.

#### **3.5 Efeito modulatório da crotoxina nas concentrações de 1.280µg/kg e 320µg/kg**

Considerando a inexistência de efeitos tóxicos locais ou sistêmicos, foi elaborado um protocolo para avaliar os efeitos modulatórios da CTX, nas concentrações 1.280µg/kg e 320µg/kg, sobre a indução de lesões papilomatosas por

aplicação epicutânea de DMBA por 5 dias consecutivos (DMBA 5x) em diferentes combinações com CTX. Os animais foram divididos em grupo G1: acetona (controle); G2: DMBA 5x; G3: DMBA5x + CTX3x (1x na semana por 3 semanas); G4: CTX 2 dias antes + DMBA5x e; G5: CTX 2 dias antes + DMBA5x + CTX3x (1x na semana por 3 semanas).

Todos os grupos, com exceção do controle acetona, receberam DMBA por cinco dias consecutivos (50µg em 100µl de acetona - 1x ao dia). Os grupos G4 e G5 receberam a CTX dois dias antes da aplicação tópica do DMBA e os grupos G3 e G5 receberam CTX uma vez na semana, após o fim do DMBA, por três semanas consecutivas. A pele dos animais foi raspada dois dias antes do experimento com um tosquiador elétrico. Após o fim das aplicações, os animais foram observados por um período de aproximadamente 80 dias.

### **3.6 Indução de carcinogênese em dois estágios (DMBA/TPA) e tratamento com crotoxina e veneno bruto.**

O modelo clássico de indução de lesões papilomatosas por DMBA consiste de dois estágios com aplicação epicutânea no dorso dos animais de DMBA (25µg) dissolvido em 100µL acetona seguida de aplicações de 5µg de TPA dissolvido em 100µL de acetona. A pele do dorso de cada animal foi raspada com um tosquiador elétrico dois dias antes do início do experimento. Os animais AIRmax e AIRmin foram divididos em 4 grupos de 5 animais cada: acetona (G1), DMBA/TPA (G2), DMBA/TPA/CTX (G3) e, DMBA/TPA/VENENO (G4). Os tempos de análise foram 7, 20, 80 e 120 dias.

Os animais dos grupos G2 a G4 receberam aplicação tópica de DMBA (25µg) dissolvido em 0,1mL de acetona. Uma semana após a aplicação do DMBA, o TPA (5µg em 0,1mL de acetona) foi aplicado duas vezes por semana durante um período de 120 dias. A CTX na concentração de 320µg/Kg em 0,1mL de acetona foi aplicada nos animais do grupo G3 30 minutos antes da aplicação do TPA (2x semana) durante todo o período de 120 dias. O mesmo foi realizado com o grupo G4 que recebeu o veneno bruto na concentração de 540µg/Kg. A concentração do veneno foi determinada considerando que a CTX faz parte de 60% do veneno bruto, e sendo utilizada no nosso experimento na concentração de 320µg/kg.



A utilização desse protocolo de DMBA/TPA parte do objetivo da indução para alta reatividade inflamatória local, sendo o TPA um agente promotor nesse processo com o propósito de facilitar e aumentar o desenvolvimento das lesões papilomatosas após a aplicação do indutor carcinogênico DMBA (MULLER et al., 2008).

### **3.7 Indução a carcinogênese em dois estágios (DMBA/TPA) e tratamento com crotoxina epicutânea ou subcutânea**

Utilizamos o mesmo modelo de indução de lesões papilomatosas em dois estágios para analisar os efeitos da CTX epicutânea (CTX<sup>epi</sup>) ou subcutânea (CTX<sup>sub</sup>) quando aplicada uma vez na semana durante um período de 80 dias. A dose de CTX<sup>epi</sup> utilizada permaneceu sendo de 320µg/Kg e a dose de CTX<sup>sub</sup> foi baseada em experimentos de DL50 realizados no laboratório, onde cada linhagem apresentou diferença em relação a dose (AIRmax 602µg/Kg e AIRmin 562µg/Kg) sendo assim, foi feita uma média desses valores e utilizado 0,05 da DL50 que equivale a 0,82µg/animal.

Os animais foram divididos em quatro grupos de 5 animais de cada linhagem. Os grupos foram: acetona/PBS1x (G1), DMBA/TPA (G2), DMBA/TPA/ CTX<sup>epi</sup> (G3) e, DMBA/TPA/CTX<sup>sub</sup> (G4). Os tempos de análise foram 20, 40 e 80 dias.

Os animais dos grupos G2 a G4 receberam aplicação tópica (epicutânea) de DMBA (25µg) dissolvido em 0,1mL de acetona. Uma semana após a aplicação do DMBA, o TPA (5µg em 0,1mL de acetona) foi aplicado duas vezes por semana durante um período de 80 dias. A CTX<sup>epi</sup> foi aplicada nos animais do grupo G3 um dia antes da aplicação do TPA, apenas uma vez na semana durante todo o período. O grupo G4 que recebeu a CTX<sup>sub</sup> teve sua aplicação realizada no mesmo dia do grupo G3, também uma vez na semana apenas por período igual.

### **3.8 Análise histológica da pele**

Os fragmentos da pele dos camundongos AIRmin e AIRmax, após os tratamentos, foram coletados, fixados em formaldeído a 10% e processados conforme a rotina do laboratório. Em resumo, os fragmentos de pele foram desidratados, diafanizados e embebido em parafina e cortados em micrótomo na espessura de 5 µm e corados com hematoxilina-eosina (H&E). Todas as análises patológicas foram

realizadas por um patologista certificado e a cegas. Para a análise histopatológica os tecidos ou células anormais foram classificados com base nas alterações observadas, classificando em lesões displásicas observadas em lesões pré-malignas e lesões malignas seguindo a seguinte métrica: 0 – tecido normal; 1 – inflamação crônica, ulceração, atrofia ou hiperplasia; 2 – Atipia celular, metaplasia ou célula em estágio de mitose; 3 – displasia; e 4 – carcinoma positivo. A evolução da tumorigênese, bem como a ocorrência de lesões pré-cancerosas e cancerígenas nos camundongos AIRmin e AIRmax foram comparados no quesito temporal e experimental dentre os tratamentos. As análises realizadas com o protocolo de DMBA 5x não foram submetidas às avaliações por *scores*.

### **3.9 Processo de extração da pele dorsal para obtenção das células**

Para a obtenção das células da pele, inicialmente todos os animais foram eutanasiados, tiveram o dorso raspado para a retirada dos pelos e o tecido foi em seguida cortado e colocado em placa de Petri incubado *overnight* a 4°C com 0,4mg/ml de dispase II (Roche) diluída em 2 ml de PBS para separar a epiderme da derme. Após o período de incubação, as peles foram secas em papel toalha, cortadas em pequenos pedaços e transferidas para uma nova placa de Petri com 2ml de solução colagenase IV (Gibco) em concentração 1,5mg/mL, que digere o colágeno tipo IV maior constituinte da membrana basal, e DNase (Deoxiribonuclease I de pâncreas bovino) (Roche) em concentração 0,36mg/mL, que quebra o DNA liberado durante a dissociação do tecido e evita a perda de células por aglutinação, e incubadas por mais 30 minutos a 37°C. Após a incubação, foram adicionados mais 2ml de solução colagenase e DNase em cada placa e homogeneizado. Esse processo se repetiu por mais duas vezes. No final da última incubação, o conteúdo foi passado através de uma peneira de aço inox (porosidade 70µm) coletando o material de interesse em tubos Falcon de 50ml com um êmbolo de uma seringa e em seguida lavado com 1ml de PBS+10% de Soro Fetal Bovino (SFB). O material coletado foi filtrado em filtro de nylon umedecido com 1ml de PBS+10%SFB. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 1500rpm por 5 minutos a 4°C. Depois, foram adicionados 4ml de Percoll a 40% em tubos Falcon e as células foram ressuspensas em 4ml de Percoll a 70% lentamente para visualizar as duas fases que se formam. As amostras então, foram centrifugadas a 1200rpm por 20 minutos a 10°C sem pausa e sem aceleração. Após a centrifugação

as células de interesse estavam localizadas na interface entre as duas camadas de Percoll, que tem como propósito separar as células por gradiente de densidade. Por fim, foi coletado o anel de células de interesse (cerca de 2ml) e adicionados a 5ml de PBS+2%SFB para lavagem e posterior contagem na câmara hemocitométrica de Malassez.

### 3.10 Imunofenotipagem das células

Suspensões celulares ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram obtidas da pele e primeiramente incubadas com o marcador de viabilidade celular *Fixable Viability Stain* (FVS) acoplado ao fluorocromo Pacific-Blue, a uma concentração de 1:1000 diluído em PBS por 15 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação foram adicionados 200 $\mu$ L de PBS+2%SFB e as suspensões celulares centrifugadas. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo anti-receptor porção Fc de imunoglobulina (CD16/CD32) (clone 2,4G2) ( $1 \mu\text{g}/10^6$  céls) por 10 minutos a 4°C, para evitar ligação inespecífica. Em seguida, foram adicionados 200 $\mu$ L de PBS+2%SFB e as suspensões celulares centrifugadas. Estas células foram incubadas com anticorpos específicos ( $1 \mu\text{g}/10^6$  células) às moléculas CD3-PECy7 (clone 145-2D11), TCR $\gamma\delta$ -PE (clone GL3), CD11c-PEcy7 (clone HL3), CD11b-PE (clone M1/70), Gr1-APC-Cy7 ou FITC (clone RB6-8C5) e CD207-Alexa Fluor 647 (clone 81E2 Human CD207) em PBS+2%SFB por 30 minutos a 4°C. Para avaliação do CD207 intracelular, as células foram fixadas com 200 $\mu$ L do tampão de fixação (BD Pharmingen) diluído em PBS por 20 min/4°C. Após este período, foram lavadas e centrifugadas a 1200rpm por 5 minutos a 4°C. Em seguida, foram incubadas com solução de permeabilização (BD Pharmingen) por 20 minutos a 37°C, lavadas com 200  $\mu$ L de PBS + 2% SFB e novamente centrifugadas. As células foram então incubadas com anti-CD207-Alexa Fluor 647 por 20 minutos em temperatura ambiente e posteriormente lavadas e centrifugadas. As células não marcadas foram utilizadas como controle, ressuspensas em PBS+2%SFB e analisadas em citômetro de fluxo (FACScanto II) e considerados 20.000 eventos. Os resultados foram analisados pelo programa FlowJo™ (Tree Star) V.10.

### 3.11 Análise estatística

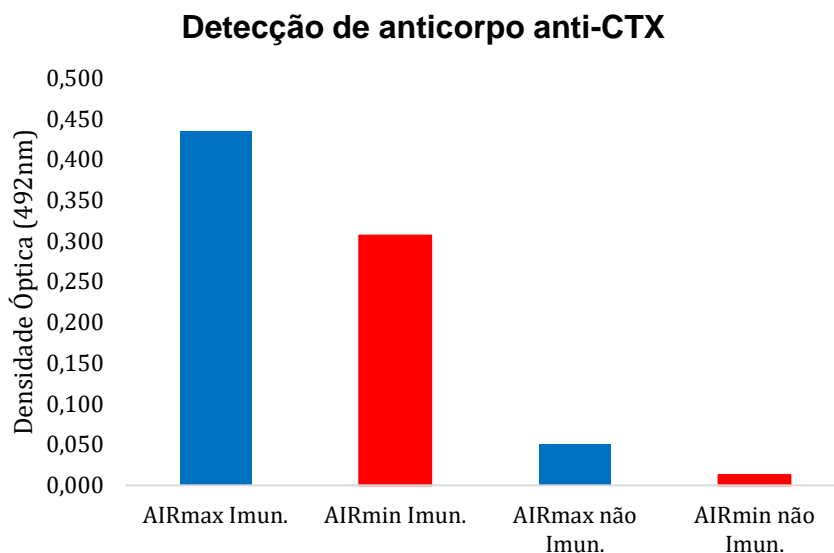
Na análise estatística realizada, as diferenças entre as médias foram calculadas por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey para a comparação entre os grupos. Foi considerado como valores significativos de  $p$ , inferiores a 0,05 bicaudal. O coeficiente de correlação de Person ( $r$ ) foi determinado para os testes de correlação entre duas variáveis, considerando intervalo de confiança de 95%, sendo significativa para  $p < 0,05$ .

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Produção de anticorpos anti-crotoxina**

A produção de anticorpos anti-CTX mostrou-se necessária para os experimentos de detecção da CTX no extrato da pele ou em cortes histológicos por imunohistoquímica. Para tanto, camundongos AIRmax e AIRmin foram imunizados por via subcutânea com 1,4  $\mu\text{g}$  e 0,9  $\mu\text{g}$  de CTX, respectivamente, conforme a metodologia proposta por Favoretto et al., (2011). Após a imunização, observou-se que esses animais exibiram níveis elevados de anticorpos, sendo uma quantidade significativamente maior quando comparados ao grupo controle, que não foi submetido a qualquer imunização (Figura 2). Estes resultados são indicativos de que a imunização realizada foi eficaz na produção de anticorpos específicos contra a CTX e que serão utilizados nos experimentos subsequentes para fins de detecção da CTX.

**Figura 2** - Produção de anticorpos anti-CTX. Os dados referem-se aos *pools* de soros de camundongos AIRmax (azul) e AIRmin (vermelho) imunizados ou não com CTX.



**Fonte:** autoria própria.

#### 4.2 Determinação da dose não tóxica de crotoxina

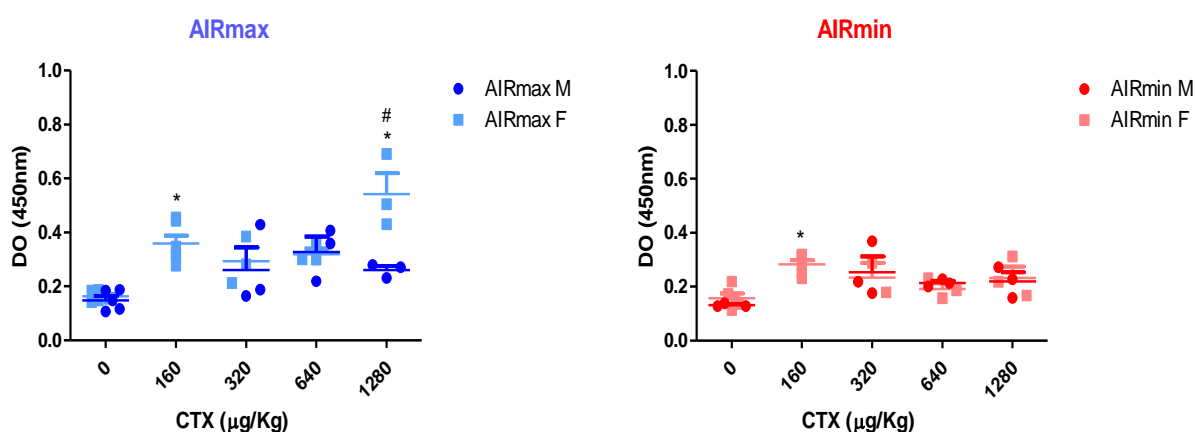
A literatura científica, até o momento, não apresenta informações ou dados a respeito dos efeitos decorrentes da aplicação epicutânea (tópica) da CTX. Dada essa lacuna de conhecimento, foi de extrema importância realizar um experimento que buscasse identificar se a CTX, quando aplicada dessa forma, poderia provocar algum tipo de efeito – seja ele localizado na área de aplicação, sistêmicos ou letais – nos animais em estudos.

Neste contexto, dois grupos de camundongos, AIRmax e AIRmin, foram submetidos a doses progressivas de CTX<sup>epi</sup>. Durante e após o experimento, foi observado nos animais potenciais sinais ou sintomas adversos, tais como lesões cutâneas, complicações respiratórias, sinais de letargia ou letalidade.

Como foi observado que os animais não apresentaram nenhuma dessas manifestações clínicas, realizamos um experimento de ELISA utilizando os extratos da pele (Figura 3) para determinar se a CTX estava de fato presente no tecido. Os resultados desse experimento confirmaram positivamente a presença da CTX na pele dos animais em todas as concentrações que foram utilizadas, sobretudo nas fêmeas

tratadas com as doses de 160 (AIRmax e AIRmin) ou 1.280 (AIRmax)  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso corpóreo.

**Figura 3** - Presença de CTX no macerado de pele dos animais tratados com diferentes concentrações aplicadas epicutâneamente no dorso de camundongos AIRmax (azul) e AIRmin (vermelho). Os resultados são expressos individualmente e em média  $\pm$  DPM. \*Diferença relativa ao grupo controle e # em relação às demais doses,  $p < 0,05$ .



**Fonte:** autoria própria.

Com base nas observações coletadas, optamos por utilizar a dose de 1.280  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , sendo essa a de maior concentração testada. Tínhamos o interesse de averiguar se, devido à alta concentração de CTX, quando em contato direto com a pele, poderíamos observar uma inibição mais significativa das lesões papilomatosas produzidas por DMBA. Além disso, optamos por utilizar a dose intermediária de 320  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , baseando-se no fato de que essa concentração está mais próxima da menor dose testada (160  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), e queríamos garantir que, ao usar doses muito baixas, não comprometeríamos a indução dos efeitos modulatórios.

Esta precaução era especialmente pertinente dado que, até o momento não dispúnhamos de informações ou dados científicos concretos sobre os efeitos resultantes da aplicação cutânea de CTX. Portanto, com base nesses critérios e observações, estabelecemos as doses de 1.280 e 320  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  a serem utilizadas nos experimentos subsequentes.

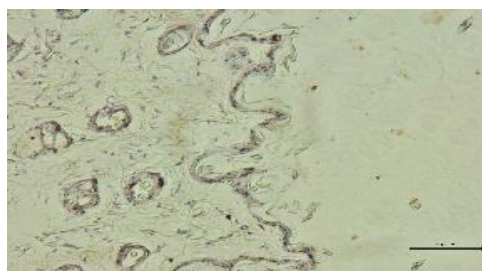
### 4.3 Interação da crotoxina com a pele

Para entender melhor a interação da CTX com a pele, tratamos epicutaneamente animais AIRmax com a dose de 1.280µg/Kg por 5 vezes consecutivas e, após este período, a pele foi processada para a realização do teste de imuno-histoquímica. Este teste visou avaliar a localização da CTX no epitélio da pele após sua aplicação epicutânea.

Como observado na figura 4, caracterizamos a CTX com cor levemente marrom nos cortes do animal AIRmax tratado com acetona e revelados com soro anti-veneno de coelho, provavelmente devido à ligação inespecífica. Entretanto, na lâmina do animal tratado com CTX e que recebeu o soro de coelho específico (anti-CTX), observamos que a marcação ocorre em todo o tecido com maior prevalência na camada epidérmica e queratinosa (estrato córneo), demonstrado pela seta. Já a lâmina do animal tratado com CTX revelada com anti-CTX de camundongo teve uma marcação muito acentuada revelando estruturas específicas. Porém, este resultado não está confirmado já que a lâmina do animal tratado com a CTX marcada com soro controle de um animal não imunizado, apresentou intensa marcação exibindo, provavelmente, uma ligação inespecífica. A lâmina de tratamento com a CTX sem soro de camundongo e sem soro de coelho mostrou claramente ser um controle negativo, pois não apresentou nenhuma marcação.

Assim, constatamos que a utilização do soro de camundongo pode ocasionar ligações inespecíficas. Portanto, entendemos que novas avaliações deverão ser realizadas com o soro de coelho imunizado ou não com CTX com os quais iremos padronizar o protocolo para reduzir ao máximo as ligações inespecíficas.

**Figura 4** - Imunohistoquímica da pele de um camundongo tratado com acetona e um tratado com CTX 1.280µg/Kg da linhagem AIRmax. Lâminas em cortes de 5µm foram incubadas com soro de camundongo ou coelho e em seguida com anticorpo secundário marcado com peroxidase como revelador. Foi utilizada a objetiva de 10x (100µm) em Microscópio Óptico Diaplan Leica e Câmera Leica modelo DFC295.



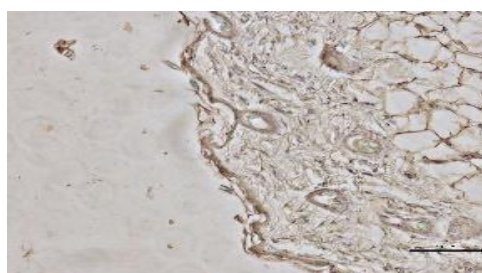
Animal tratado com Acetona:  
Soro de Coelho anti-veneno  
total



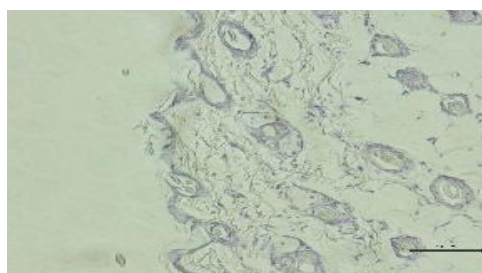
Animal tratado com CTX:  
Soro de Coelho anti-CTX



Animal tratado com CTX: Soro  
de Camundongo anti-CTX



Animal tratado com CTX:  
Com soro normal (animal  
não imunizado)



Animal tratado com CTX:  
Sem soro

**Fonte:** autoria própria.



## 4.4 Efeito da crotoxina nas lesões papilomatosas induzidas por DMBA 5x

### 4.4.1 Avaliação dos Papilomas

Com o objetivo de investigar o potencial modulador da CTX sobre o surgimento de lesões papilomatosas, camundongos fêmeas das linhagens AIRmax e AIRmin foram divididos em grupos onde o controle positivo foi submetido a um tratamento que consistiu em 5 aplicações consecutivas (diárias) de DMBA na concentração de 50µg por camundongo, diluído em 100µL de acetona, e os demais grupos receberam, além das aplicações de DMBA, doses específicas de CTX a 1.280µg/Kg ou 320µg/Kg, em três diferentes aplicações epicutâneas. Após tratamento, os camundongos foram monitorados por um período de 80 dias e o número de lesões papilomatosas na pele foi registrado na figura 5.

Durante as observações, notamos que por volta de 4 dias após a aplicação, os camundongos AIRmin, de todos os grupos e concentrações de CTX e que foram submetidos ao tratamento com DMBA, começaram a mostrar sinais de dermatite de contato na região dorsal. Este quadro de dermatite se manteve presente em muitos dos animais por um período que se estendeu até cerca de vinte dias. No entanto, vale ressaltar que alguns destes animais apresentaram sintomas de dermatite por período mais prolongado. A partir do 25º dia pós-tratamento, começaram a surgir as primeiras lesões papilomatosas.

Durante todo o período de avaliação observamos que o número de papilomas em camundongos tratados com a dose de 1.280µg/Kg de CTX estava elevado em todos os grupos da linhagem AIRmin. Este aumento tendeu a se estabilizar por volta do 50º dia pós-tratamento. Notamos que no intervalo entre os dias 30 e 40, a multiplicidade de lesões foi notavelmente menor nos animais que receberam o tratamento com CTX antes da aplicação de DMBA (grupos G4 e G5). No entanto, após esse período específico, o número de lesões nesses animais se igualou aos demais grupos tratados.

Quanto à frequência com que os animais foram afetados pelas lesões, notamos que havia uma menor proporção no grupo G3 – tratados com DMBA seguido de três doses de CTX uma vez por semana por três semanas seguidas, com incidência de 30%. Em contraste, o controle positivo G2, que foi tratado exclusivamente com DMBA,

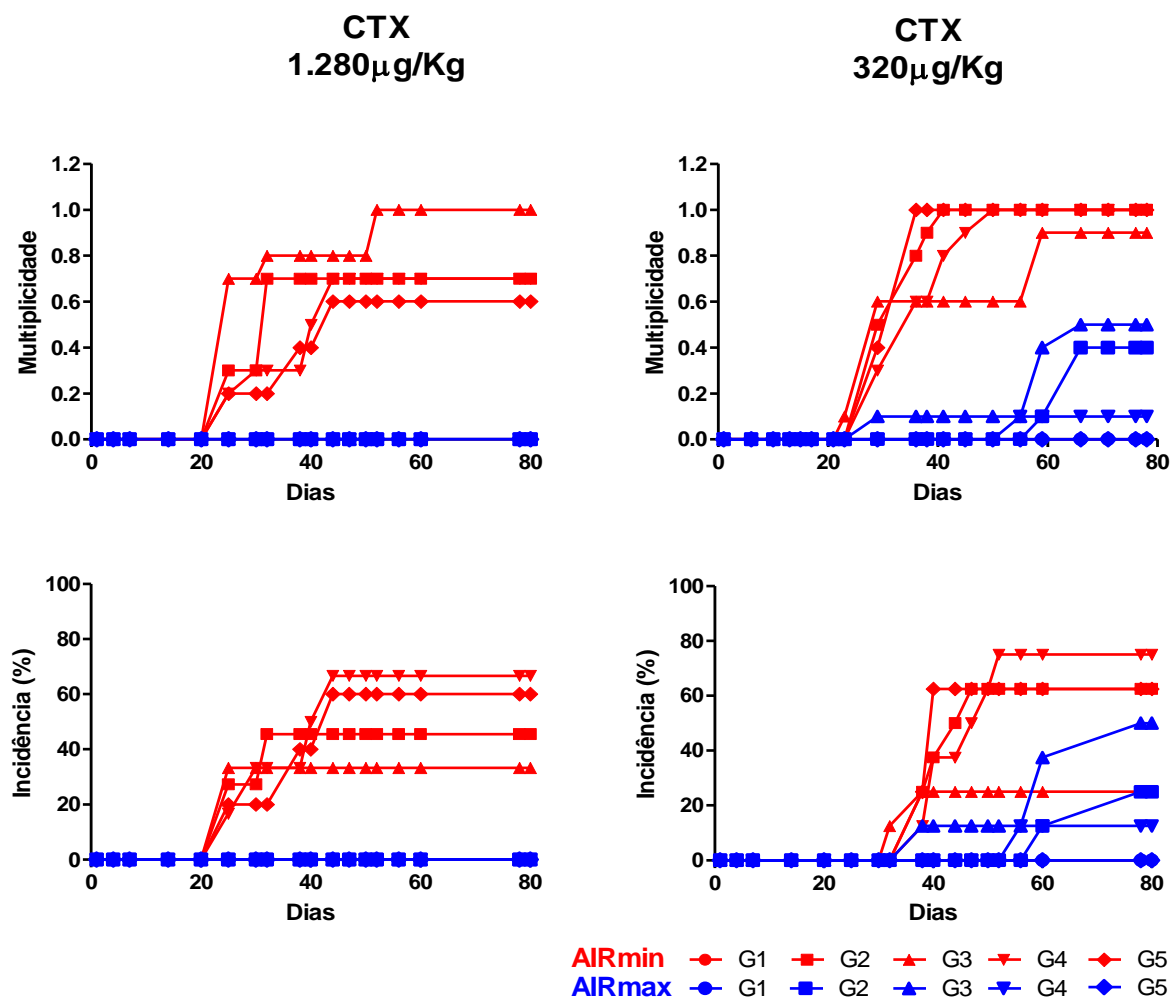
apresentou uma incidência maior, de 50%. A representação gráfica das lesões observadas nos animais após 70 dias de tratamento pode ser vista na figura 6. Nenhuma lesão foi observada nos camundongos AIRmax no tratamento de 1.280 $\mu$ g/Kg de CTX.

Em relação à dose de 320 $\mu$ g/Kg de CTX, os camundongos da linhagem AIRmin apresentaram um aumento notável no número de lesões em todos os grupos, já a partir dos 20 dias de tratamento. Esse crescimento tende a se estabilizar por volta dos 40 dias, com uma média registrada de uma lesão por animal. Para as duas doses de CTX, os animais da linhagem AIRmin do grupo G3 (DMBA+CTX 3x) apresentaram menor incidência, cerca de 30% quando comparados aos outros grupos que atingiram níveis de 60%.

Os animais da linhagem AIRmax também desenvolveram lesões na dose de 320 $\mu$ g/Kg de CTX, porém a resposta ao desenvolvimento foi lenta e gradual. A média observada para esses animais foi de, no máximo 0,4 lesões por camundongo, e isso foi notado aproximadamente no 60º dia de observação (Figura 6). Esse padrão sugere que os animais dessa linhagem têm uma sensibilidade reduzida aos efeitos provocados pelo DMBA 5x, observação descrita anteriormente por Biozzi et al. (1998b).

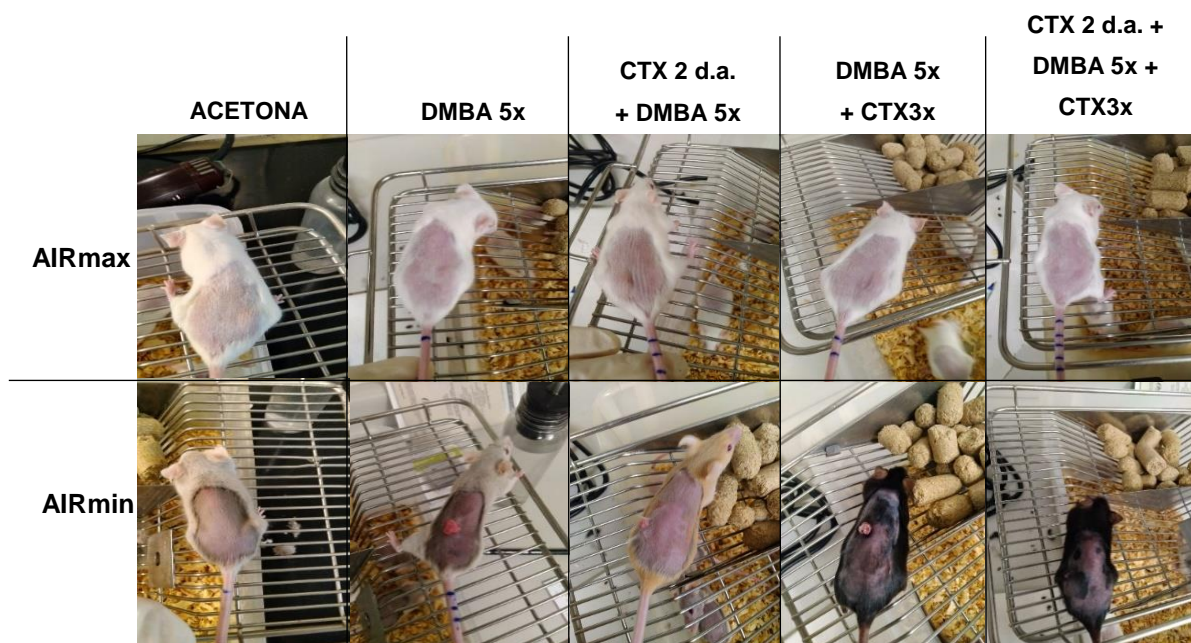
Na figura 7 representamos as lesões dos animais AIRmax e AIRmin no tratamento de 320 $\mu$ g/kg aos 70 dias.

**Figura 5** - Evolução da multiplicidade e incidência de papilomas em camundongos AIRmin (—); AIRmax (—) para as concentrações de 1.280 $\mu$ g/kg e 320 $\mu$ g/Kg de CTX. Os grupos consistiram de: acetona (**G1**), DMBA 5x (**G2**), DMBA 5x + CTX 1x por semana por três semanas (**G3**), CTX 1x dois dias antes do DMBA 5x (**G4**) e CTX 2 dias antes do DMBA 5x + CTX 1x por semana por três semanas (**G5**).



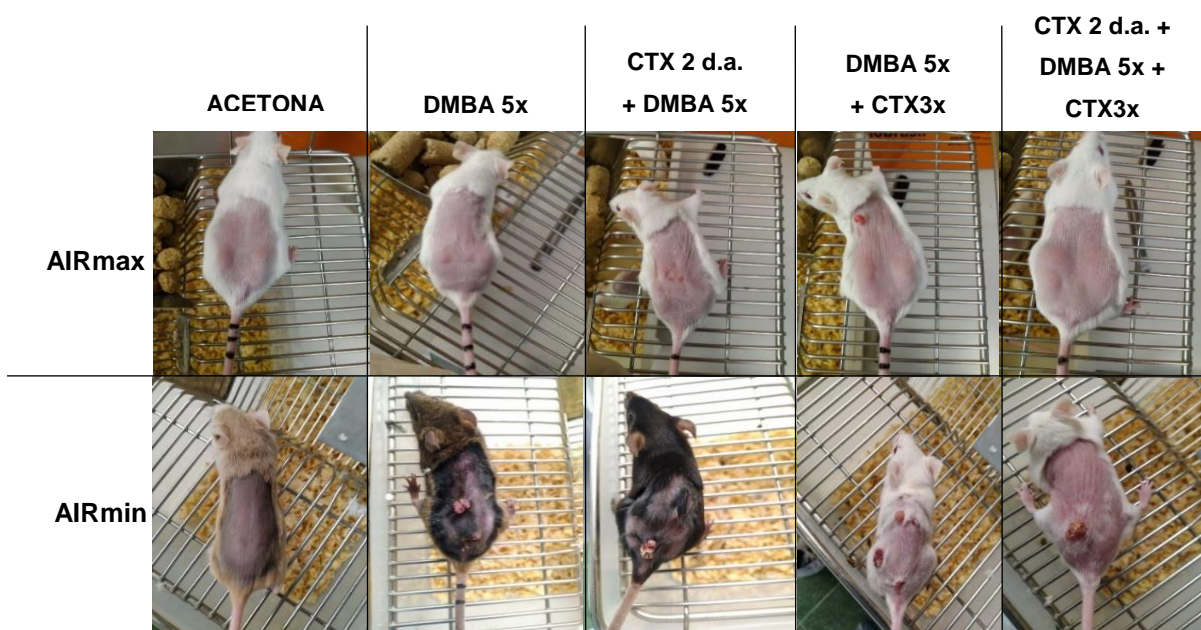
Fonte: autoria própria.

**Figura 6** - Avaliação de 70 dias da pele do dorso dos animais no tratamento com a CTX na concentração de 1.280 $\mu$ g/Kg.



Fonte: autoria própria.

**Figura 7** - Avaliação de 70 dias da pele do dorso dos animais no tratamento com a CTX na concentração de 320 $\mu$ g/kg.



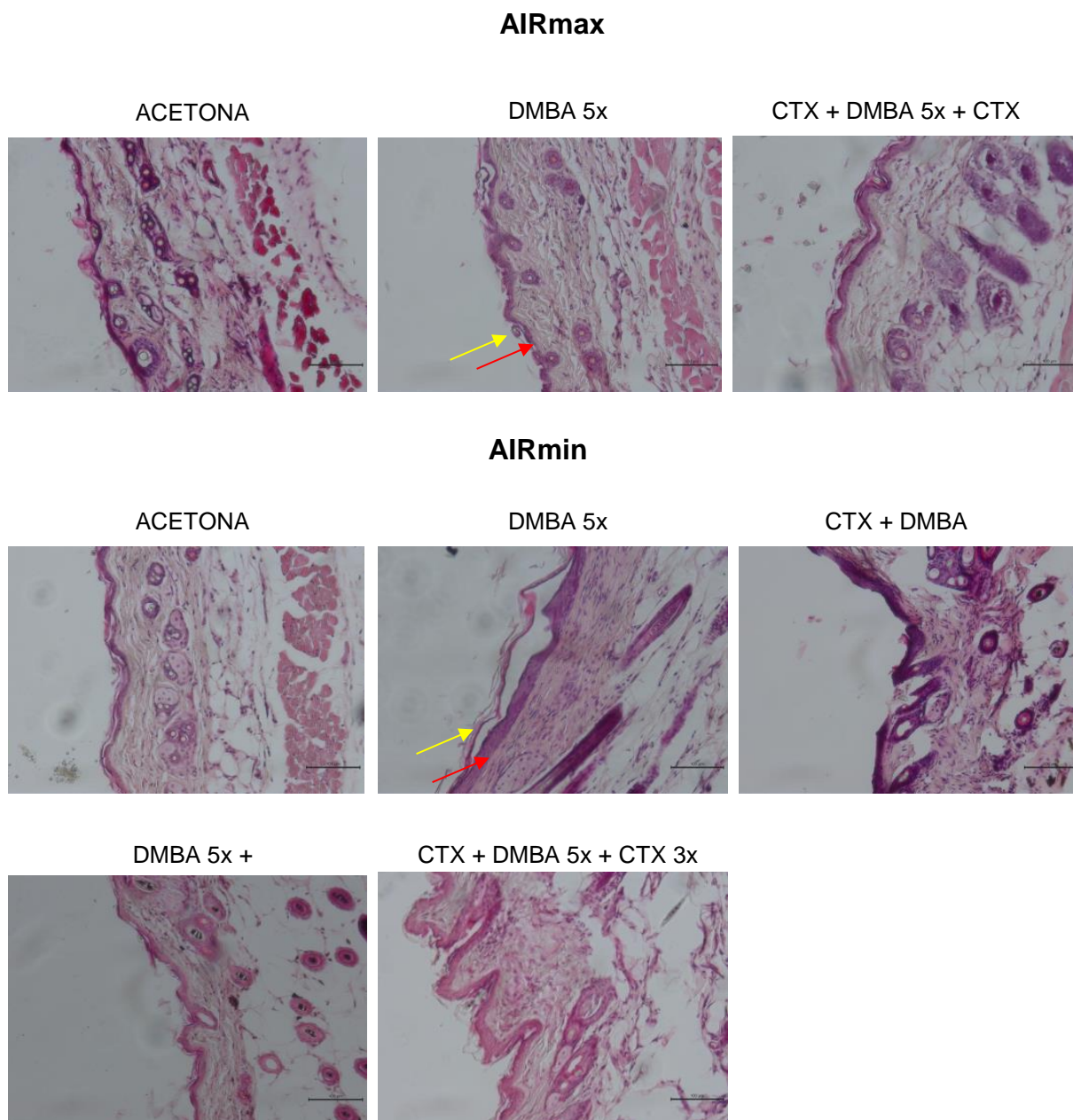
Fonte: autoria própria.

#### 4.4.2 Análise histológica

Para verificar possíveis modificações na estrutura da pele causadas pela ação da acetona, DMBA ou crotoxina, foram feitos cortes histológicos dos animais que receberam Crotoxina na dose de 1.280 $\mu$ g/kg (Figura 8).

Nas imagens representativas notamos que há um aumento da espessura da camada epidérmica e dérmica nos animais AIRmin que foram tratados com DMBA, quando comparados aos animais do grupo controle acetona e aos animais da linhagem AIRmax que não apresentaram essas diferenças nas camadas citadas. Devido a problemas técnicos, não foi possível confeccionar as lâminas para a análise dos grupos de animais tratados com a dose de 320 $\mu$ g/kg de CTX. Todas as lâminas com as duas doses foram apresentadas a título ilustrativo, necessitando posterior avaliação por um patologista.

**Figura 8** - Cortes histológicos da pele do dorso dos animais AIRmin e AIRmax do experimento feito na concentração de 1.280µg/kg. As setas amarela e vermelha representam a epiderme e derme, respectivamente. Coloração por Hematoxilina/Eosina e ampliação de 10x (100µm) utilizando Microscópio Óptico Diaplan Leica e Câmara Leica modelo DFC295.



**Fonte:** autoria própria.

#### 4.4.3 Imunofenotipagem das células da pele

A fim de compreender a dinâmica celular na pele dos animais, conduzimos um processo de imunofenotipagem das células que foram extraídas da pele após as diversas aplicações, que incluíram tratamentos com acetona, DMBA e CTX, em diferentes combinações. Posteriormente à coleta do tecido cutâneo, utilizamos Percoll, que possibilitou o enriquecimento de células leucocitárias por meio de um gradiente de densidade. Para a marcação extracelular, recorremos a anticorpos específicos para as moléculas Gr1 (APC-CY7), CD11b (PE), CD3 (PE-CY7 ou FITC), TCR $\gamma\delta$  (PE) e CD11c (PE-CY7). Adicionalmente, para a marcação intracelular, usamos o CD207 (Alexa Fluor 647). Esta abordagem visou especificamente avaliar as populações de células que têm potencial inflamatório, como neutrófilos, células dendríticas e linfócitos TCR $\gamma\delta$ .

Na figura 9, delineamos a estratégia adotada para analisar e distinguir as diferentes populações celulares e na figura 10, apresentamos os números absolutos, que foram determinados a partir das proporções das células obtidas da pele, marcadas com anticorpos específicos. Estes dados referem-se aos diferentes grupos tratados com cinco doses de DMBA, combinados ou não com CTX na concentração de 1.280 $\mu$ g/Kg. Este experimento foi conduzido no 80<sup>o</sup> dia após a aplicação inicial de DMBA. Quanto aos camundongos AIRmax, optamos por não avaliar a pele dos grupos G3 e G4, visto que não se observou surgimento de papilomas. No entanto, os camundongos da linhagem AIRmin apresentaram papilomas em todos os grupos de tratamento, com a única exceção sendo o grupo tratado apenas com acetona (controle negativo). Devido a essa observação, optamos por avaliar todos os grupos pertencentes a essa linhagem.

A figura 10A mostra a concentração de neutrófilos na pele dos camundongos das duas linhagens estudadas. Nota-se que, os animais AIRmin, apresentam valores elevados de neutrófilos, principalmente no grupo tratado com DMBA, porém após a aplicação com a CTX observamos uma redução dessas células nos grupos onde a CTX foi administrada após o DMBA, especialmente no grupo que recebeu a CTX tanto antes quanto após o DMBA, por um período de três semanas seguidas. Isso nos leva a inferir que a CTX pode exercer um efeito anti-inflamatório quando administrada após o DMBA de forma contínua. Os animais da linhagem AIRmax também apresentaram valores reduzidos de neutrófilos.

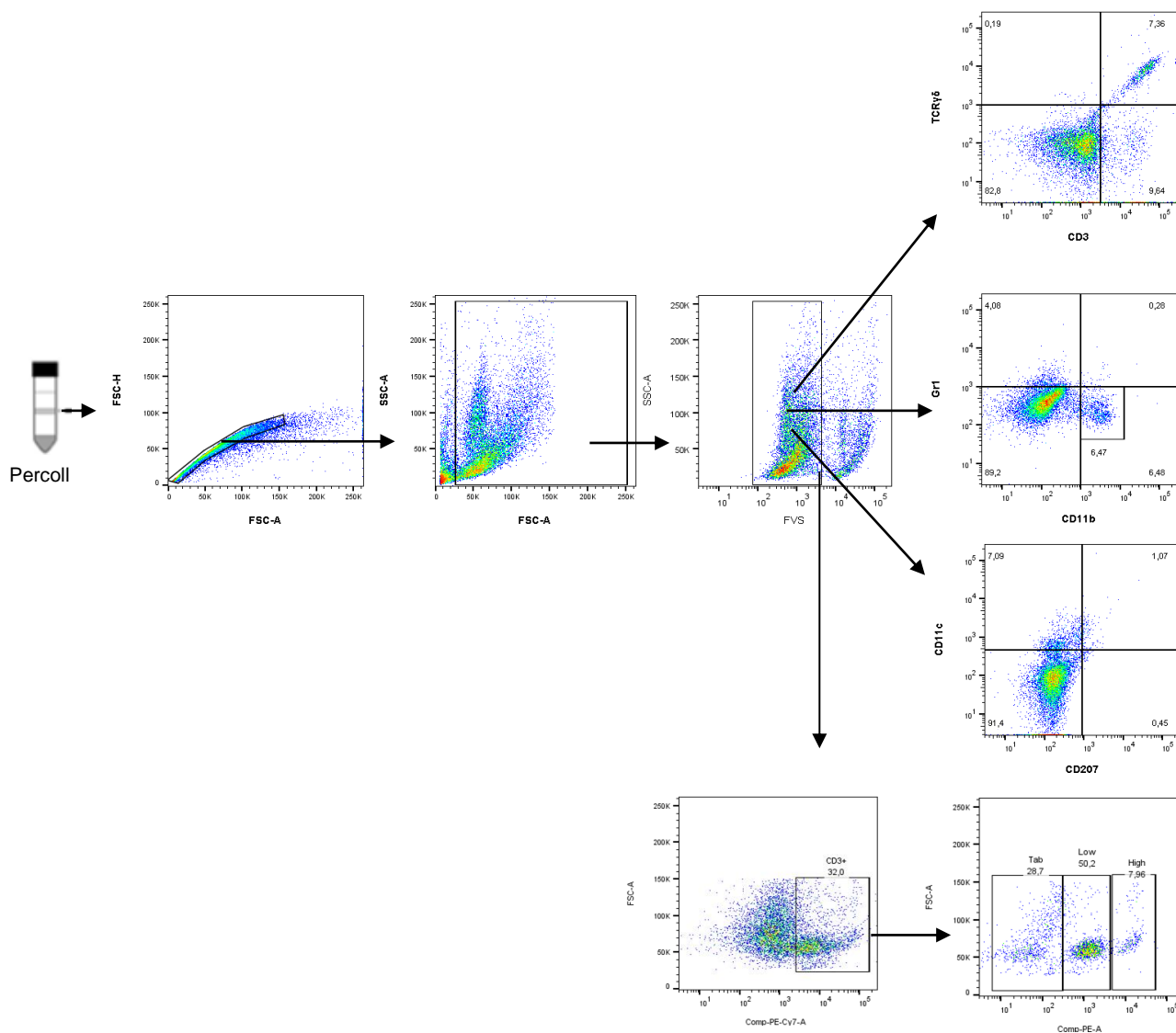
Na figura 10B, mostramos a população de linfócitos  $T\gamma\delta$ , que possuem papel importante em processos que envolvem carcinogênese e fazem parte tanto da imunidade inata quanto da adaptativa. Os animais da linhagem AIRmin apresentaram número de linfócitos  $T\gamma\delta$  superiores aos animais AIRmax no grupo que recebeu a CTX dois dias antes da aplicação do DMBA e uma vez na semana por três semanas consecutivas após. Apresentou também uma diminuição com relação aos outros grupos e nenhuma diferença com relação ao grupo DMBA, quando analisado juntamente à linhagem AIRmax.

Já na figura 10C representamos a concentração das células dendríticas convencionais  $CD11c^+$ , e não especificamente as células de Langerhans já que não foi possível a marcação intracelular de CD207. Estas são encontradas nos tecidos periféricos, como a pele, e tem um importante papel na apresentação de antígenos para os linfócitos T (SHENG et al., 2021). Na análise, essas células também apresentaram níveis muito inferiores no período crônico de 80 dias. Isso pode ter ocorrido devido ao mesmo motivo das outras células inflamatórias, pois essas estão presentes na epiderme e quando são ativadas há a migração para os linfonodos. Portanto, acreditamos que pela análise ter sido realizada em tempo tardio para observar os efeitos da CTX, não foi possível estudar as populações celulares que estão presentes no início da inflamação. No experimento de  $320\mu\text{g}/\text{kg}$  ocorreram dificuldades técnicas durante o processo extração celular que impossibilitaram essa mesma análise.

Considerando que alguns estudos preconizam o uso de doses baixas de CTX, Cura et al., (2002), Castro et al., (2007), Nogueira-Neto et al., (2008), Nunes et al., (2010), Sampaio et al., (2010) apud Sant'Anna et al (2019) e o fato de não ter havido resposta na linhagem AIRmax e não haver diferenças significativas entre os grupos de animais AIRmin tratados com CTX e com DMBA isolado, optamos pela utilização da dose de  $320\mu\text{g}/\text{kg}$  nos experimentos subsequentes.

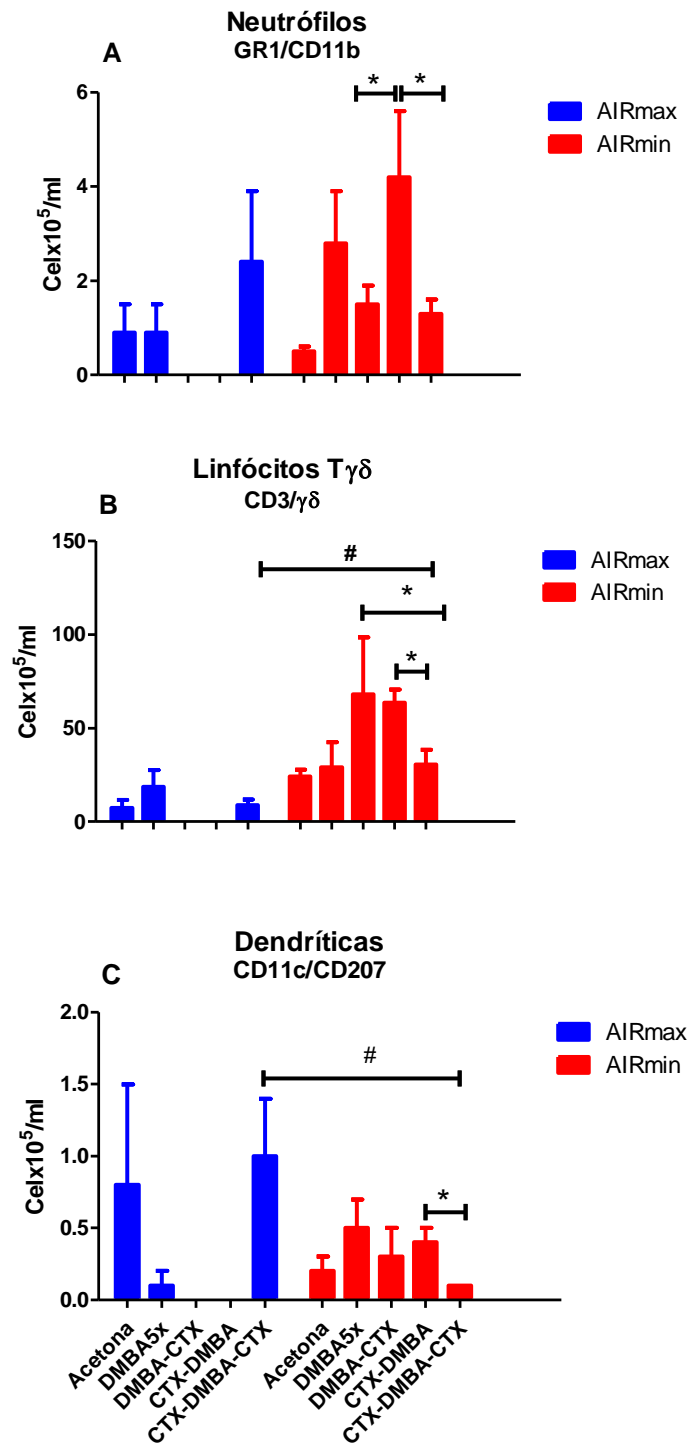


**Figura 9** - Estratégia de análise realizada por citometria de fluxo. O esquema demonstra a estratégia para avaliar as populações celulares de  $CD3^+TCR\gamma\delta^+$  (Linfócitos  $T\gamma\delta$ ),  $Gr1^+CD11b^+$  (Neutrófilos) e  $CD11c^+CD207^-$  (Células dendríticas). Ao realizar análises subsequentes, adotamos uma estratégia para isolar duas subpopulações distintas de linfócitos  $T\gamma\delta$  identificadas posteriormente.



Fonte: autoria própria.

**Figura 10** - População celular dos animais tratados com Acetona, DMBA ou CTX [1.280µg/kg]. Populações analisadas: GR1+/CD11b+ (Neutrófilos), CD3+/Tγδ+ (Linfócitos Tγδ) e CD11c+/CD207+ (Células Dendríticas). Os dados estão expressos como média ± Erro Padrão da média, considerado significativo quando  $p < 0,05$ , teste ANOVA. #Diferença entre linhagens; \*Diferença entre os grupos.



Fonte: autoria própria.

#### **4.5 Efeito da crotoxina e do veneno nas lesões papilomatosas induzidas por DMBA/TPA**

Com a intenção de aprofundar o entendimento sobre como a CTX poderia influenciar o surgimento de lesões papilomatosas, conduzimos experimentos com camundongos das linhagens AIRmax e AIRmin, utilizando o protocolo de dois estágios com DMBA como indutor e TPA como promotor de lesões papilomatosas. Dois experimentos correlatos foram realizados visando a indução da carcinogênese cutânea, porém com distintas metodologias de aplicação da CTX.

No primeiro experimento, a CTX ou o veneno bruto foi aplicada epicutaneamente (tópica) em uma frequência de duas vezes por semana. No segundo experimento variamos a via de administração, aplicando a CTX<sup>epi</sup> ou CTX<sup>sub</sup> somente uma vez por semana.

##### **4.5.1 Avaliação dos Papilomas**

Foram estabelecidos quatro grupos distintos submetidos às seguintes intervenções iniciais: G1 (acetona), G2 (DMBA/TPA), G3 (DMBA/TPA/CTX EPI 2x) e G4 (DMBA/TPA/Veneno). A CTX EPI 2x foi aplicada na concentração de 320µg/Kg, já o veneno bruto foi de 540µg/Kg, conforme detalhado no item 3.6. Durante 120 dias, os animais AIRmax (Figura 11) e AIRmin (Figura 12) foram monitorados para a observação e registro do desenvolvimento de papilomas cutâneos.

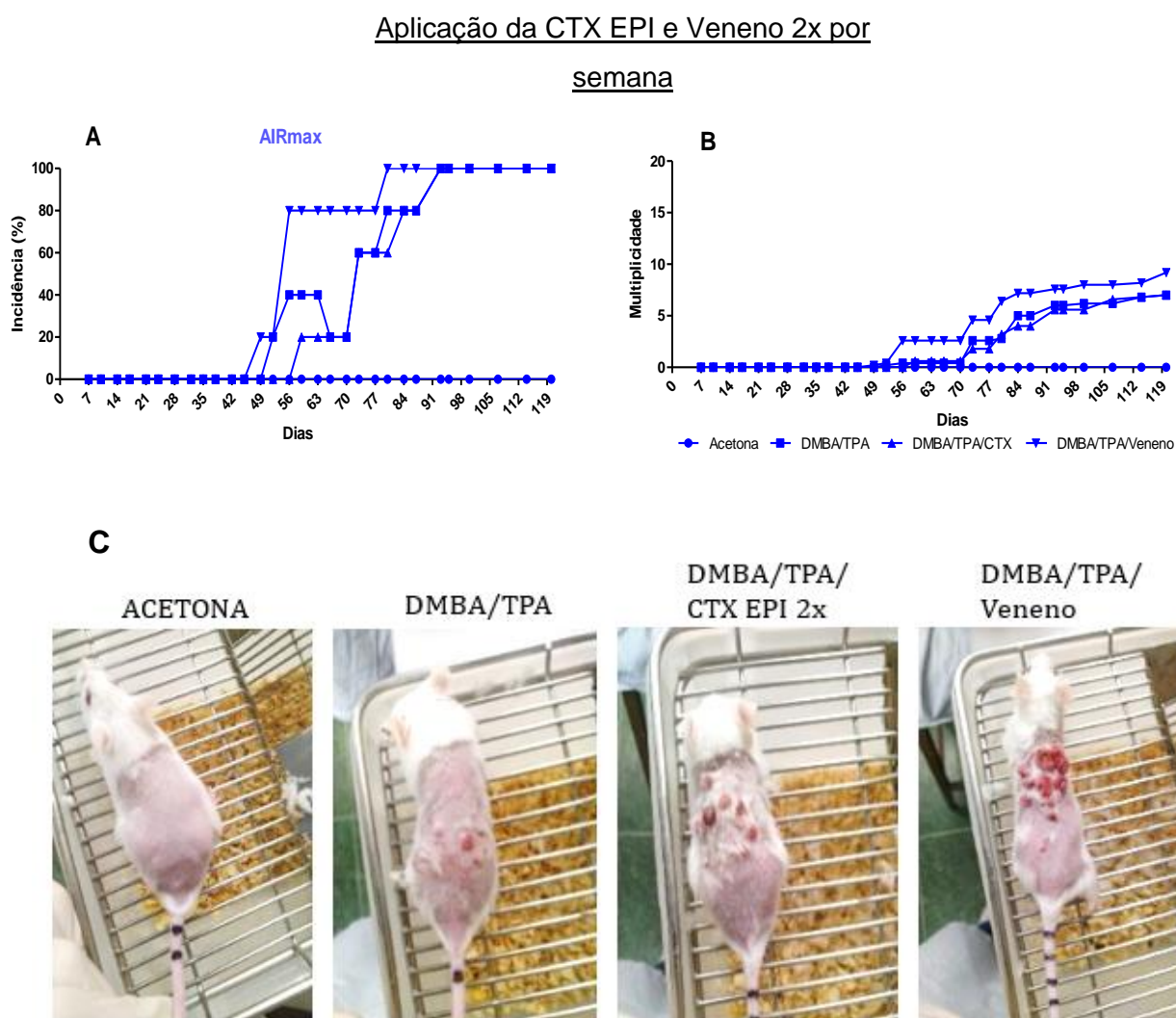
Nos animais AIRmax, observamos já aos 45 dias, o surgimento de lesões cutâneas, especificamente nos grupos G3 e G4. Vale ressaltar que, seguindo este protocolo, é comum que esses animais não manifestem dermatites agudas na região dorsal. Além disso, a formação de papilomas manifesta-se em um intervalo mais estendido após a aplicação do agente indutor, neste caso, o DMBA.

Com base nas observações das lesões nos camundongos AIRmax, apresentamos a média de papilomas por animal (Figura 11A) e a porcentagem (Figura 11B) de animais afetados para cada grupo durante e após as aplicações bi-semanais de CTX EPI ou do veneno bruto. Constatamos que, a partir de 90 dias, todos os camundongos AIRmax tratados com DMBA/TPA foram afetados, independentemente

do tratamento adicional que receberam (CTX ou Veneno). Na figura 11C, apresentamos as características macroscópicas das lesões aos 120 dias.

Notavelmente, o veneno se destacou como o principal causador da piora das lesões nos animais desta linhagem, apresentando lesões com características de carcinoma espinocelular. Em nossas análises, não identificamos diferenças que fossem estatisticamente significantes entre os grupos, independentemente do período avaliado.

**Figura 11** - A) Incidência e B) Multiplicidade de lesões de camundongos AIRmax tratados com Acetona, DMBA/TPA, DMBA/TPA/CTX ou DMBA/TPA/Veneno duas vezes por semana durante 120 dias. C) Representações das lesões desenvolvidas no dorso dos animais aos 115 dias de tratamento.



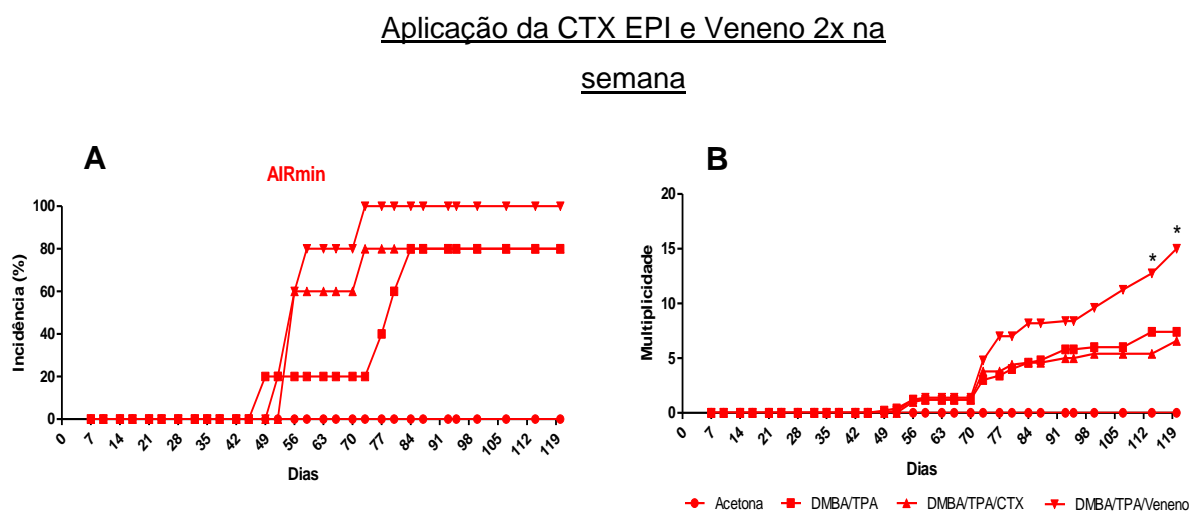
**Fonte:** autoria própria.

Em relação aos animais da linhagem AIRmin, no período de 45 dias, foram observadas lesões inicialmente no grupo G2. A incidência e a multiplicidade das lesões são representadas nas figuras 12A e 12B, respectivamente e em 12C estão representados os aspectos das lesões macroscópicas nos diferentes grupos experimentais. Em termos de multiplicidade, os animais tratados com DMBA/TPA/Veneno apresentaram um número médio de lesões (15) maior, ao final do estudo cinético. Além disso, foi constatada uma diferença significativa entre o grupo G4 e os demais grupos dessa linhagem em momentos mais tardios.

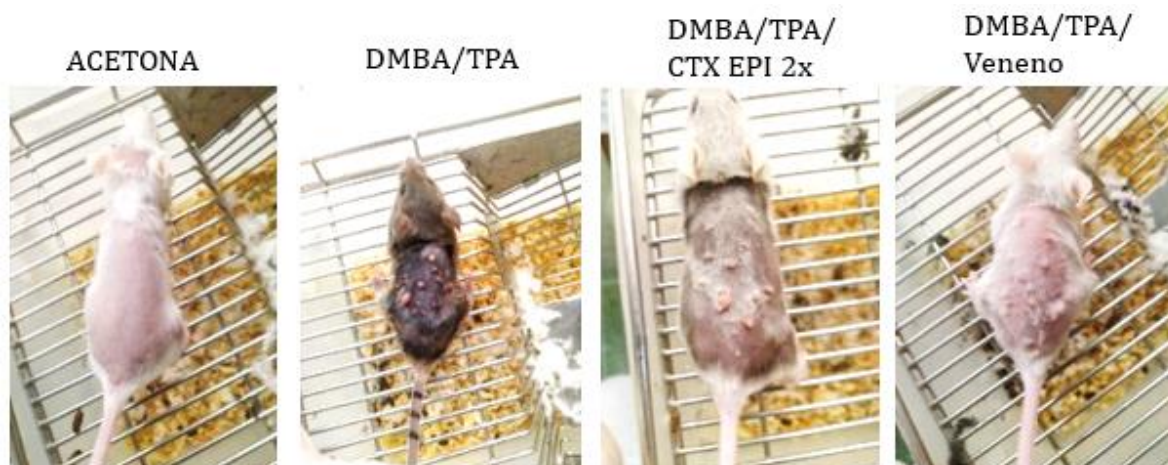
Vale destacar que, nos grupos analisados, os animais dessa linhagem não mostraram nenhuma lesão que evidenciasse características de carcinoma espinocelular. Contudo, todos os animais, ou seja, 100% deles, desenvolveram lesões cutâneas.

Infelizmente, não identificamos, em nenhuma das duas linhagens, uma proteção da CTX ou do veneno no desenvolvimento de lesões cutâneas, sejam elas papilomas ou carcinomas nesse protocolo de aplicações bi-semanais. Ao contrário, houve uma piora significativa no número de lesões quando foi utilizado veneno bruto nos camundongos AIRmin.

**Figura 12** - A) Incidência e B) Multiplicidade de lesões de camundongos AIRmin tratados com Acetona, DMBA/TPA, DMBA/TPA/CTX ou DMBA/TPA/Veneno duas vezes por semana durante 120 dias. C) Representações das lesões desenvolvidas no dorso dos animais aos 115 dias de tratamento.



C



Fonte: autoria própria.

#### 4.5.2 Imunofenotipagem das células da pele

A fim de examinar os efeitos moduladores da CTX na pele dos animais das linhagens AIRmax e AIRmin, após serem submetidos ao tratamento com DMBA/TPA, procedemos com a imunofenotipagem por meio de citometria de fluxo, seguindo a estratégia descrita no item 4.4.3, representado pela figura 9.

A figura 13A representa os níveis de neutrófilos (GR1/CD11c) determinados ao longo da cinética nos camundongos AIRmax, com valores mais elevados dessas células aos 7 dias no grupo DMBA/TPA, decaindo significativamente ao longo do período. Por outro lado, houve um aumento significativo no grupo tratado com DMBA/TPA/veneno aos 80 e 120 dias, correlacionando com o fenótipo de maior multiplicidade de lesões papilomatosas e com os efeitos da CTX aos 120 dias.

Quanto às células  $T\gamma\delta$  (CD3/ $T\gamma\delta$ ) (Figura 13B) não identificamos variações significantes entre os grupos tratados dentro desta linhagem, somente uma diferença significativa quando comparada aos animais da linhagem AIRmin aos 80 dias de tratamento.

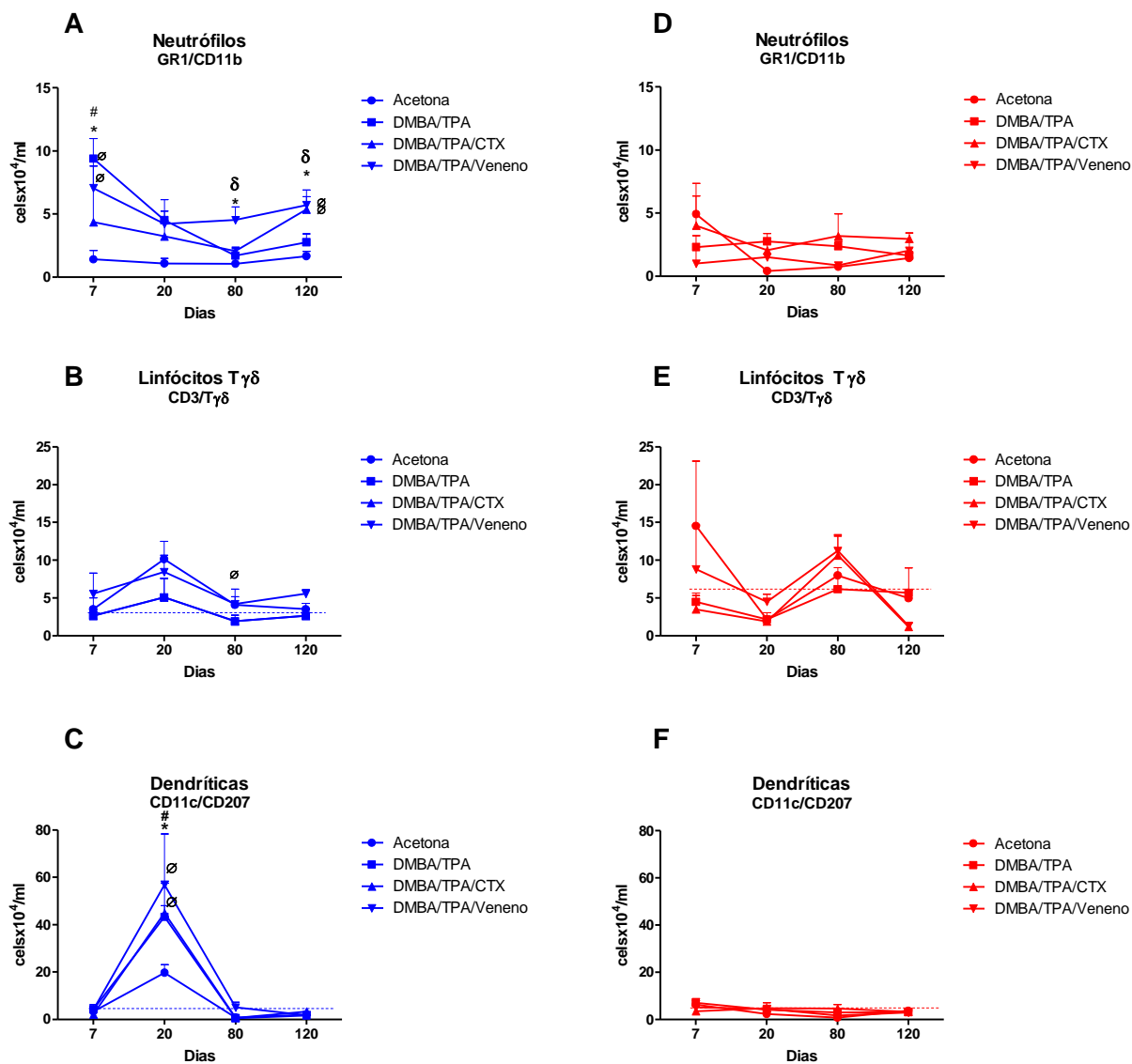
Avaliamos também a presença de células dendríticas convencionais (CD11c) (Figura 13C) durante os 120 dias e verificamos que ocorreu um aumento significativo dessas células aos 20 dias para os três grupos de tratamentos contendo DMBA/TPA, decaindo, em seguida, aos níveis basais.

Ao analisar os animais da linhagem AIRmin, observamos que, apesar de expressarem o gene *Ahr* de alta afinidade do receptor AHR para o desenvolvimento de carcinogênese cutânea, notamos que nem a população de neutrófilos (GR1/CD11b), nem as células linfocitárias T $\gamma\delta$  (CD11c), apresentaram variações significantes em seus níveis ao longo dos diferentes tempos. Isso também ocorreu nas células dendríticas convencionais (Figura 13D, E e F).

Especificamente, quando consideramos os tratamentos realizados utilizando a CTX epicutânea e o veneno, não identificamos alterações notáveis nos valores celulares ao longo da cinética impossibilitando qualquer destaque importante.

Isso sugere que, embora esses animais tenham uma predisposição genética para a carcinogênese cutânea, os tratamentos mencionados não influenciaram de maneira significativa na dinâmica das diferentes populações celulares consideradas durante o período estudado.

**Figura 13** - Representação gráfica da população celular dos camundongos AIRmax (—) e AIRmin (—) nos tratamentos com DMBA/TPA, CTX ou veneno ao longo dos diferentes tempos de experimentação. (A e D) Neutrófilos – Gr1/CD11b; (B e E) Linfócitos T $\gamma\delta$ ; (C e F) Células dendríticas. #Diferença entre acetona x DMBA; \*Diferença entre DMBA x outros;  $\delta$ Veneno x outros;  $\emptyset$ Diferença entre AIRmax e AIRmin.



Fonte: autoria própria.

#### 4.6 Efeito da crotoxina epicutânea ou subcutânea nas lesões papilomatosas induzidas por DMBA/TPA



#### 4.6.1 Avaliação dos Papilomas

Para avaliar a ação tópica ou subcutânea da CTX no desenvolvimento das lesões papilomatosas, foram estabelecidos os seguintes grupos de camundongos AIRmax e AIRmin: G1 (Acetona/PBS1x), G2 (DMBA/TPA), G3 (DMBA/TPA/CTX<sup>epi</sup>) e G4 (DMBA/TPA/CTX<sup>sub</sup>). A CTX<sup>epi</sup> foi aplicada na concentração de 320µg/Kg, enquanto a CTX<sup>sub</sup> foi administrada em 0,82µg por animal, de acordo com o descrito no item 3.7. Ambos os tratamentos receberam a aplicação somente uma vez por semana durante todo o experimento. Ao longo de um período de 80 dias, monitoramos os animais para observar a formação de papilomas cutâneos.

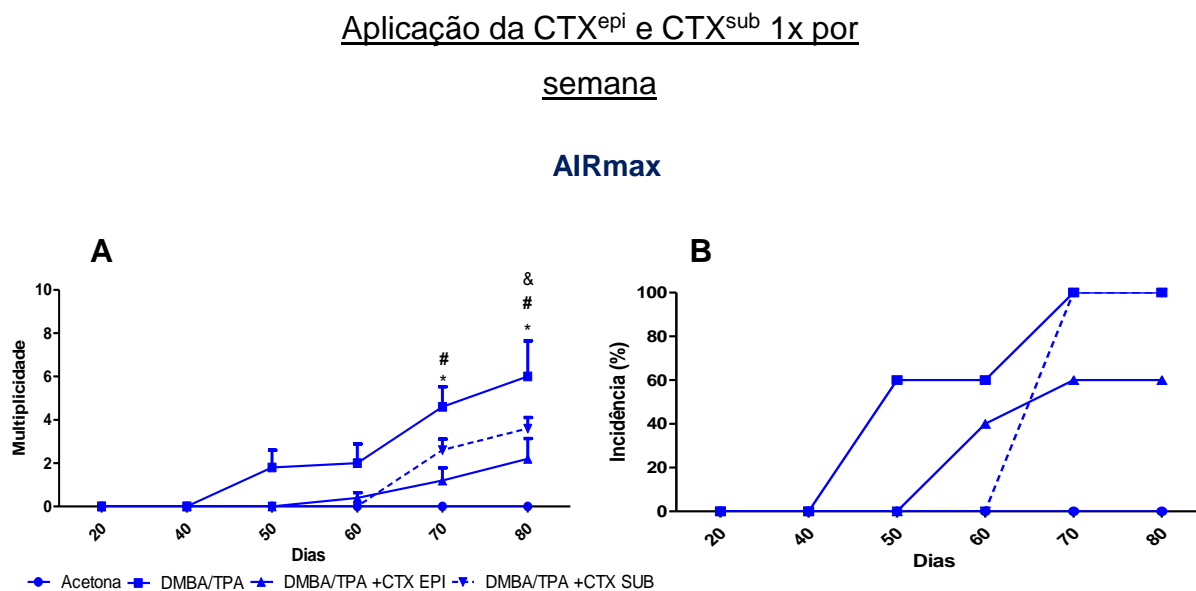
As figuras 14A e 14B mostram, respectivamente, a incidência e a multiplicidade de lesões nos animais AIRmax após a aplicação semanal de CTX<sup>epi</sup> e CTX<sup>sub</sup>. Na figura 14C mostramos as características macroscópicas das lesões ao longo do tempo.

Notamos que os camundongos AIRmax do grupo G2 começaram a apresentar lesões cutâneas passados 53 dias do início do tratamento, enquanto os animais dos grupos G3 e G4 mostraram sinais de lesões mais tardiamente, aos 60 e 67 dias, respectivamente. Ao analisarmos a figura 14B, observa-se que, no tempo de 70 dias, há diferenças consideráveis na multiplicidade de lesões entre os grupos G1 e G2. Notavelmente, o grupo de controle positivo (G2) exibiu uma quantidade significativamente maior de lesões em comparação ao grupo de controle negativo (G1). Além disso, identificamos diferenças marcantes entre os grupos G2 e G3 onde o grupo tratado com CTX<sup>epi</sup> (G3) apresentou uma quantidade de lesões significativamente inferior em comparação ao grupo que recebeu somente DMBA/TPA (G2). Em todas as observações, o grupo G2 revelou a maior multiplicidade de papilomas em relação aos demais, entretanto o grupo que recebeu a CTX<sup>sub</sup> (G4) se equiparou, em valores de incidência (Figura 14A), por volta dos 70 dias de tratamento.

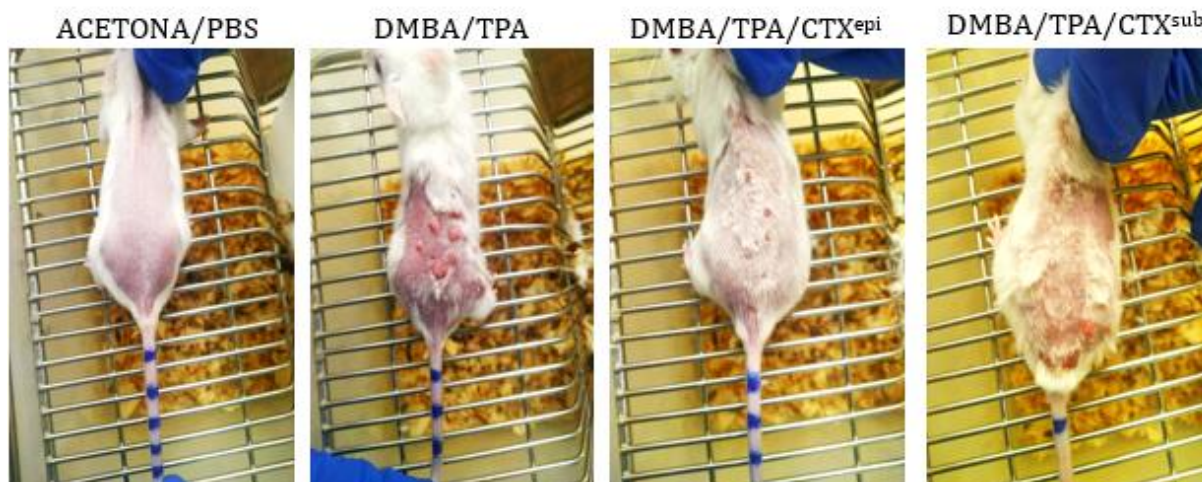
No final do experimento, aos 80 dias, as diferenças de incidência e multiplicidade se tornaram ainda mais evidentes entre o grupo G2 e os demais, especialmente, o grupo que recebeu a aplicação da CTX<sup>epi</sup> apenas uma vez por semana, apresentando valores de multiplicidade significativamente inferiores em comparação ao controle positivo com DMBA/TPA.

Na figura 14C, observamos que os animais do grupo G3 apresentaram lesões em tamanho e quantidade menores em comparação ao G2 e ao G4, que apresentaram lesões em maiores proporções. Esses resultados sugerem que a aplicação da CTX<sup>epi</sup> uma vez por semana, durante todo o tratamento, pode impactar na diminuição do número de lesões papilomatosas e atrasar a progressão macroscópica de carcinomas de pele provocados pelo carcinógeno DMBA. Em contrapartida, a utilização da CTX<sup>sub</sup> não mostrou a mesma eficácia, quando consideramos o aspecto macroscópico das lesões.

**Figura 14** - A) Incidência e B) Multiplicidade de lesões de camundongos AIRmax tratados com Acetona, DMBA/TPA, DMBA/TPA/CTX<sup>epi</sup> ou DMBA/TPA/CTX<sup>sub</sup> uma vez por semana por um período de 80 dias e, C) Representações das lesões desenvolvidas no dorso dos animais aos 80 dias de tratamento. \*DMBA/TPA x Acetona; #DMBA/TPA x DMBA/TPA/CTX<sup>epi</sup>; &CTX<sup>epi</sup> x CTX<sup>sub</sup>. Considerando significativo quando  $p < 0,05$ , teste ANOVA.



C



Fonte: autoria própria.

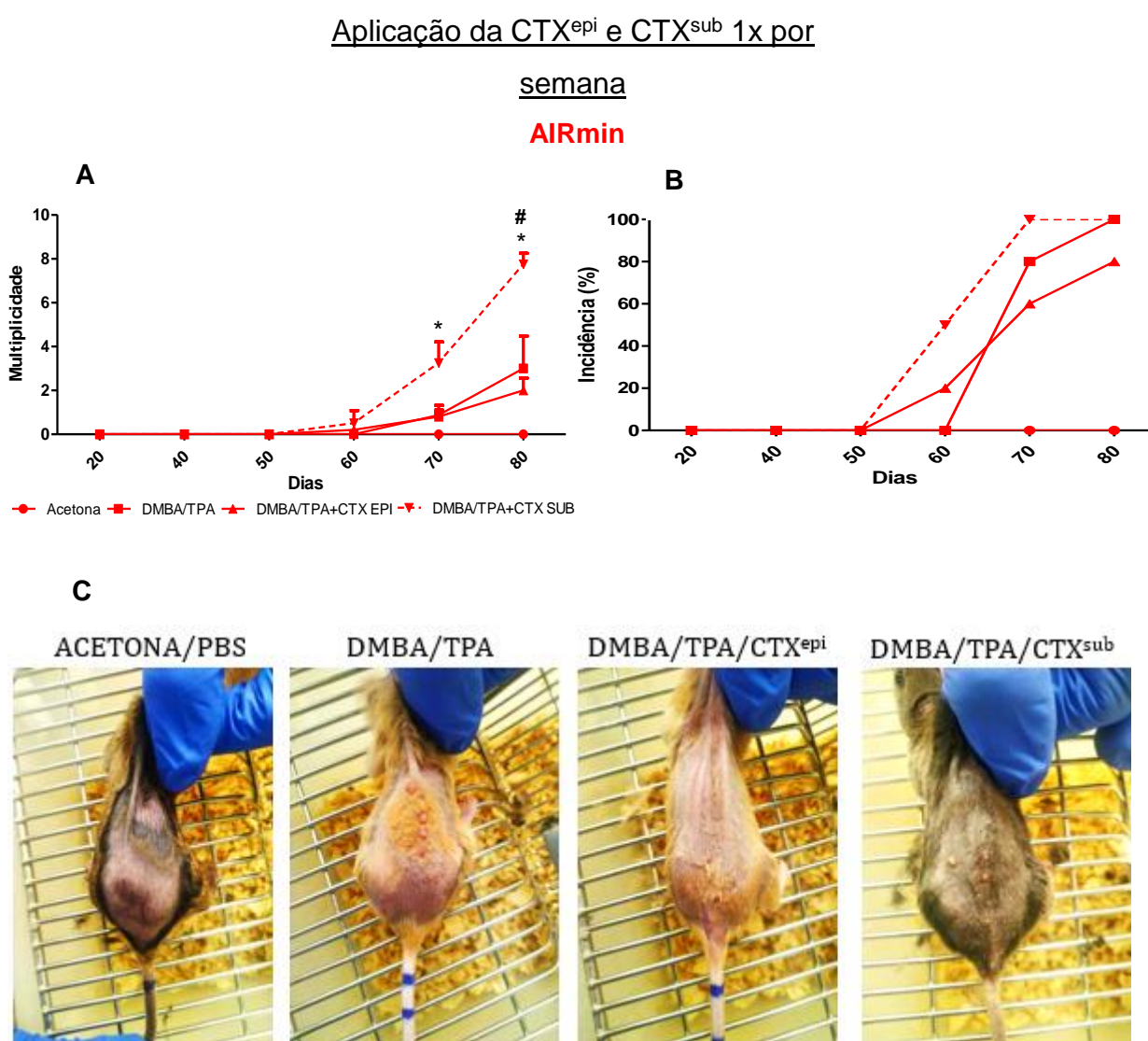
Nos camundongos AIRmin, notou-se que o grupo submetido a aplicação subcutânea da CTX (G4) apresentou, em seus estágios iniciais, uma incidência (Figura 15A) de lesões superior em comparação aos demais tratamentos. Esta incidência foi particularmente mais alta quando comparada ao grupo que recebeu a CTX<sup>epi</sup>.

Aos 80 dias, constatamos que a prevalência de lesões nos grupos G2 e G4 alcançou a marca de 100% de animais acometidos. Por outro lado, no grupo G3 houve uma menor incidência quando comparado ao total de animais. Tal distinção também se fez presente na análise da multiplicidade de papilomas, como ilustrado na figura 15B.

Os camundongos tratados com CTX<sup>sub</sup> (G4) exibiram, a partir do 70<sup>o</sup> dia, uma média de papilomas superior em relação aos demais grupos, principalmente em relação ao grupo que recebeu a CTX<sup>epi</sup> (G3).

Na figura 15C, estão representadas as lesões desenvolvidas pelos animais dessa linhagem ao decorrer do período de 80 dias. Observa-se que nenhum animal em nenhum dos grupos estudados apresentou lesões macroscópicas que se assemelham a carcinomas.

**Figura 15** - A) Incidência e B) Multiplicidade de lesões de camundongos AIRmin tratados com Acetona, DMBA/TPA, DMBA/TPA/CTX<sup>epi</sup> ou DMBA/TPA/CTX<sup>sub</sup> uma vez por semana por um período de 80 dias e, C) Representações das lesões desenvolvidas no dorso dos animais aos 80 dias de tratamento. Os dados estão expressos como média para valores de porcentagem e média  $\pm$ EPM. \*DMBA/TPA x Acetona; #DMBA/TPA x DMBA/TPA/CTX<sup>epi</sup>. Considerando significativo quando  $p < 0,05$ , teste ANOVA.



Fonte: autoria própria.

#### 4.6.2 Análise Histológica

Nas análises histológicas dos animais AIRmax, observamos, na figura 16A, aos 20 dias, proliferação leve das células epiteliais glandular e processo inflamatório seguido de reparo tecidual leve, marcado pela presença de fibroblasto. Na figura 16B, onde foi aplicado o DMBA/TPA, o processo foi mais intenso com a progressão acentuada de processo ulcerativo e neoplásico observando neovascularização e metaplasia grave e áreas de necrose intensa acompanhadas de figuras mitóticas e células atípicas.

Já na figura 16C, onde os animais foram tratados com CTX<sup>sub</sup>, as análises mostraram um processo inflamatório crônico no 40<sup>o</sup> dia, acompanhando de um processo de reparo tecidual que se intensifica no 80<sup>o</sup> dia sem a presença de processo ulcerativo, com proliferação moderada do epitélio glandular como forma de estabelecer a histofisiologia do tecido.

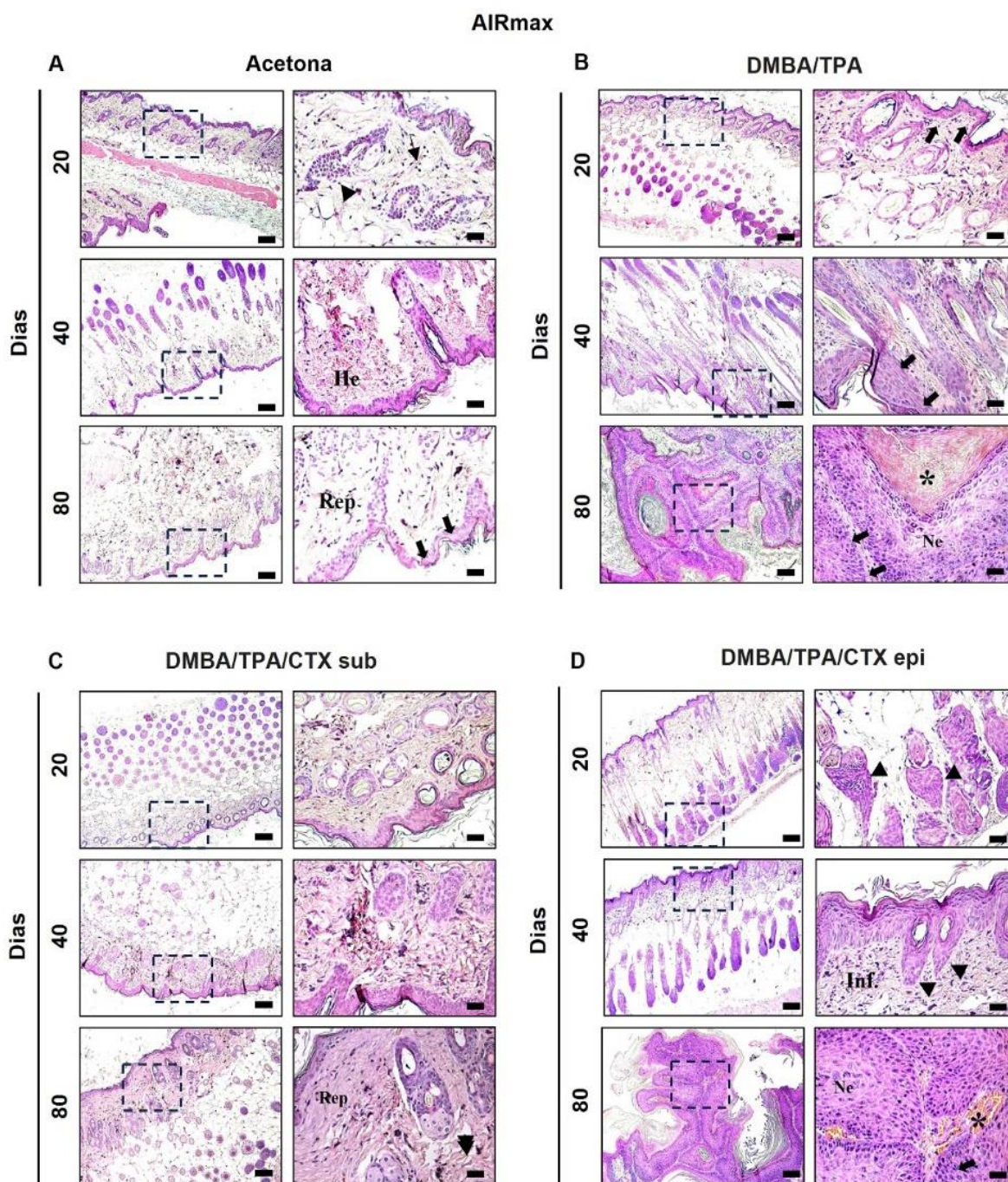
Já na linhagem AIRmin, a figura 17A, apresenta no 20<sup>o</sup> dia, proliferação moderada do epitélio glandular e no 40<sup>o</sup> dia há um processo inflamatório seguido de reparo tecidual marcado pela presença de fibroblastos e produção de colágeno, intensificando no 80<sup>o</sup> dia.

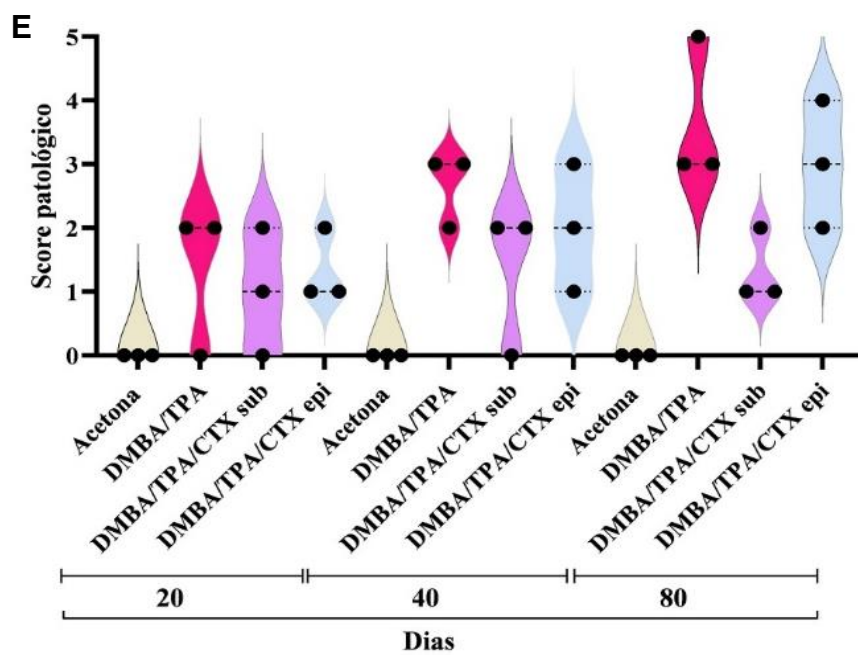
Na figura 17B, caracterizada pelo tratamento de DMBA/TPA, o processo apresentou hiperplasia leve da epiderme e das células do epitélio glandular, com proliferação leve e metaplasia de células epiteliais com início aos 20 dias, intensificando de forma progressiva aos 40 e 80 dias.

O tratamento com CTX<sup>sub</sup>, figura 17C, mostrou menor eficácia no controle da tumorigênese nessa linhagem, desenvolvendo no 80<sup>o</sup> dia um processo ulcerativo e pré-neoplásico.

Ademais, o tratamento com CTX<sup>epi</sup>, figuras 16D e 17D, não mostrou efeito terapêutico em nenhum dos tempos experimentais e não foi significativo entre as linhagens. Por fim, os valores do *score* patológico, apesar de não serem significativos estatisticamente entre os grupos ou linha temporal, mostra redução dos valores nos grupos que receberam a CTX<sup>sub</sup> nas duas linhagens estudadas. Além disso, a indução da tumorigênese pelo DMBA/TPA no tecido cutâneo de AIRmax e AIRmin, revelou um processo ulcerativo e pré-neoplásico com intensidades distintas entre as linhagens.

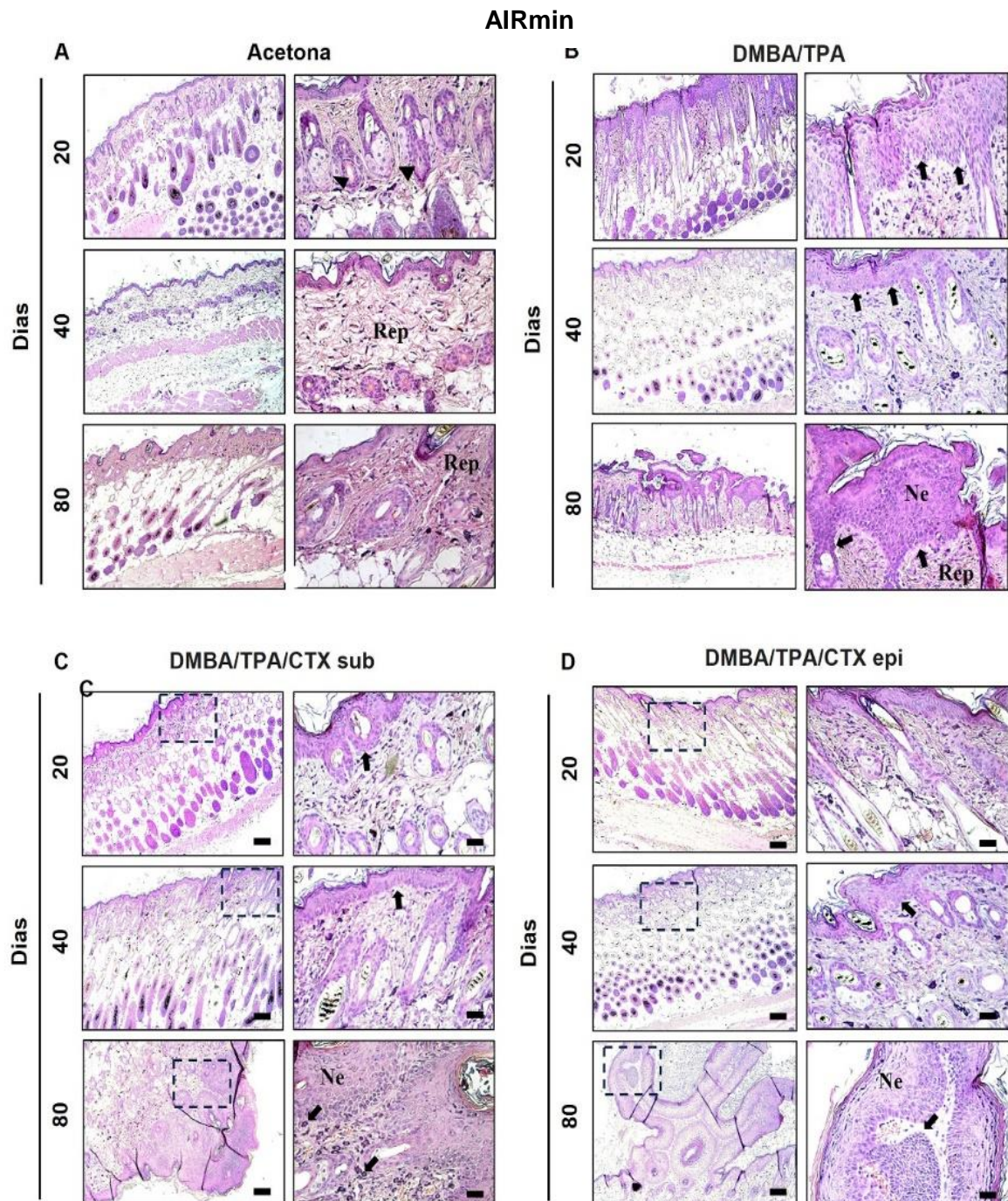
**Figura 16** - Efeito terapêutico da CTX na tumorigênese de pele em camundongos da linhagem AIRmax induzida por DMBA e TPA. (a) Acetona; (b) DMBA/TPA; (c) Crotoxina administrada por via subcutânea (DMBA/TPA/CTX<sup>sub</sup>); (d) Crotoxina administrada por via epicutânea (DMBA/TPA/CTX<sup>epi</sup>) e (e) Score patológico baseado nas seguintes métricas: 0 – tecido normal; 1 – inflamação crônica, ulceração, atrofia ou hiperplasia; 2 – atipia celular, metaplasia ou célula em estágio de mitose; 3 – displasia; e 4 – carcinoma positivo. A evolução da tumorigênese, bem como a ocorrência de lesões pré-cancerosas e cancerígenas foram comparadas no quesito temporal e experimental dentre os tratamentos. Ponta da seta = proliferação de célula do epitélio glandular; Reparo tecidual = Rep; Setas = proliferação da epiderme; Necrose = Ne; Hemólise = He; Angiogênese = \*. Coloração de H&E. Barra 10-50 µm.



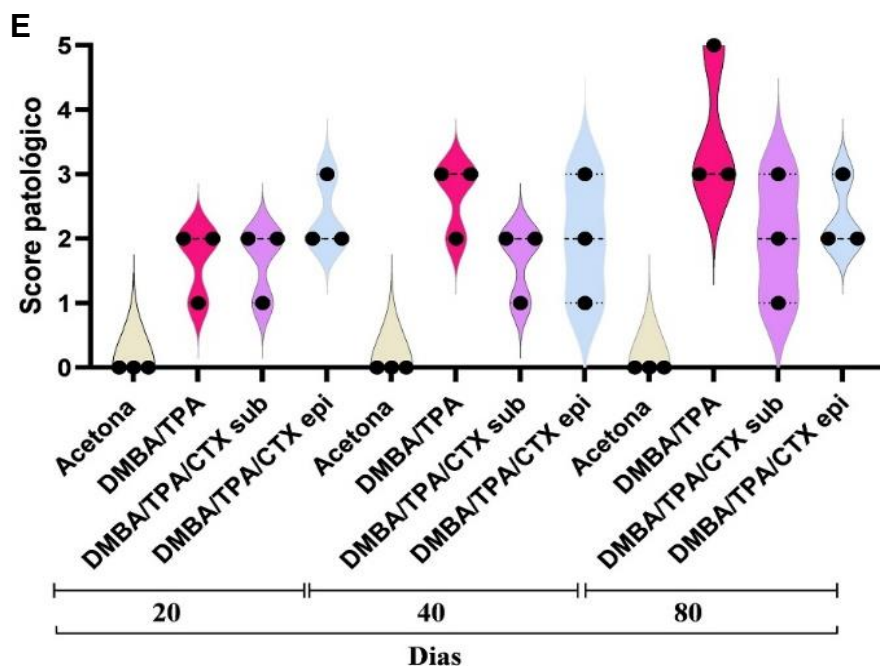


Fonte: autoria própria.

**Figura 17** - Efeito terapêutico da CTX na tumorigênese de pele em camundongos da linhagem AIRmin induzida por DMBA e TPA. (a) Acetona; (b) DMBA/TPA; (c) Crotoxina injetado por via subcutânea (DMBA/TPA/CTX<sup>sub</sup>); (d) Crotoxina aplicada epicutâneamente (DMBA/TPA/CTX<sup>epi</sup>); e (e) Score patológico baseado nas seguintes métricas: 0 – tecido normal; 1 – inflamação crônica, ulceração, atrofia ou hiperplasia; 2 – atipia celular, metaplasia ou célula em estágio de mitose; 3 – displasia; e 4 – carcinoma positivo. A evolução da tumorigênese, bem como a ocorrência de lesões pré-cancerosas e cancerígenas foram comparadas no quesito temporal e experimental dentre os tratamentos. Ponta da seta= proliferação de célula do epitélio glandular; Reparo tecidual = Rep; Setas = proliferação da epiderme; Necrose = Ne; Hemólise = He; Angiogênese = \*. Coloração de H&E. Barra 10-50 µm.







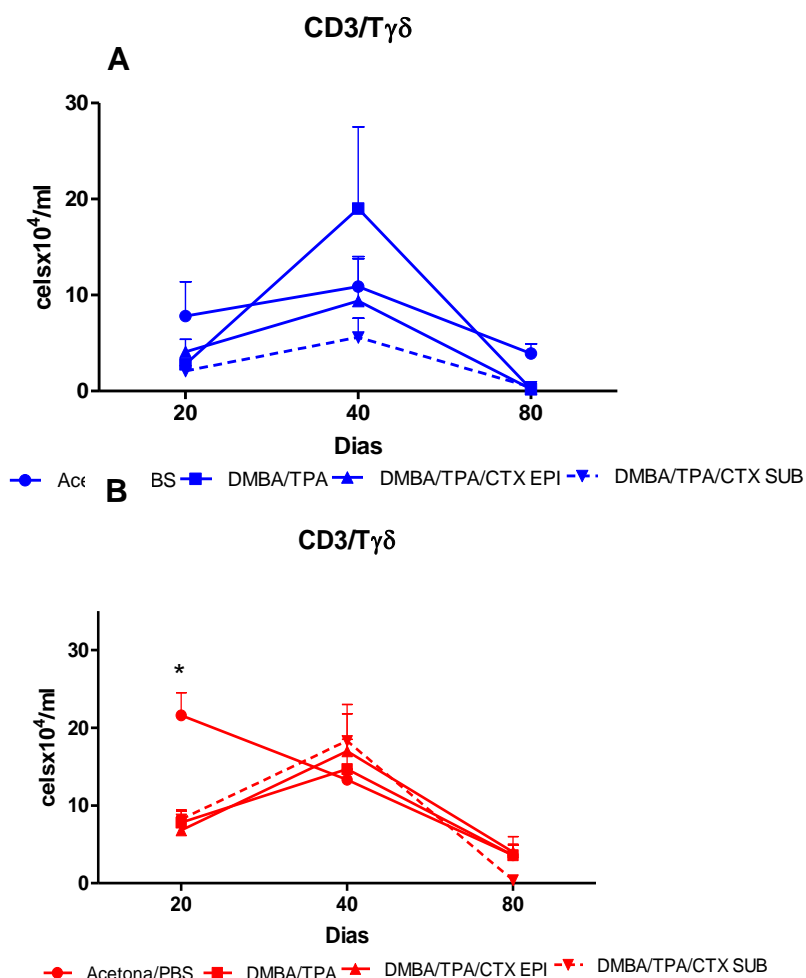
Fonte: autoria própria.

#### 4.6.3 Imunofenotipagem das células $CD3^+T\gamma\delta^+$ extraídas da pele

Uma avaliação geral da população de linfócitos  $CD3^+T\gamma\delta^+$  revelou haver uma grande variabilidade, mascarando qualquer diferença ou associação significativas com os efeitos dos diferentes tratamentos, exceto no período de 20 dias na linhagem AIRmin onde os animais tratados com DMBA/TPA apresentaram níveis superiores dessa população em relação aos demais (Figura 18).

Deste modo, abordamos uma estratégia que diferencia as subpopulações de células linfocitárias  $T\gamma\delta$  em:  $T\gamma\delta^{\text{high}}$  e  $T\gamma\delta^{\text{low}}$ .

**Figura 18** - Representação gráfica da população de linfócitos  $T\gamma\delta$  ( $CD3^+T\gamma\delta^+$ ) nos camundongos AIRmax (—) e AIRmin (---) nos tratamentos com DMBA/TPA, CTX ou veneno ao longo dos diferentes tempos de experimentação e nos diferentes modelos de tratamento; \*Diferença entre DMBA x outros.



**Fonte:** autoria própria.

Identificamos duas subpopulações de linfócitos  $T\gamma\delta$ ,  $T\gamma\delta^{\text{high}}$  e  $T\gamma\delta^{\text{low}}$ , conforme estratégia representada na figura 9. Cada uma dessas subpopulações desempenha funções distintas dentro do microambiente tumoral e podem interferir quanto ao progresso ou regressão dos carcinomas (Zhao et al., 2018), porém, seus papéis individuais não foram totalmente diferenciados neste estudo.

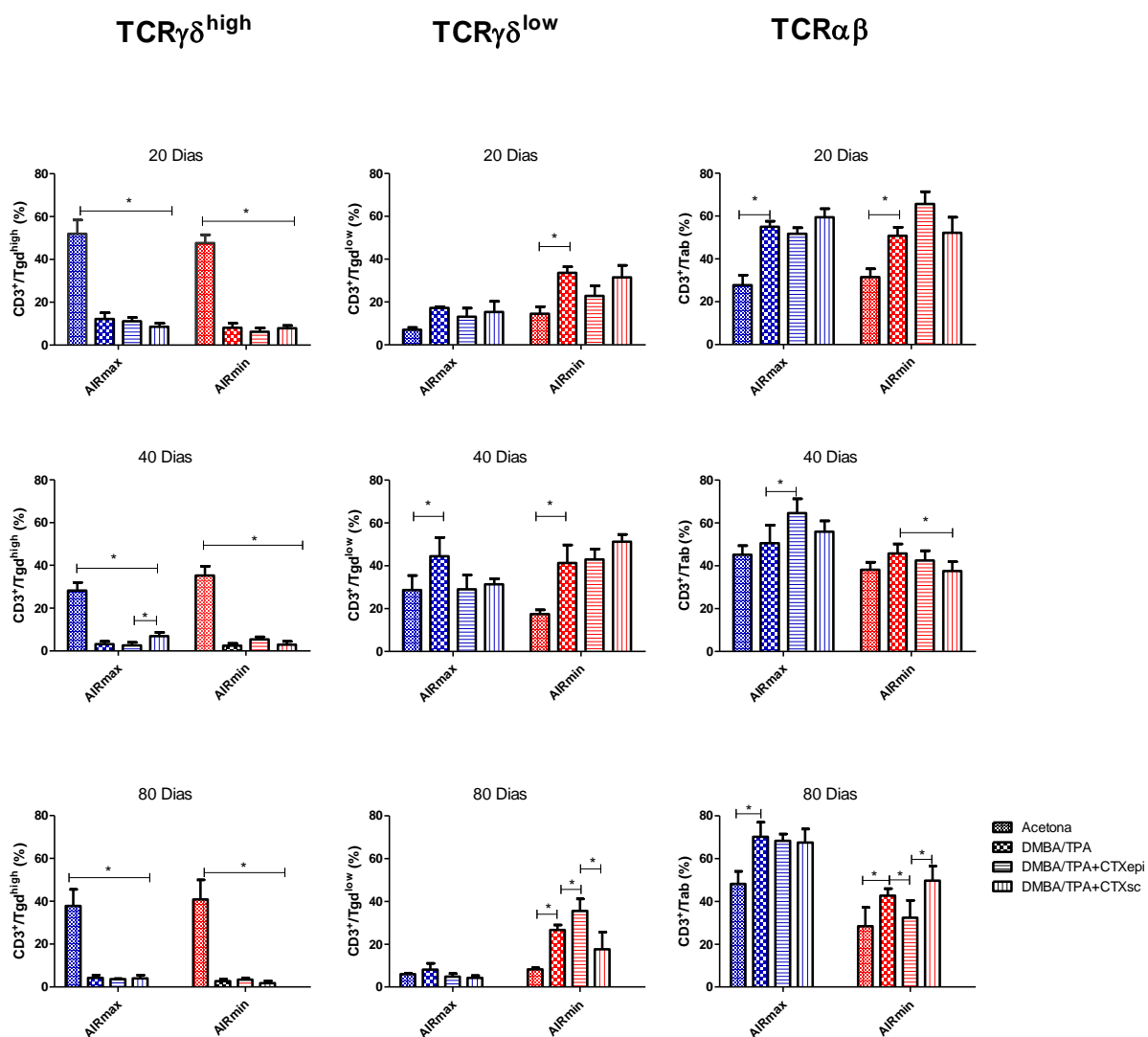
Para tal, avaliamos a presença dessas populações celulares na pele dos camundongos AIRmax e AIRmin nos tempos de 20, 40 e 80 dias após o início do tratamento. Investigamos também a população de linfócitos convencionais T $\alpha\beta$ .

Conforme os dados apresentados na figura 19, verificamos uma diminuição significativa na proporção das células T $\gamma\delta^{\text{high}}$ , provavelmente devido à migração dessas células para outros sítios. Este fato é notável para ambas as linhagens estudadas submetidas ao tratamento com DMBA/TPA, em relação aos animais do grupo controle negativo (G1), que receberam apenas acetona/pbs.

Em sentido contrário, a proporção das células T $\gamma\delta^{\text{low}}$  nos camundongos das duas linhagens tratados com DMBA/TPA, aumentou significativamente em relação aos grupos controle (G1). Comparativamente nas duas linhagens, verificamos que nos animais AIRmin essas células mantiveram níveis significativamente mais elevados até os 80 dias de análise. No que concerne a uma possível modulação das células T $\gamma\delta^{\text{low}}$  pelos tratamentos, verificamos que somente nos AIRmin e aos 80 dias a CTX administrada por via sub-cutânea atuou diminuindo sua proporção. De maneira oposta, o tratamento epicutâneo da CTX fez aumentar essa população celular.

Ao analisar os resultados das células T com TCR $\alpha\beta$ , verificamos que esta população é a predominante na pele das duas linhagens, independente do tratamento. No entanto, essas células apresentam, ao menos quanto sua localização, alguma resposta ao tratamento com DMBA/TPA, com um pequeno e significativo aumento em sua população aos 80 dias de avaliação. Neste período, verificamos na linhagem AIRmin um aumento significativo dessas células em resposta à CTX<sup>sub</sup>.

**Figura 19** - Representação gráfica da população celular de linfócitos  $T\gamma\delta$  e  $T\alpha\beta$ , respectivamente, dos camundongos AIRmax (azul) e AIRmin (vermelho) nos tratamentos com DMBA/TPA,  $CTX^{epi}$  ou  $CTX^{sub}$  ao longo dos diferentes tempos de experimentação. \*Diferença significativa.

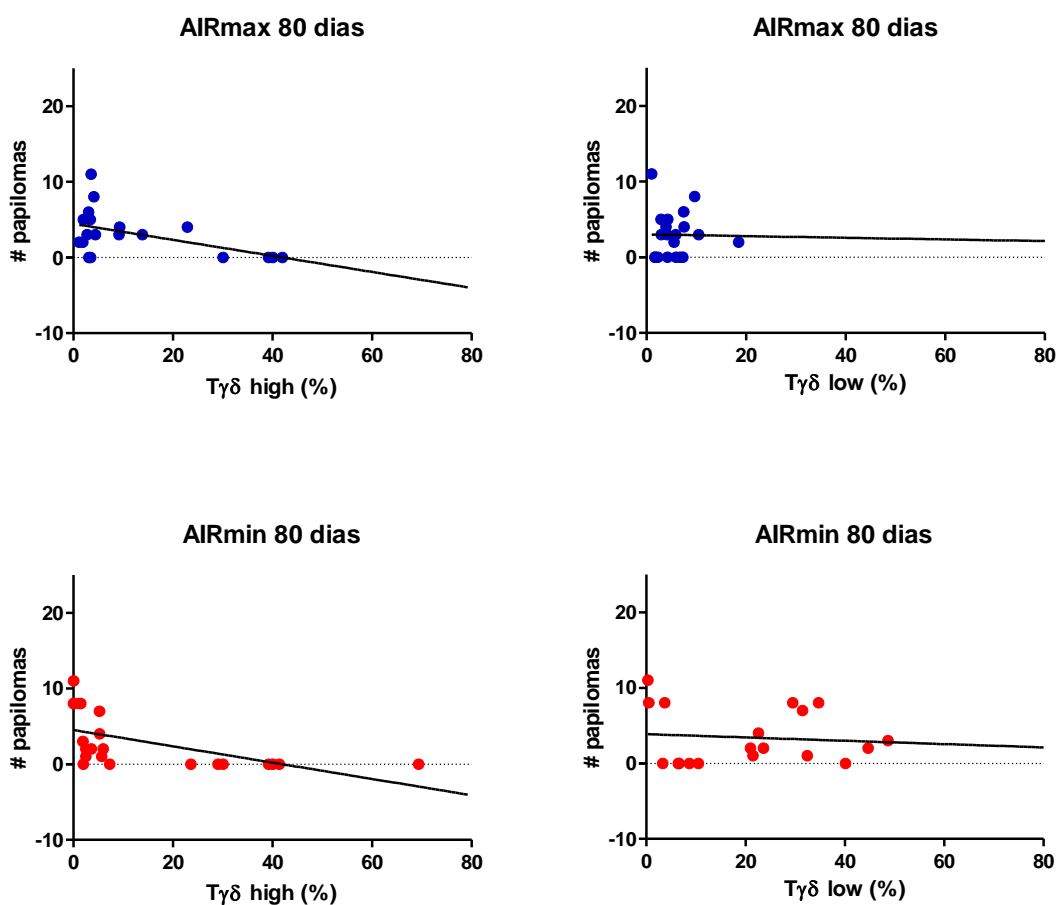


Fonte: autoria própria.

Para investigar a possível correlação entre o número de lesões papilomatosas e as subpopulações celulares dos linfócitos  $T\gamma\delta$ , conduzimos uma análise de correlação (Figura 20) entre esses dois parâmetros.

Com base nesse estudo, determinamos que, quando se trata da população de células  $T\gamma\delta^{\text{low}}$ , ambas as linhagens não mostraram correlações significativas entre a multiplicidade de lesões e a porcentagem de células. Por outro lado, ao examinar as células  $T\gamma\delta^{\text{high}}$ , observamos uma correlação inversa em termos de número de lesões: à medida que a porcentagem de  $T\gamma\delta^{\text{high}}$  aumenta, a multiplicidade das lesões tende a diminuir. Entretanto, é necessário considerar que os animais que apresentam maior concentração de  $T\gamma\delta^{\text{high}}$  são aqueles que foram tratados apenas com acetona/pbs (controle negativo) e que não desenvolvem nenhum tipo de lesão. Em contrapartida, todos os demais grupos que foram tratados e desenvolveram lesões, exibiram uma redução considerável na população de células  $T\gamma\delta^{\text{high}}$ .

**Figura 20** - Representação gráfica da correlação das subpopulações de linfócitos  $T\gamma\delta$  ( $T\gamma\delta^{\text{high}}/T\gamma\delta^{\text{low}}$ ) e lesões papilomatosas nos camundongos AIRmax (•) e AIRmin (•). Significância em AIRmax  $T\gamma\delta^{\text{high}}$   $p < 0,0260$  e  $T\gamma\delta^{\text{low}}$   $p < 0,9516$ ; AIRmin  $T\gamma\delta^{\text{high}}$   $p < 0,0057$  e  $T\gamma\delta^{\text{low}}$   $p < 0,7051$ .



Fonte: autoria própria.

Para consolidar e destacar as principais características de todos os experimentos relacionados à atividade da CTX nos protocolos adotados, elaboramos um esquema para apresentar de maneira mais clara os resultados, representado pela figura 21. Observamos que a CTX no protocolo de DMBA 5x, a concentração de 320µg/Kg foi a única que apresentou modulação, sendo assim, determinamos a utilização dessa concentração nos experimentos subsequentes. No protocolo de dois estágios (DMBA/TPA) onde a CTX foi aplicada duas vezes, bem como o veneno, vimos que a utilização da CTX e/ou veneno mostrou modular com mais intensidade a progressão de lesões tumorais nos animais da linhagem AIRmax, e no último protocolo (DMBA/TPA), onde foi utilizada a CTX epicutânea apenas uma vez por semana, igualmente a administração subcutânea, observamos uma modulação na multiplicidade de lesões por parte da CTX<sup>epi</sup> em ambas as linhagens, e um reparo na histofisiopatologia tecidual nos animais que receberam a CTX<sup>sub</sup> principalmente na linhagem AIRmax. É importante ressaltar que, apesar dos animais da linhagem AIRmin terem apresentado um processo pré-neoplásico na administração subcutânea, isso não determina uma malignidade tumoral.

**Figura 21** - Esquema resumido da atividade da CTX em todos os protocolos utilizados.

	DMBA 5x		DMBA/TPA/ CTX epi 2x	DMBA/TPA/ CdtV 2x	DMBA/TPA/CTX epi 1x	DMBA/TPA/CTX sub 1x
	1.280µg/Kg	320µg/Kg	320µg/Kg	540µg/Kg	320µg/Kg	0,82µg/animal
<b>AIRmax</b>						
Lesões papilomatosas	X	✓	✓	✓	✓	✓
Lesões visualmente tumorais	X	X	✓	✓	X	X
Modulação	X	X	✓	✓	✓	✓
CD3/Tγδ ou Tγδ <sup>high/low</sup> (80 dias)	+	—	++	++	vTγδ <sup>high</sup> /vTγδ <sup>low</sup>	vTγδ <sup>high</sup> /vTγδ <sup>low</sup>
Histologia	X	—	—	—	Displasia	Reparo tec.
Fenótipo	✓	✓	X	X	X	X
<b>AIRmin</b>						
Lesões papilomatosas	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Lesões visualmente tumorais	✓	✓	X	X	X	X
Modulação	X	✓	X	X	✓	✓
CD3/Tγδ ou Tγδ <sup>high/low</sup> (80 dias)	+++	—	++	++	vTγδ <sup>high</sup> /vTγδ <sup>low</sup>	vTγδ <sup>high</sup> /vTγδ <sup>low</sup>
Histologia	X	—	—	—	Displasia	Pré-neoplasia
Fenótipo	✓	✓	X	X	X	X

**Fonte:** autoria própria.

## 5 DISCUSSÃO

O sistema imunológico consiste de uma gama de processos específicos e não específicos que estão relacionados com a proteção do organismo por meio de células especializadas que liberam mediadores químicos, citocinas e que participam ativamente da vigilância imunológica (Pandya et al., 2016). Neste contexto considera-se a reação inflamatória como a primeira linha de defesa do organismo e está envolvida em diferentes patologias. A inflamação quando duradoura, período crônico, pode representar um fator de risco para o desenvolvimento e progressão de neoplasias (Chow et al., 2012). Pressupõe-se que 25% dos tumores malignos estejam associados à inflamação crônica gerada devido a infecções ou exposição a agentes químicos cancerígenos. Mesmo aqueles tumores que não são ocasionados por uma relação direta com inflamação, possuem características leucocitárias e mediadores inflamatórios no microambiente tumoral (Balkwill; Montovani, 2012).

Segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer), o câncer de pele é o que mais acomete homens e mulheres no país, podendo ter seu início fomentado por diversos fatores, entre eles a exposição a substâncias tóxicas como os HPA presentes no ambiente. Esses compostos contribuem para o desenvolvimento de muitas doenças, visto que, tem a capacidade de induzir a inflamação e o estresse oxidativo (Zhang, 2020). Com o propósito de elucidar os mecanismos subjacentes à carcinogênese cutânea induzida pelo agente cancerígeno DMBA, realizamos estudos experimentais, bem como, uma análise prospectiva dos efeitos imunossupressores da CTX na regulação da progressão da carcinogênese cutânea em camundongos AIRmax e AIRmin, utilizados devido à sua caracterização fenotípica de diferenças em relação à resposta inflamatória aguda.

Segundo Biozzi e colaboradores (1998), essas linhagens apresentam diferenças em relação à resistência e susceptibilidade aos efeitos tóxicos causados pelo DMBA. Como já mencionado, esses animais apresentam polimorfismo no gene *Ahr* que lhes confere diferentes afinidades do receptor de Hidrocarbonetos Aromáticos (De Souza et al., 2009).

Assim, a fim de induzir o aparecimento de lesões papilomatosas cutâneas, utilizamos DMBA como agente indutor, em dois protocolos distintos, e a CTX como um possível agente modulador de carcinogênese.

A CTX é retratada como uma toxina que possui efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios prolongados. Esses estão relacionados com a liberação de mediadores inflamatórios e também com a ativação do Receptor Peptídeo Formil (FPR) (Sampaio et al., 2006). A CTX exibe efeitos supressores da resposta imune humoral contra antígenos heterólogos (Favoretto, 2011) e também inibe colite quando testada em camundongos utilizados como modelo de inflamação intestinal aguda induzida por TNBS (Almeida, et al., 2015). A CTX foi capaz de modular a ativação de células dendríticas derivadas de medula óssea estimuladas com LPS *in vitro* bem como inibido a expressão de moléculas co-estimuladoras e secreção de citocinas pró-inflamatórias, além da proliferação de linfócitos T em ensaios de MLR ou em camundongos imunizados com OVA (Freitas, et al., 2018; Freitas et al., 2021).

Com relação à carcinogênese, muitos estudos têm apontado o papel da crotoxina como agente anti-tumoral, embora a grande maioria deles utilizem células de linhagens tumorais como alvo. Por outro lado, tentativas de avaliar a ação da crotoxina *in vivo* têm proliferado e, mais recentemente, um estudo experimental em modelo animal demonstrou o controle ou remissão de tumor de boca (Da Rocha et al., 2023)

Considerando esses estudos que classificam a CTX como um agente imunomodulador ou anti-tumoral importante, iniciamos nossos estudos com esta toxina para avaliar seu papel no controle de tumorigênese cutânea em camundongos geneticamente sensíveis à indução de carcinogênese de pele.

Inicialmente produzimos o soro de camundongo anti-CTX para ser utilizado na detecção da CTX na pele em experimentos com diferentes doses a fim de avaliar, por ELISA, sua presença nas camadas da pele por imunohistoquímica.

Sabe-se que a CTX quando utilizada em grandes concentrações possui a capacidade de bloquear os sinais neuromusculares e ocasionar letalidade *in vivo* (LANDUCCI et al., 1995). Entretanto, como não há na literatura estudos sobre sua letalidade (DL50) quando aplicada epicutâneamente (tópica), mostramos que os animais AIRmax e AIRmin suportam doses altas de até 1.280µg/kg sem causar qualquer tipo de lesão ou toxicidade. Por meio desse experimento optamos pelas



concentrações de 320µg/kg e 1.280µg/kg, doses intermediária e alta para serem utilizadas nos experimentos de modulação dos papilomas.

Para dar início aos experimentos, utilizamos o protocolo de tratamento com DMBA de 5 aplicações consecutivas como descrito por De Souza e colaboradores (2009), por ser um protocolo que induz o aparecimento de lesões papilomatosas em curto espaço de tempo. Com esse experimento pudemos analisar que o fenótipo de menor ou maior susceptibilidade ao carcinógeno de pele se manteve nos animais das duas linhagens analisadas e em todas as concentrações utilizadas (De Souza, 2009).

Ao realizar o experimento com a concentração de 1.280µg/Kg, nenhum animal da linhagem AIRmax apresentou papilomas, inclusive no grupo tratado apenas com DMBA, logo, neste caso, não conseguimos avaliar uma possível modulação pela CTX. No entanto, na dose de 320µg/kg observamos diferenças na incidência de lesões no grupo que recebeu a CTX uma vez por semana por três semanas consecutivas, pós DMBA e os animais da linhagem AIRmin apresentaram um número menor de papilomas no grupo correspondente, nos levando a escolher a dose de 320µg/kg para ser utilizada nos experimentos subsequentes. Além disso, interpretamos que a CTX pode levar a efeitos opostos nesses animais de linhagens diferentes, abrindo a possibilidade também de investigação para um possível polimorfismo no gene do receptor FPR.

Ao analisar a celularidade da pele desses animais, observamos que não houve variações significantes em relação ao controle positivo tratado apenas com DMBA. Isto pode ter ocorrido devido ao fato de termos avaliado num período tardio após a indução.

Considerando que o protocolo de DMBA5x não mostrou diferenças significativas com a utilização da CTX, optamos por utilizar um segundo protocolo de dois estágios com indução pelo DMBA e promoção da inflamação pelo TPA. Muller e colaboradores (2008) mostraram que o TPA, quando utilizado em conjunto com o DMBA em um protocolo de duas etapas foi capaz de promover uma intensa reatividade inflamatória, pois age como agente promotor da inflamação, facilitando o crescimento de mais lesões papilomatosas em associação ao carcinógeno. Esse modelo representa seguramente o desenvolvimento de tumores de pele, podendo ser analisados em vários estágios desde a iniciação, promoção até a progressão tumoral (Wang et al., 2016).

Neste segundo protocolo, DMBA/TPA, com duração de 120 dias, introduzimos o uso do veneno bruto e da CTX de forma epicutânea nas aplicações subseqüentes para avaliar se ocorria alguma modulação devido à CTX ou ao veneno, baseando nos estudos de Al Asmari; Khan (2016). Estes autores obtiveram resultados positivos de inibição utilizando o DMBA como indutor carcinogênico e um outro promotor inflamatório, óleo de cróton, em um estudo sobre a utilização do veneno de escorpião contra a tumorigênese de pele.

Em nossos experimentos observamos que os animais da linhagem AIRmin desenvolveram lesões papilomatosas em todos os grupos tratados, exceto no controle negativo (acetona). Este resultado demonstrou que, de fato, o protocolo de indução e promoção em dois estágios foi bem-sucedido, pois foi possível observar lesões papilomatosas confirmando o fenótipo de sensibilidade dos animais AIRmin em desenvolver papilomas na vigência da promoção pelo TPA (Biozzi et al., 1998a). Vale ressaltar que apesar do aparecimento papilomas, nenhum animal tratado desta linhagem, apresentou lesões que se assemelhavam visualmente a carcinomas.

Ao analisar as populações celulares, os animais dessa linhagem não apresentaram valores elevados de infiltrados inflamatórios no início do experimento provavelmente devido ao seu fenótipo selecionado resposta inflamatória aguda mínima. Em contrapartida, apresentaram altos valores de linfócitos  $T\gamma\delta$ , principalmente no período de 80 dias de avaliação, sugerindo uma possível modulação celular nesses linfócitos.

Considerando que estudos mostram que os linfócitos  $T\gamma\delta$  possuem diversas subpopulações e podem ser classificadas como reguladoras negativas ou efetoras de tumor (Zhao et al., 2018), entendemos que possivelmente tenha ocorrido um mecanismo de ativação antitumoral, visto que, essas células possuem plasticidade e podem ser polarizadas em células que produzem IFN- $\gamma$ , por exemplo, regulando o microambiente tumoral (Zhao et al., 2018).

Já em relação aos animais da linhagem AIRmax, neste protocolo de DMBA/TPA, observamos o desenvolvimento de lesões visualmente tumorais. Este fenômeno também foi evidenciado em todos os grupos tratados, com exceção no controle negativo (acetona). Entendemos que o fato desta linhagem ter desenvolvido lesões de cunho tumoral pode ter sido devido ao fato de sua resposta inflamatória aguda ser máxima (AIRmax), logo, com a aplicação do promotor inflamatório

consecutivamente por um período prolongado sugere-se uma maior predisposição à formação de carcinomas cutâneos nessa linhagem.

Ao analisar a multiplicidade e incidência das lesões nos AIRmax, notamos que os grupos que foram tratados com CTX ou veneno apresentaram valores equivalentes ao controle positivo, e visualmente, as lesões se assemelhavam a carcinomas. Desta forma, os efeitos modulatórios da CTX ou veneno, sobre essas condições aplicadas, parecem intensificar os efeitos citotóxicos do DMBA/TPA, pois não apenas deixam de inibir a formação de papilomas, mas também aceleram o processo de carcinogênese.

Quando foram analisadas as populações celulares, constatamos que os animais tratados apresentaram inicialmente um aumento significativo de células neutrofílicas, demonstrando que, de fato, a inflamação inicial foi bem-sucedida nessa linhagem que possui resposta inflamatória aguda máxima. No entanto, as variações celulares observadas nesses animais foram mais pronunciadas nos grupos tratados com CTX ou veneno, indicando que esses componentes podem ter exercido uma ação imunomoduladora, levando a uma resposta celular variável nessa linhagem.

Quanto aos linfócitos  $T\gamma\delta$ , os animais AIRmax apresentaram valores opostos em relação a outra linhagem estudada, pois apresentaram uma queda no número dessas células aos 80 dias. Dessa forma, entendemos que assim como esses linfócitos  $T\gamma\delta$  podem ter atuado de maneira antitumoral com os animais AIRmin, agora com essa linhagem seus efeitos podem estar sendo opostos e atuando como facilitadoras tumorais (Zhao et al., 2018).

Em relação à essas células, uma de suas subpopulações é a Treg $\gamma\delta$ , responsável por manter a tolerância imunológica e, por sua vez, é capaz de promover o crescimento tumoral. Outra subpopulação são as células T17 $\gamma\delta$  que fazem parte das células reguladoras com efetividade pró-inflamatória por induzirem a produção de IL-17 (Zhao et al., 2018). Foi visto que essas células podem contribuir para o desenvolvimento de tumores por meio da promoção da angiogênese em camundongos (Wu, 2014). Assim, hipotetizamos que a CTX e o veneno podem modular essas células de maneira oposta nas duas linhagens a despeito da presença do alelo *Ahr* da alta (*b1*) ou baixa (*d*) afinidade.

No que diz respeito às células dendríticas, vimos que os animais AIRmax apresentaram uma quantidade superior principalmente nos grupos que receberam a CTX e o veneno logo aos 20 dias. Isso sugere que as células dendríticas podem atuar de maneira sinérgica às Treg nos dias iniciais, favorecendo o crescimento tumoral nos

animais AIRmax, visto que, as células dendríticas dispõem de habilidades imunoestimuladoras relacionadas a atividade tumoral (Jang, 2016).

Portanto, entendemos que a CTX e o veneno aplicados epicutâneamente nesse modelo de protocolo por indução duas vezes semanais, estejam induzindo uma modulação celular nessas diferentes linhagens no sentido de uma possível promoção de lesões tumorais durante a vigência do estímulo com DMBA/TPA. Assim, consideramos importante o estudo para salientar o papel da CTX na polarização das populações celulares em AIRmax e AIRmin.

Com base nos estudos anteriores, conduzimos novos experimentos modificando a aplicação da CTX. Neste novo protocolo de dois estágios, aplicamos a CTX por via epicutânea apenas uma vez por semana ou administramos a dose subcutânea durante o período de 80 dias. Estudos como os de Nunes e colaboradores (2007) mostraram que com uma única dose do veneno de *Cdt* provoca um efeito anti-inflamatório duradouro no edema da pata e na migração celular causada pela carragenina em camundongos. Da mesma forma, o uso de uma única dose de CTX, administrada antes ou após a injeção de carragenina, diminuiu o edema da pata e suprimiu a migração celular (Nunes et al., 2010). A atividade anti-inflamatória está relacionada também à sua ação em neutrófilos, onde há uma atenuação da expressão de moléculas de adesão e secreção de citocinas (Nunes et al., 2010, 2011). Embora muitas pesquisas destacam os efeitos anti-inflamatórios desta toxina, em nossos estudos observamos que uma dose epicutânea de CTX aplicada semanalmente não gerou diferenças notáveis na inflamação, uma vez que alguns animais foram passíveis do desenvolvimento de dermatites tóxicas.

Analisando os dois protocolos de aplicação observamos que ao aplicar a CTX<sup>epi</sup> uma vez por semana, ocorreu uma inibição na progressão de papilomas para carcinomas, sendo o oposto quando as aplicações eram realizadas duas vezes semanais. Este fato foi observado em ambas as linhagens estudadas, mas foi particularmente notável nos animais da linhagem AIRmax. Esses animais ao receberem a CTX<sup>epi</sup> apresentaram diferenças visualmente claras em relação a progressão tumoral tanto pela quantidade de animais acometidos por lesões, quanto pela multiplicidade delas. No entanto, a administração da dose por via subcutânea resultou em valores elevados em relação aos parâmetros de multiplicidade e, sobretudo, incidência, apresentando valores equiparáveis ao controle positivo sem

qualquer efeito inibitório assemelhando-se aos efeitos da CTX epicutânea aplicada duas vezes semanais e ao veneno no protocolo anteriormente utilizando.

Nos animais da linhagem AIRmin, notamos que a aplicação da CTX<sup>epi</sup> uma vez por semana resultou também em um menor número de animais afetados e uma multiplicidade reduzida em comparação aos demais grupos tratados ao longo de todo estudo. No entanto, ao avaliar a dose subcutânea, esta aparentemente intensificou os parâmetros de incidência e multiplicidade de lesões, sem evidenciar qualquer eficácia em inibir o surgimento de lesões.

No contexto apresentado, é provável que o mecanismo de ação primordial da CTX seja mesmo o imunomodulador. A literatura cita diversos efeitos modulatórios como é mencionado por Cardoso e Mota (1997), que camundongos tratados com CTX e imunizados com HSA ou OVA tiveram uma produção reduzida de anticorpos. Adicionalmente, a CTX inibiu a proliferação de células esplênicas induzidas por Con-A (Cardoso et al., 2001) e evidenciou a capacidade de suprimir células do sistema imune, como linfócitos circulantes, quando administrada subcutaneamente em ratos (Zambelli et al., 2008) reforçando seus efeitos imunomoduladores. Assim, ao alinhar esses dados com nossos achados, supomos que possa ter ocorrido novamente uma imunomodulação principalmente nas células linfocitárias que participam do processo de progressão tumoral (Dao, V. et al., 2016; Whiteside, T.L. 2014; Rosenberg, S. A., et al., 2005).

Um elemento que pode ter contribuído para a disparidade em relação a progressão tumoral nos diferentes protocolos utilizados são os linfócitos T $\gamma\delta$ , justamente pela sua capacidade de polarização como previamente citado por Zhao et al (2018). Em nossos últimos estudos foi possível identificar duas subpopulações que caracterizamos como T $\gamma\delta^{\text{high}}$  e T $\gamma\delta^{\text{low}}$ , como descrito por Yokobori et al (2009) e Dao et al (2016). Em um estudo conduzido por Dao et al (2016) que empregou o protocolo DMBA/TPA para indução da carcinogênese cutânea e a rapamicina (eRapa) como agente anticancerígeno, foi revelado que os impactos desta dependem da ativação das células T $\gamma\delta$ . Esse processo fez com que a eRapa intensificasse as propriedades antitumorais associadas à perforina. Adicionalmente, o estudo indicou que a citocina IFN- $\gamma$  fomenta a migração, ativação e citotoxicidade de células T $\gamma\delta$  epidérmicas, influenciando ainda na expressão de células T e na indução de ligantes, como o receptor de quimiocinas CXCR3, crucial no direcionamento de linfócitos. Portanto, o estudo mostrou que o IFN- $\gamma$  foi capaz de recrutar a subpopulação de T $\gamma\delta^{\text{low}}$  para a

epiderme auxiliando a eRapa para promoção dos efeitos anticancerígenos. Com a presença de CXCR3 nas células  $T\gamma\delta^{\text{low}}$ , estas foram identificadas como potencialmente defensoras contra o câncer de pele induzido por DMBA/TPA, dado que recrutam células T antitumorais para a região, otimizando a defesa contra o crescimento tumoral.

Em outro estudo sobre a expressão de CD3 e seus subconjuntos na tuberculose pleural, as análises mostraram que a expressão de perforina determinada *ex vivo* no sangue periférico foi maior nas células  $T\gamma\delta^{\text{high}}$  em contrapartida, a porcentagem de  $T\gamma\delta^{\text{low}}$  se apresentou maior nas análises de CD107a<sup>+</sup> (Yokoboi et al., 2009), um marcador funcional para células *natural killer* (NK) (Alter; Malefant; Altfeld, 2004). Isso indica que, em nossos estudos, as células  $T\gamma\delta^{\text{high}}$  podem desempenhar um papel na manutenção e homeostase, uma vez que, nos animais controle observamos um aumento em sua porcentagem celular. Contudo, com a indução da carcinogênese pelo DMBA/TPA, a queda dessa população sugere uma possível redução de sua função regulatória, enquanto as células  $T\gamma\delta^{\text{low}}$  e TCD8<sup>+</sup> (representada por T $\alpha\beta$ ) apresentaram um crescimento, indicando possivelmente uma tentativa de resposta antitumoral, observada tanto na administração epicutânea, quanto na subcutânea, apesar desta não ter apresentado resultados promissores em relação às lesões macroscopicamente. Essas constatações foram identificadas nas duas linhagens estudadas.

O fato da aplicação da CTX<sup>epi</sup> ter sido realizada apenas uma vez semanalmente pode ter desempenhado um papel crucial na tentativa de exercer os efeitos antitumorais das células  $T\gamma\delta$ . No entanto, ao administrá-la duas vezes por semana, pode ter ocasionado um efeito de modulação excessiva polarizando as células em um estado pró-tumor, principalmente na presença de TPA em animais com inflamação aguda máxima.

A associação entre o número de lesões e linfócitos  $T\gamma\delta^{\text{high}}$  apresentou diferenças significativas que pudessem correlacionar à multiplicidade de lesões com a presença ou ausência dessa população. Isso nos leva a supor que a CTX pode influenciar a evolução do câncer de pele via células  $T\gamma\delta$ , nas suas subpopulações  $T\gamma\delta^{\text{high}}$  e  $T\gamma\delta^{\text{low}}$  mas, não necessariamente o surgimento de lesões papilomatosas. Essa suposição alinha-se com o estudo de Dao et al (2016), no qual o IFN- $\gamma$  se mostrou essencial na prevenção do câncer mediado pela eRapa, mas não para a prevenção de papilomas.

A análise histopatológica da pele realizada do experimento de protocolo de dois estágios DMBA/TPA revelou que a CTX<sup>sub</sup> inibe a evolução das lesões cancerígenas durante os 80 dias de tratamento com o carcinógeno, nas duas linhagens AIRmax e AIRmin, corroborando dados da literatura sobre a propriedade anti-tumoral da CTX (Da Rocha, 2023). Por outro lado, as aplicações de CTX<sup>epi</sup> revelaram modulação principalmente no número de lesões e pouca ou nenhuma influência na gravidade das mesmas. Este efeito sobre o número de lesões pode estar relacionado com a propriedade anti-inflamatória da CTX. Portanto, a depender da via de tratamento, o efeito da CTX é passível de variação.

Em resumo, a aplicação epicutânea da CTX duas vezes na semana, bem como o veneno e a administração subcutânea não mostraram efeitos positivos no quesito de desenvolvimento e progressão de lesões. Em contrapartida, a utilização da CTX<sup>epi</sup> apenas uma vez por semana mostrou ter efeitos positivos no controle da multiplicidade de lesões, mas não na histopatologia. Porém, a o fato da administração subcutânea ter mostrado histologicamente efeitos positivos no estabelecimento da histofisiopatologia do tecido, nos leva a considerar que a utilização da CTX<sup>epi</sup> e da CTX<sup>sub</sup> se complementam em um possível tratamento, dentro dessas condições estudadas. Ademais, os estudos sobre as células linfocitárias e suas subpopulações precisam ser mais aprofundados para possíveis efeitos terapêuticos futuros.

## 6 CONCLUSÕES

A CTX mostrou capacidade de penetração na pele por via epicutânea (tópica);

O estudo revelou que as linhagens AIRmax e AIRmin apresentam diferenças na susceptibilidade ao DMBA em todos os protocolos adotados. No entanto, o perfil fenotípico não se manteve totalmente preservado, visto que, na segunda série experimental com DMBA/TPA os animais AIRmax apresentaram maior sensibilidade, apesar da presença do alelo *Ahr* de baixa afinidade aos hidrocarbonetos aromáticos.

Os potenciais efeitos da CTX na modulação do surgimento de lesões papilomatosas tornaram-se mais claros com a dose de 320µg/Kg, observado no protocolo inicial de indução com DMBA 5x.

As populações celulares apresentaram maior variabilidade no protocolo de dois estágios, onde notamos que a utilização da CTX em todas suas formas tende a influenciar diretamente a população linfocitária e suas subpopulações  $T\gamma\delta^{high}$  e  $T\gamma\delta^{low}$  com potencial modulador de tumorigênese.

No protocolo de dois estágios (DMBA/TPA) a utilização da CTX bissemanal ou veneno mostrou piorar os efeitos do carcinógeno, e a aplicação da CTX uma vez por semana mostrou eficácia na inibição da progressão tumoral das lesões macroscópicas, mas não histologicamente, ao contrário da administração por via subcutânea que não apresentou mudanças no número de lesões ou características, mas exibiu nas análises histológicas um perfil de reestabelecimento tecidual positivo nas duas linhagens.



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Introduction to the immune system. **Basic Immunology**. 2011.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Cellular and molecular immunology. Rio de Janeiro; **Elsevier**; Ed. 8, p. 536, 2015.
- AL ASMARI, A. K.; KHAN, A. Q. Investigation of in vivo potential of scorpion venom against skin tumorigenesis in mice via targeting markers associated with cancer development. **Drug Des Devel Ther**, v.18, n.10, p. 3387-3397, 2016.
- ALMEIDA, C. S., et al. "Crotoxin from *Crotalus Durissus Terrificus* Is Able to down-Modulate the Acute Intestinal Inflammation in Mice." **PloS One**, v. 8, n.10, p. 4, 2015.
- ALTER, G.; MALENFANT, J. M.; ALTFELD, M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. **Journal Of Immunological Methods, Elsevier BV**, [S.L.], v. 294, n. 1-2, p. 15-22, 2004.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M., et al. Acidente crotálico *In: Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.* **Sarvier**. São Paulo. 2ª ed. 2009.
- BAUDOUD, F. G. et al. South American snake venoms with abundant neurotoxic components. Composition and toxicological properties. A literature review. **Acta tropica**, [s. l.], v. 224, p.106-119, 2021.
- BALKWILLI, R, F., MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation: Common themes and therapeutic opportunities. **Seminars In Cancer Biology. Elsevier**, Londres, v. 22, n. 1, p. 33-40, 2002.
- BIOZZI, G. O., et al. Effect of Genetic Modification of Acute Inflammatory Responsiveness on Tumorigenesis in the Mouse. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 2, p. 337-346, 1998a.
- BIOZZI, G. O., et al. Effect of Genetic Modification of Acute Inflammatory Responsiveness on Tumorigenesis in the Mouse. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 2, p. 337-346, 1998b.
- BONAVITA E., et al. Phagocytes as Corrupted Policemen in Cancer-Related Inflammation. **Adv Cancer Res.**; p.128:141-161, 2015.
- BOSTRÖM, C.E., et al. Cancer Risk Assessment, Indicators, and Guidelines for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Ambient Air. **Environmental Health Perspectives**, p. 451-488, 2002.
- BON, C. et al. Crotoxin halfcentury of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta Physiol. Pharmacol. Latino-Am**, v. 39, p. 439-448, 1989.
- BRODIN, P.; DAVIS, M. M. 2016. Human Immune System Variation. **Nature Reviews Immunology**. p. 21-29, 2016.

CARDOSO, D. F., MOTA, I. Effect of Crotalus venom on the humoral and cellular immune response. **Toxicon**, v. 35, n. 4, p.607-12, 1997.

CARDOSO, D. F., et al. Role of crotoxin, a phospholipase A2 isolated from Crotalus durissus terrificus snake venom, on inflammatory and immune reactions. **Mediators Inflamm**, v. 10, n. 3, p. 125-33, 2001.

CARVALHO, L. R. de., et al. Genetic Predisposition to Hepatocarcinogenesis in Inbred and Outbred Mouse Lines Selected for High or Low Inflammatory Response. **Journal of Immunology Research**, id. 5298792, 2019.

CASTRO, F. R., et al. The effect of treatment with crotapotin on the evolution of experimental autoimmune neuritis induced in Lewis rats. **Toxicon.**; v. 49, n. 3, p. 299-305, 2007.

CENTER, A.C. **Camargo Cancer de Pele Não Melanoma**. Disponível em: <https://www.accamargo.org.br/sobre-o-cancer/tipos-de-cancer/pele-nao-melanoma>. Acesso em: 2022.

CEZAR-DE-MELLO, P. F., et al. ATL-1, an analogue of aspirin-triggered lipoxin A4, is a potent inhibitor of several steps in angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. **Br J Pharmacol**, v. 153 n. 5, p. 956-65, 2008.

CHAPLIN, David D.. Overview of the immune response. **Journal Of Allergy And Clinical Immunology**, Elsevier BV. [S.L.], v. 125, n. 2, p. 3-23, 2010.

CHOUMET, V. et al. Structure and function relationship of crotoxin, a heterodimeric neurotoxin phospholipase A2 from the venom of a South-American rattlesnake. **Adv. Exp. Med. Biol**, v. 391, p. 197-202, 1996.

CHOW, M. T. et al. Inflammation and immune surveillance in cancer. **Elsevier, Seminars In Cancer Biology**, v. 22, n. 1, p. 23-32, 2012.

CLAUSEN, B. E., GRABBE, S. Multifaceted contributions of epidermal langerhans cells to cutaneous carcinogenesis. **J Invest Dermatol**, v. 135, n. 5, p. 1218-1220, 2015.

COUSSENS, L. M., Werb Z. Inflammation and cancer. **Nature.**; id. 19-26;420(6916):860-7, 2002.

CURA, J.E., et al. Phase I and pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA(2), NSC-624244) in patients with advanced cancer. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 4, p. 1033-1041, 2002.

DA ROCHA, R.G., et al., The antineoplastic potential of crotoxin isolated from Crotalus durissus terrificus snake venom on oral squamous cell carcinoma. **Toxicon**, v. 221, 2023.

DAO, V.; et al. Immune-Stimulatory Effects of Rapamycin Are Mediated by Stimulation of Antitumor  $\gamma\delta$  T Cells. **Cancer Research**, [American Association for Cancer Research (AACR)], v. 76, n. 20, p. 5970-5982, 2016.

DELVES, Peter J.; ROITT, Ivan M.. The Immune System. **New England Journal Of Medicine**, Massachusetts Medical Society [S.L.], v. 343, n. 1, p. 37-49, 2000.

DE SOUZA, V. R. C., et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Polymorphism Modulates DMBA-Induced Inflammation and Carcinogenesis in Phenotypically Selected Mice. *International Journal of Cancer*. **J Intern Du Cancer**, v. 124, n. 6, p. 1478–1482, 2009.

DI PACE, R. F., et al. “Inverse Genetic Predisposition to Colon versus Lung Carcinogenesis in Mouse Lines Selected Based on Acute Inflammatory Responsiveness.” **Carcinogenesis**, v. 27, n. 8, p. 1516–1525, 2006.

FAURE, G., BON, C. Several Isoforms of Crotoxin Are Present in Individual Venoms from the South American Rattlesnake *Crotalus Durissus Terrificus*. **Toxicon**, v. 25 n. 2, p. 229–234, 1987.

FAVORETTO, B. C., et al. Immunomodulatory effects of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice immunised with human serum albumin. **Toxicon**, v. 57, n. 4, p. 600-607, 2011.

FRAENKEL-CONRAT, H., and Singer, B. Fractionation and composition of crotoxin. **Arch Biochem Biophys**, v. 60, n. 1, p. 64-73, 1956.

FREITAS, A. P., et al. Crotoxin Isolated from *Crotalus durissus terrificus* Venom Modulates the Functional Activity of Dendritic Cells via Formyl Peptide Receptors. **J Immunol Res**, v. 2018, id. 7873257, 2018.

FREITAS, A. P. et al. The modulatory effect of crotoxin and its phospholipase A2 subunit from *Crotalus durissus terrificus* venom on dendritic cells interferes with the generation of effector CD4+ T lymphocytes. **Elsevier: Immunology Letters**, v. 240, n. 1, p. 56-70, 2021.

FIERRO, I. M. Angiogenesis and lipoxins. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 73, n. 3-4, p. 271-275, 2005.

GALDIERO, M.R., MARONE, G., MANTOVANI, A. Cancer Inflammation and Cytokines. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 10, n. 8, id. a028662, 2018.

GAO, J., et al. Cytochrome P450 1B1 is required for 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene (DMBA) induced spleen cell immunotoxicity. **Toxicol Sci**, v. 86, n. 1, p. 68-74, 2005.

GOPALAKRISHNAKONE, P. et al. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. **Toxicon**, v. 22, p. 85-98, 1984.

GRIVENNIKOV, S.I., GRETEN, F. R., KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

IBANEZ, O.M., et al. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **Eur J Immunol**, v. 22, n. 10, p. 2555-2563, 1992.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. **Câncer de Pele**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/assuntos/cancer-de-pele>. Acesso em: 2021.

JANG, J.; et al. Crosstalk between Regulatory T Cells and Tumor-Associated Dendritic Cells Negates Anti-tumor Immunity in Pancreatic Cancer. **Science Direct: Cell Reports**, v. 20, n. 3, p. 558-571, 2016.

KATZ, I. S. S., et al. 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced genotoxicity on bone marrow cells from mice phenotypically selected for low acute inflammatory response. **DNA Repair (Amst)**, v. 37, p. 43-52, 2016.

KATZ, I. S. S., 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. **Int J Toxicol**, v. 332, n. 1, p. 30-42, 2014.

KIMURA, E.T., et al. TGFbeta, activina e sinalização SMAD em câncer de tiróide [TGFbeta, activin and SMAD signalling in thyroid cancer]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 51, n. 5, p. 683-689, 2007.

LANDUCCI, E. C. T.; et al. Inhibition of carrageenan-induced rat paw edema by crotafotina, a polypeptide complexed with phospholipase A2. **Br. J. Pharmacol**, v. 114, n.3, p. 578-583, 1995.

LEWIS, J. M., et al. Mechanisms of Chemical Cooperative Carcinogenesis by Epidermal Langerhans Cells. **The J of Invest Dermat**, v. 135, n. 5, p. 1405–1414, 2015.

LINDHE, O., GRANBERG, L., BRANDT, I. Target cells for cytochrome p450-catalysed irreversible binding of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) in rodent adrenal glands. **Arch Toxicol**, v. 76, n. 8, p. 460-466, 2002.

MARIA, D. A., et al. Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas1) locus affects inflammatory response. **Oncogene**, v. 22, n. 3, p. 426-432, 2003.

MALOSSE, C., HENRI, S. Isolation of Mouse Dendritic Cell Subsets and Macrophages from the Skin. **Methods Mol Biol**, v. 1423, p. 129-137, 2016.

MODI, B. G., et al. Langerhans Cells Facilitate Epithelial DNA Damage and Squamous Cell Carcinoma. **Science**, v. 335, p. 104–108, 2012.

SHENG, J. et al. Fate mapping analysis reveals a novel murine dermal migratory Langerhans-like cell population. **ELife Sciences**, v. 10, 2021.

MCCMAHON, B.; GODSON, C. Lopoxins: endogenous regulators of inflammation. **Am. J. Physiol. Renal Physiol**, v. 6, n. 2, p. 189-201, 2004.

MELANI, R. D. et al. Seeing beyond the tip of the iceberg: A deep analysis of the venom of the Brazilian Rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. **EuPA Open Proteomics**, v. 8, p. 144-156, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. **Fundação Nacional de Saúde**, 2ªed. p. 26-29, 2001.

MODI, B. G., et al. Langerhans cells facilitate epithelial DNA damage and squamous cell carcinoma. **Science**, v. 335(6064), p. 104-108, 2012.

MULLER, M. M. Inflammation in Epithelial Skin Tumours: Old Stories and New Ideas. **Europ J of Cancer**, v. 42, n. 6, p. 735–744, 2006.

MULLER, A. J., et al. Chronic Inflammation That Facilitates Tumor Progression Creates Local Immune Suppression by Inducing Indoleamine 2,3 Dioxygenase.” **Proc of the Nat Acad of Sci of the USA**, v. 105, n. 44, p. 16073–16078, 2008.

NAIR, A., et al. Inflammation, symptoms, benefits, reaction, and biochemistry. **Inflammation And Natural Products Elsevier**, v. 1, p. 1-19, 2021.

NOGUEIRA-NETO, F. de S., et al. The analgesic effect of crotoxin on neuropathic pain is mediated by central muscarinic receptors and 5-lipoxygenase-derived mediators. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 91, n. 2, p. 252-260, 2008.

NUNES, F. P. B. et al. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. **Toxicon**, v. 49, n. 8, p. 1090-1098, 2007.

NUNES, F. P., et al. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1100-1106, 2010.

PANDYA, P. H., et al. The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches. **J Immunol Res**, v. 2016, id. 4273943, 2016.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Res. Assoc. Med. Bras**, v 47, n. 1, 2001.

PIMENTA, L. A., et al. Crotoxin Promotes Macrophage Reprogramming towards an Antiangiogenic Phenotype. **Scientific Reports**, v. 4281, 2019.

RIBEIRO, O. G. “Genetic Selection for High Acute Inflammatory Response Confers Resistance to Lung Carcinogenesis in the Mouse.” **Experimental Lung Research**, v. 31, n. 1, p. 105–116, 2005.

ROSENBERG, S.A., et al. Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+T cells in patients with melanoma. **J Immunol**, v. 165, n. 9, p. 6169-6166, 2005.

ROSENFELD, G. - Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, E. & DEULOFEU, V., ed. Venomous animals and their venoms. New York, **Academic Press**, p.345-384, 1971.

SAMPAIO, S. C. et al. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. **Toxicon**, v. 41, n. 7, p. 899-907, 2003.

SAMPAIO, S. C. et al. Crotoxin induces actin reorganization and inhibits tyrosine phosphorylation and activity of small GTPases in rat macrophages. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 909-919, 2006.

SAMPAIO, S. C. et al. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1045-1060, 2010.

SANT'ANNA, M. B., 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, p. 679, 2019.

SARTIM, M. A., MENALDO, D. L., SAMPAIO, S. V. Immunotherapeutic potential of Crotoxin: anti-inflammatory and immunosuppressive properties. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 17. 24:39, 2018.

SINGH, N. et al. Inflammation and cancer. **Annals Of African Medicine**, v. 18, n. 3, p. 121, 2019.

SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. Chemical studies on snake venoms. Purification and crystallization of rattlesnake venom. **Mem. Insti. Butantan**, v. 12, p. 505-512, 1938.

STIFFEL, C., et al. Genetics of acute inflammation: inflammatory reactions in inbred lines of mice and in their interline crosses. **Exp Clin Immunogenet**, v. 7, n. 4, p. 221-233, 1990.

STOCKER, K. Composition of snake venoms. In: Stocker, K. F. **Medical use of snake venom proteins**, p. 33-56, 1990.

TASIMA, L. J. et al. 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**, v. 185, p. 26–35, 2020.

VITAL-BRAZIL, O. Neurotoxins from South American rattlesnake. **J. Formosan. Med. Assoc.**, v.71, p. 394-396, 1972.

VITALE, R. F., RIBEIRO, F. de A. Q. O Papel Do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) No Processo de Erosão óssea Presente No Colesteatoma Adquirido Da Orelha Média. **Rev Bras de Otorrino**, v. 73, n. 1, 2007.

WANG, F.; et al.  $\alpha$ -Mangostin inhibits DMBA/TPA-induced skin cancer through inhibiting inflammation and promoting autophagy and apoptosis by regulating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in mice. Elsevier: **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 672-680, 2016.

WHITESIDE, T.L. Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? **Cancer Immunol Immunother**, v. 63, p. 67–72, 2014.

(WHO), World Health Organization. non-melanoma skin câncer. Disponível em: <https://www.iarc.fr/>. 2020.

WU, P., et al.  $\gamma\delta$ T16 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. **Immunity**, v. 40, n. 5, p. 785-800, 2014.

YE, B., et al. Anti-tumor activity of CrTX in human lung adenocarcinoma cell line A549. **Acta Pharmacol Sin.**, v. 32, n. 11, p. 1397-1401, 2011.

YOKOBORI, N., et al. CD3 expression distinguishes two gammadeltaT cell receptor subsets with different phenotype and effector function in tuberculous pleurisy. **Clin Exp Immunol**, v. 157, n. 3, p. 385-394, 2009.

ZAMBELLI, V. O., et al. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1357-1367, 2008.

ZHANG, H., et al. Association of internal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with inflammation and oxidative stress in prediabetic and healthy individuals. **Chemosphere**, v. 253, id. 126748, 2020.

ZHAO, Y., et al. Gamma-delta ( $\gamma\delta$ ) T cells: friend or foe in cancer development. **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 3, 2018.