

Rita Alexandre Esteves

**Avaliação do papel da crotoxina na modulação da  
carcinogênese pulmonar induzida em animais  
fenotipicamente selecionados para a resposta inflamatória  
aguda**

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

**Versão Corrigida**

São Paulo  
2023

Rita Alexandre Esteves

**Avaliação do papel da crotoxina na modulação da  
carcinogênese pulmonar induzida em animais  
fenotipicamente selecionados para a resposta inflamatória  
aguda**

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

Orientador: Professor Doutor Orlando Garcia Ribeiro Filho

**Versão Corrigida**

São Paulo  
2023

## Versão Corrigida

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, 5 de dezembro, 2023.

..... Rita Esteves .....

Aluna Rita Alexandre Esteves

De acordo: .....  .....

Orientador Orlando Garcia Ribeiro Filho

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

Alexandre Esteves, Rita

Avaliação do papel da crotoxina na modulação da carcinogênese pulmonar induzida em animais fenotipicamente selecionados para a resposta inflamatória aguda / Rita Alexandre Esteves ; orientador(a) Orlando Garcia Ribeiro Filho - São Paulo, 2023.

83 p. : il.

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

1. Uretana 2. Camundongo. 3. Carcinogênese Pulmonar. 4. Crotoxina I. Ribeiro Filho, Orlando Garcia. II. Instituto Butantan. III. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia. IV. Título.

## AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DO TRABALHO

Eu, Rita Alexandre Esteves, aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia do Instituto Butantan, autorizo a divulgação da 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 após a data da defesa:

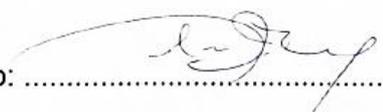
- Imediato  
 06 meses  
 12 meses  
 Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 6 de dezembro de 2023.

..... Rita Esteves .....

Aluna: Rita Alexandre Esteves

De acordo: .....  .....

Orientador: Orlando Garcia Ribeiro Filho

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS-TOXINOLOGIA  
INSTITUTO BUTANTAN

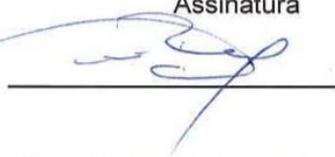
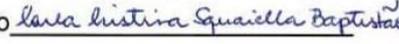
RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MESTRADO

NOME DO ALUNO: Rita Alexandre Esteves

DATA DO EXAME: 11/10/2023

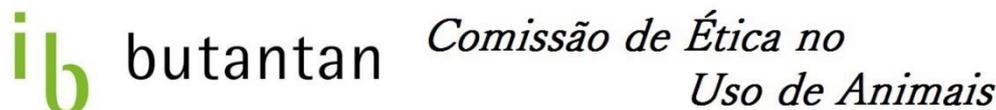
BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovada	Reprovada
Orlando Garcia Ribeiro Filho (Presidente)		(X)	( )
Carla Cristina Squaiella Baptista		(X)	( )
Morena Brazil Martins Sant'Anna		(X)	( )

DECISÃO FINAL: APROVADA (X) REPROVADA ( )

Comentários da Banca (opcional):

# PARECER DE COMISSÕES INSTITUCIONAIS REGULATÓRIAS



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do papel da crotoxina na modulação da carcinogênese pulmonar induzida em animais fenotipicamente selecionados para a resposta inflamatória aguda", protocolada sob o CEUA nº 5563300921 (ID 002474), sob a responsabilidade de **Orlando Garcia Ribeiro Filho e equipe; Rita Alexandre Esteves** - 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 da Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 24/11/2021.

We certify that the proposal "Evaluation of crotoxin modulation on the pulmonary chemistry carcinogenesis in phenotypically selected mice for the acute inflammatory response", utilizing 140 Heterogenics mice (140 males), protocol number CEUA 5563300921 (ID 002474), under the responsibility of **Orlando Garcia Ribeiro Filho and team; Rita Alexandre Esteves** - 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 11/24/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [11/2021](#) a [02/2023](#)

Área: [Imunogenética](#)

Origem:	<a href="#">Biotério Imunogenética</a>	sexo:	<a href="#">Machos</a>	idade:	<a href="#">8 a 12 semanas</a>	N:	<a href="#">70</a>
Espécie:	<a href="#">Camundongos heterogênicos</a>			Peso:	<a href="#">25 a 28 g</a>		
Linhagem:	<a href="#">AIRmax</a>						
Origem:	<a href="#">Biotério Imunogenética</a>	sexo:	<a href="#">Machos</a>	idade:	<a href="#">4 a 12 semanas</a>	N:	<a href="#">70</a>
Espécie:	<a href="#">Camundongos heterogênicos</a>			Peso:	<a href="#">25 a 28 g</a>		
Linhagem:	<a href="#">AIRmin</a>						

Local do experimento: Sala de Experimentação do Biotério Imunogenética

São Paulo, 24 de novembro 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

A todos os que sempre acreditaram em mim e que sempre estiveram ao meu lado para me apoiar, um grande obrigada!

## AGRADECIMENTOS

Existem pessoas especiais que iluminam o nosso caminho e que nos dão força, gostaria de agradecer e dedicar esta dissertação a essas pessoas.

Agradeço primeiramente aos meus pais, pelo apoio e amor incondicional, por sempre confiarem nas minhas decisões e por sempre acreditarem em mim. Sem vocês, nunca seria quem eu sou hoje, assim como nunca conseguiria alcançar o que alcancei, e por isso, um enorme obrigada! Onde quer que esteja, estarão sempre no meu coração.

Quero agradecer à minha avó, à minha companhia, à pessoa maravilhosa que me ensinou a batalhar para atingir os meus objetivos e que me ensinou a levantar a cabeça perante as adversidades. Agradeço por todo o carinho, apoio e amor incondicional.

Ao meu irmão, pela paciência, pelo companheirismo e por estar sempre ao meu lado quando preciso. Por ser o meu ombro amigo e por sempre me apoiar em todas as minhas decisões.

Ao meu avô, por toda a preocupação pelo meu futuro e bem-estar. Por todo o apoio e carinho.

À minha família, que sempre me apoia e acredita em mim, mesmo quando a distância nos separa. Vocês são o meu orgulho.

À Bruna, por me dar força em todos os momentos em que hesitei, por acreditar em mim e por sempre me motivar para continuar. Por todo o amor e carinho, e pela paciência diária.

Ao meu orientador, Dr. Orlando, que me acolheu num momento atribulado. Agradeço muito pela dedicação, incentivo e confiança, assim como por toda a paciência e ensinamentos que me transmitiu.

À Bruna, Janaína, Fernanda, Mara e Aline, por todos os bons momentos passados. Por toda a paciência e pela convivência e amizade. A vossa ajuda e apoio foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A todos os pesquisadores do Laboratório de Imunogenética por toda a ajuda e partilha de conhecimentos.

Ao Dr. Silas, pela ajuda na compreensão dos resultados histológicos.

A todos os docentes do Programa de Pós-graduação, por todos os ensinamentos e por se mostrarem sempre disponíveis para ajudar.

Aos funcionários do biotério do Laboratório de Imunogenética por toda a ajuda, sem vocês este projeto não seria possível.

A todos os membros da banca por aceitarem participar nesta etapa tão importante da minha vida.

Aos meus amigos, Frade, Afonso, Braz e Bianca, pela amizade e por todos os momentos de alegria, porque momentos de descontração também são necessários.

À CAPES, por financiar este trabalho.

A todos os que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste projeto, muito obrigada a todos. Nunca conseguiria sem vocês.

## RESUMO

ALEXANDRE ESTEVES, Rita. **Avaliação do papel da crotoxina na modulação da carcinogênese pulmonar induzida em animais fenotipicamente selecionados para a resposta inflamatória aguda.** 2023. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Toxinologia) – Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

O câncer é a principal causa de morte no mundo, sendo o câncer de pulmão o responsável pelo maior número de óbitos, seja por ser diagnosticado muitas vezes num estágio tardio ou pela falta de métodos terapêuticos eficazes. A crotoxina (CTX) é o principal componente do veneno da cascavel (*Crotalus durissus terrificus*), correspondendo a cerca de 60% da sua composição. Nos últimos anos, têm sido descritas as suas propriedades imunomoduladoras, anti-inflamatórias e antitumorais, sendo apresentada como uma possível candidata para utilização terapêutica. Com o intuito de estudar o papel regulador da CTX, foi induzida carcinogênese pulmonar por injeção intraperitoneal de uretana (URT), em animais fenotipicamente selecionados para resposta inflamatória aguda máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin). Do ponto de vista genético, estes animais apresentam uma sensibilidade diferenciada à tumorigênese pulmonar induzida por URT, relacionada à fixação de alelos de efeitos opostos no locus *pas1* (*Pulmonary adenoma susceptibility 1*) durante o processo de seleção, com um alelo de suscetibilidade (*pas1<sup>s</sup>*) na linhagem AIRmin, e um alelo de resistência (*pas1<sup>r</sup>*) na linhagem AIRmax. Considerando estas diferenças entre as linhagens e os efeitos descritos da CTX, esses animais foram submetidos a diferentes tratamentos com CTX e avaliados quanto à tumorigênese, no que concerne à incidência e dinâmica celular no pulmão. Os resultados demonstraram que os fenótipos de resistência e susceptibilidade estão preservados entre as linhagens, mesmo após a administração da CTX. Adicionalmente, foram observados possíveis efeitos moduladores da CTX, principalmente nas análises histopatológicas nos grupos de tratamento quando a CTX é aplicada 10 dias após a administração de URT na concentração de 8 µg/kg e 16 µg/kg, assim como quando aplicada continuamente de 10 em 10 dias numa concentração de 8 µg/kg.

**Palavras-chave:** Uretana. Camundongo. Carcinogênese. Crotoxina. Pulmão.

## ABSTRACT

ALEXANDRE ESTEVES, Rita. **Crotoxin assessment as an induced-lung carcinogenesis modulator in mice phenotypically selected for acute inflammatory response**. 2023. 83 p. Master's thesis (Master's degree in Sciences - Toxinology) – Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Cancer is the main cause of death in the world, with lung cancer being responsible for most of the deaths, either because it is often diagnosed at a late stage or due to the lack of effective therapeutic methods. Crotoxin (CTX) is the main component of South American rattlesnake venom, corresponding to about 60% of its composition. In recent years, its immunomodulatory, anti-inflammatory, and antitumor properties have been described, making it a new possible candidate for therapeutic use. In order to study the regulatory role of CTX, lung carcinogenesis was induced by intraperitoneal injection of urethane (URT) in mice phenotypically selected for maximal (AIRmax) or minimal (AIRmin) acute inflammatory responses. From a genetic background, these animals have different sensitivity to urethane-induced lung tumorigenesis due to the fixation of alleles with opposite effects at the *pas1* locus (Pulmonary adenoma susceptibility 1) during the selection process, with a susceptibility allele (*pas1<sup>s</sup>*) in the AIRmin mice and a resistance allele (*pas1<sup>r</sup>*) in the AIRmax mice. Considering these differences and the described effects of CTX, these animals were subjected to different treatments with CTX and evaluated regarding their tumorigenesis in terms of incidence and cellular dynamics in the lung. The results showed that the phenotypes of resistance and susceptibility in the mice were preserved, even after CTX administration. Additionally, possible modulatory effects of CTX were observed, mainly in histopathologic analysis on the groups where CTX was administered 10 days after tumor induction by urethane with a concentration of 8 µg/kg and 16 µg/kg, and also on the treatment where CTX was administered every 10 days with a concentration of 8 µg/kg.

**Keywords:** Urethane. Mice. Carcinogenesis. Crotoxin. Lung.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Incidência e mortalidade dos 10 tipos de cânceres mais comuns em 2020 para ambos os sexos .....	21
<b>Figura 2</b> - Metabolização da uretana em camundongos.....	27
<b>Figura 3</b> - Diagrama representativo do modelo de cruzamento utilizado para obtenção da população inicial F0.....	30
<b>Figura 4</b> - Multiplicidade e incidência das lesões tumorais macroscópicas observadas nos camundongos das linhagens AIRmax e AIRmin tratados com CTX (0,8 µg/kg) administrada 10 dias após a administração de URT .....	42
<b>Figura 5</b> - Lesões tumorais macroscópicas observadas em cada grupo das respectivas linhagens.....	43
<b>Figura 6</b> - Fotomicrografias dos pulmões dos camundongos de cada grupo da linhagem AIRmax, aos 30, 60 e 120 dias após tratamento .....	44
<b>Figura 7</b> - Fotomicrografias dos pulmões dos camundongos de cada grupo da linhagem AIRmin, aos 30, 60 e 120 dias após tratamento .....	45
<b>Figura 8</b> - Estratégia adotada para análise das células responsáveis pela resposta inflamatória, células CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> .....	47
<b>Figura 9</b> - Análise de células T CD4 presentes nos pulmões dos animais das linhagens AIRmax e AIRmin, e respectivos grupos de tratamento .....	48
<b>Figura 10</b> - Análise de células T CD8 presentes nos pulmões dos animais das linhagens AIRmax e AIRmin, e respectivos grupos de tratamento .....	49
<b>Figura 11</b> - Análise de neutrófilos presentes nos pulmões dos animais das linhagens AIRmax e AIRmin, e respectivos grupos de tratamento. ....	49
<b>Figura 12</b> - Análise de células mieloides imaturas presentes nos pulmões dos animais das linhagens AIRmax e AIRmin, e respectivos grupos de tratamento .....	50

<b>Figura 13</b> - Multiplicidade e incidência das lesões tumorais macroscópicas observadas nos camundongos da linhagem AIRmin tratados com uretana (UU) e com uma dose única de crotoxina (16 µg/kg) administradas 10 dias após a primeira dose de uretana (UUCTX10), além dos respectivos controles (C10 e CTX10) .....	52
<b>Figura 14</b> - Multiplicidade e incidência das lesões tumorais macroscópicas observadas nos camundongos da linhagem AIRmin tratados com uretana (UU) e com múltiplas doses de crotoxina (8 µg/kg) administradas a cada 10 dias após a primeira dose de uretana (UUCTXM), além dos respectivos controles (CM e CTXM).....	52
<b>Figura 15</b> - Lesões tumorais macroscópicas observadas em cada grupo do tratamento com uma dose única de crotoxina 10 dias após a administração de uretana .....	54
<b>Figura 16</b> - Lesões tumorais macroscópicas observadas em cada grupo do tratamento com doses múltiplas de crotoxina a cada 10 dias .....	55
<b>Figura 17</b> - Imagens representativas dos fragmentos de tecido pulmonar, evidenciando um possível efeito terapêutico no tratamento com uma dose única ou múltiplas doses de crotoxina. ....	57
<b>Figura 18</b> - Imagens representativas dos fragmentos de tecido pulmonar dos controles negativos dos grupos de tratamento com uma dose única de crotoxina (C10) e múltiplas doses (CM).....	57
<b>Figura 19</b> - Imagens representativas dos fragmentos de tecido pulmonar dos grupos de tratamento com uma dose única de crotoxina (CTX10) e múltiplas doses (CTXM) .....	58
<b>Figura 20</b> - Imagens representativas dos fragmentos de tecido pulmonar do grupo de tratamento UU, controle positivo para tumorigênese induzida por uretana .....	59
<b>Figura 21</b> - Imagens representativas dos fragmentos de tecido pulmonar do grupo tratado com múltiplas doses de crotoxina (UUCTXM).....	60
<b>Figura 22</b> - Imagens representativas dos fragmentos de tecido pulmonar do grupo tratado com uma dose única de crotoxina (UUCTX10). ....	61

<b>Figura 23</b> - A - Score patológico baseado nas métricas presentes na tabela 5. B - Gráfico referente à porcentagem (%) de área tumoral em cada um dos grupos de tratamento .....	62
<b>Figura 24</b> - Estratégia adotada para análise das células responsáveis pela resposta inflamatória, células CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> , NK <sup>+</sup> , CD11c <sup>+</sup> /MHCII <sup>+</sup> e CD11b <sup>+</sup> /F4/80 <sup>+</sup> .....	63
<b>Figura 25</b> - Análise de células T CD4 presentes nos pulmões dos animais da linhagem AIRmin com tratamento com dose única de crotoxina (16 µg/kg) e com múltiplas doses de crotoxina (8 µg/kg).....	64
<b>Figura 26</b> - Análise de células T CD8 presentes nos pulmões dos animais da linhagem AIRmin com tratamento com dose única de crotoxina (16 µg/kg) e com múltiplas doses de crotoxina (8 µg/kg).....	65
<b>Figura 27</b> - Análise de células NK presentes nos pulmões dos animais da linhagem AIRmin com tratamento com dose única de crotoxina (16 µg/kg) e com múltiplas doses de crotoxina (8 µg/kg).....	66
<b>Figura 28</b> - Análise de células neutrofílicas presentes nos pulmões dos animais da linhagem AIRmin com tratamento com dose única de crotoxina (16 µg/kg) e com múltiplas doses de crotoxina (8 µg/kg).....	66
<b>Figura 29</b> - Análise de células dendríticas presentes nos pulmões dos animais da linhagem AIRmin com tratamento com dose única de crotoxina (16 µg/kg) e com múltiplas doses de crotoxina (8 µg/kg).....	67
<b>Figura 30</b> - Análise de macrófagos presentes nos pulmões dos animais da linhagem AIRmin com tratamento com dose única de crotoxina (16 µg/kg) e com múltiplas doses de crotoxina (8 µg/kg).....	68
<b>Figura 31</b> - Expressão gênica nos pulmões dos animais da linhagem AIRmin aos 30 e 120 dias de tratamento com uma dose única de CTX e múltiplas doses de CTX..	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Descrição do tratamento realizado para cada grupo do experimento inicial .....	34
<b>Tabela 2</b> – Descrição do tratamento realizado com crotoxina contínua no segundo experimento.....	34
<b>Tabela 3</b> – Descrição do tratamento realizado com crotoxina em dose única no segundo experimento .....	35
<b>Tabela 4</b> – Sequências de primers utilizadas para análise das citocinas por RT-qPCR .....	39
<b>Tabela 5</b> – Escore patológico utilizado para a classificação das lesões presentes nos tecidos dos pulmões dos animais AIRmin. ....	40
<b>Tabela 6</b> – Diâmetro médio das lesões macroscópicas observadas nos camundongos tratados com uma dose única de crotoxina. ....	56
<b>Tabela 7</b> – Diâmetro médio das lesões macroscópicas observadas nos camundongos tratados com múltiplas doses de crotoxina.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AIR</b>	Resposta infamatória aguda
<b>AIRmax</b>	Máxima resposta inflamatória aguda
<b>AIRmin</b>	Mínima resposta inflamatória aguda
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>Csf</b>	<i>Colony-stimulating factor</i>
<b>cT</b>	<i>Cycle threshold</i>
<b>CTX</b>	Crotoxina
<b>DC</b>	Células dendríticas
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>FVS</b>	<i>Fixable viability stain</i>
<b>GDP</b>	Guanosina difosfato
<b>G-MDSC</b>	<i>Granulocyte - Myeloid-derived supressor cells</i>
<b>GTP</b>	Trifosfato de guanosina
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleucina
<b>KRAS</b>	<i>Kirsten rat sarcoma virus</i>
<b>MDSC</b>	Células mieloderivadas supressoras
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>NK</b>	<i>Natural Killers</i>
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
<b>Pas</b>	<i>Pulmonary adenoma susceptibillity</i>
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>PMN-MDSC</b>	<i>Polymorphonuclear - Myeloid-derived supressor cells</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i>
<b>RT-qPCR</b>	<i>Reverse transcription - Quantitative polymerase chain reaction</i>

<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>TAM</b>	<i>Tumor-associated macrophages</i>
<b>TGF</b>	<i>Transforming growth factor</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor necrosis factor</i>
<b>URT</b>	Uretana
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
1.1	Inflamação e Câncer .....	20
1.2	Microambiente tumoral.....	23
1.3	Uretana (URT) e Gene kras .....	26
1.4	Crotoxina (CTX).....	28
1.5	Camundongos AIRmax e AIRmin.....	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
3.1	Camundongos .....	33
3.2	Determinação da DL50.....	33
3.3	Indução de tumor e grupos de tratamento .....	33
3.4	Extração dos pulmões .....	35
3.5	Quantificação das lesões tumorais .....	35
3.6	Obtenção das células do pulmão .....	35
3.7	Imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	36
3.8	Expressão gênica por RT-qPCR.....	37
3.8.1	Extração de mRNA .....	37
3.8.2	Síntese de cDNA .....	38
3.8.3	RT-qPCR.....	38
3.9	Análises histológicas do pulmão.....	40
3.10	Análise estatística.....	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
4.1	Modulação da carcinogênese pulmonar induzida por uretana por meio da administração de crotoxina (8 µg/kg) 10 dias após a administração do carcinógeno .....	41

4.1.1	Análise fenotípica da tumorigênese .....	41
4.1.2	Análises histológicas dos pulmões .....	43
4.1.3	Imunofenotipagem .....	46
<b>4.2</b>	<b>Modulação da carcinogênese pulmonar induzida por uretana por meio da administração de crotoxina (16 µg/kg) 10 dias após a administração do carcinógeno ou crotoxina (8 µg/kg) em doses múltiplas .....</b>	<b>51</b>
4.2.1	Análise fenotípica da tumorigênese .....	51
4.2.2	Análises histológicas dos pulmões .....	56
4.2.3	Imunofenotipagem .....	62
4.2.4	Expressão de gênica de citocinas.....	68
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>

# 1 INTRODUÇÃO

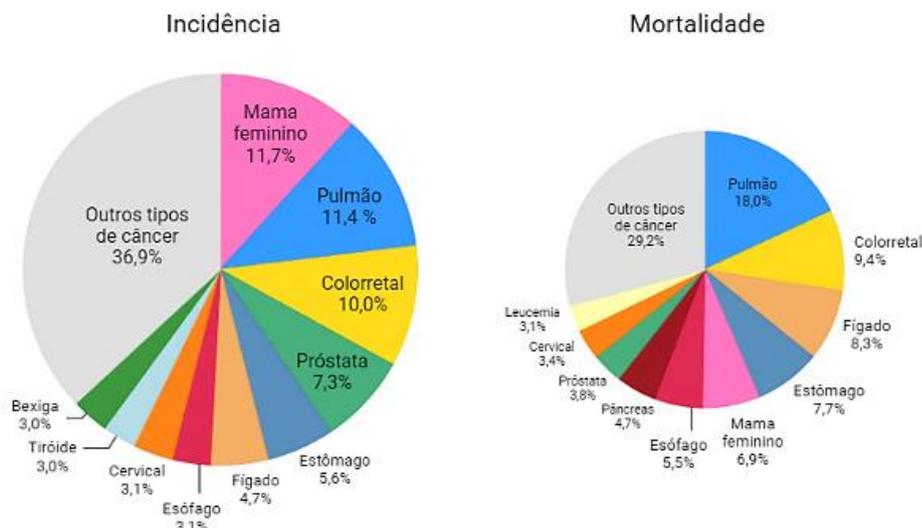
## 1.1 Inflamação e Câncer

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, assim como uma das maiores barreiras face ao aumento da expectativa de vida. É responsável pelo maior número de mortes prematuras antes dos 70 anos na maioria dos países. O seu desenvolvimento está diretamente relacionado com o processo de envelhecimento, com comportamentos prejudiciais à saúde e mudanças ambientais que, conseqüentemente, aumentam a sua incidência e mortalidade (SANTOS et al., 2023).

Em 2020, o câncer foi considerado a principal causa de morte no mundo, sendo que apenas nesse ano, foi estimada uma média de 19,3 milhões de novos casos e 10 milhões de óbitos (SUNG et al., 2021). Em 2023, são estimados cerca de 704 mil novos casos de câncer no Brasil, estando o câncer de pulmão entre os mais comuns ao longo de todos os distritos federais, sendo mais predominante no Maranhão, Piauí, Ceará, Paraíba e Pernambuco (SANTOS et al., 2023).

O câncer de pulmão é considerado o tumor maligno com maior índice de mortalidade, estando cerca de 80 a 90% dos casos deste tipo de câncer associados aos carcinógenos liberados durante o uso de tabaco, seja como fumante ativo ou passivo (NAKANO-NARUSAWA et al., 2021). Este tipo de câncer foi responsável por uma média de 1,8 milhões de mortes no mundo em 2020, se apresentando como o câncer mais comum entre homens e o terceiro mais comum em mulheres (LUO et al., 2023; SUNG et al., 2021). Apesar desta diferença entre os dois sexos, até 2035, é estimado que os casos de câncer de pulmão em mulheres aumentem, se igualando ao número de casos no sexo oposto, ou mesmo extrapolando esse número (LUO et al., 2023).

**Figura 1** – Incidência e mortalidade dos 10 tipos de cânceres mais comuns em 2020, para ambos os sexos.



**Fonte:** Modificado de SUNG et al., 2021.

A desregulação de qualquer um dos fatores envolvidos no processo inflamatório, pode levar a anormalidades, e conseqüentemente à patogênese, algo característico de uma progressão neoplásica. Numa fase inicial do processo neoplásico, as células inflamatórias, juntamente com as citocinas e quimiocinas presentes no microambiente tumoral, são promotoras tumorais bastante eficazes, produzindo um ambiente propício para o crescimento anormal de células, facilitando a instabilidade genômica e promovendo angiogênese para a manutenção da lesão neoplásica. Mais tarde, no processo tumorigênico, as células neoplásicas liberam alguns mediadores inflamatórios levando a uma inflamação crônica de forma a promover a expansão neoplásica e a metástase (COUSSENS; WERB, 2002; DUBINETT, 2015).

A inflamação é uma reação não específica da imunidade cuidadosamente regulada, que se comporta, inicialmente, como uma reação benéfica dos tecidos vascularizados a agressões físicas, químicas ou biológicas, necessária para o reparo e regeneração tecidual (IBANEZ et al., 1992). Pode ser causada por inúmeros fatores, tanto extrínsecos como intrínsecos ao câncer, onde ambos aumentam o risco de desenvolvimento neoplásico e progressão maligna, podendo resultar em imunossupressão (SINGH et al., 2019). É um processo extremamente complexo que envolve migração de células inflamatórias para o local da injúria, contribuindo na

reconstituição de um microambiente normal, no qual o agente lesivo é removido ou o tecido lesado é reparado, como descrito por Nakano-Narusawa em 2021.

Geralmente o microambiente normal é reconstituído quando se trata de uma inflamação aguda, porém, a inflamação pode se tornar crônica quando o causador da inflamação persiste ou quando os mecanismos responsáveis por eliminar a inflamação falham. Quando uma inflamação se torna crônica, pode resultar na proliferação ou mutações celulares, criando um ambiente propício ao desenvolvimento de câncer. Desta forma, existe uma relação entre a inflamação e o desenvolvimento neoplásico, estando a mesma direta ou indiretamente envolvida em diferentes fases desse processo.

Diversos fatores de risco, estão associados a alguma forma de inflamação crônica, cerca de 20% dos cânceres estão relacionados a infecções crônicas, 30% ao tabagismo e inalação de poluentes e cerca de 35% a fatores dietéticos. Sendo assim, muitas vezes são utilizadas como alvo as células responsáveis pela inflamação associadas ao câncer, em estratégias de prevenção e terapias anticancerígenas (SINGH et al., 2019). No pulmão, a inflamação é geralmente causada por patógenos ou pela exposição a alérgenos, poluentes, irritantes e toxinas que podem levar ao desenvolvimento de doenças crônicas (AEGERTER; LAMBRECHT; JAKUBZICK, 2022; MOLDOVEANU et al., 2009).

É essencial o desenvolvimento de novos estudos e elaboração de estratégias de tratamento baseadas na inibição da inflamação associada ao câncer, assim como, estratégias para melhorar a qualidade do ar e redução do uso de tabaco, tanto no Brasil como a nível mundial, de modo a reduzir a incidência e mortalidade do câncer de pulmão (NAKANO-NARUSAWA et al., 2021).

## 1.2 Microambiente tumoral

Os cânceres desenvolvem-se de estados pré-neoplásicos resultantes de alterações somáticas causadas por substâncias carcinogênicas virais ou químicas. Estes estados são inicialmente alterações irreversíveis no DNA que persistem em tecido normal, no entanto, mutações genéticas isoladamente, apesar de serem transformações malignas, não são suficientes para a formação tumoral, sendo necessário um segundo estímulo para o desenvolvimento neoplásico, como um processo inflamatório instalado (NAKANO-NARUSAWA et al., 2021). Após o segundo estímulo, é induzida proliferação celular, recrutamento de células inflamatórias e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – Reactive Oxygen Species) resultando em lesões no DNA e reduzindo o seu reparo, levando ao desenvolvimento de câncer (COUSSENS; WERB, 2002).

As principais células efetoras da imunidade inata são os neutrófilos, os macrófagos e as células NK (Natural Killers). Os macrófagos e os neutrófilos fagocíticos realizam a defesa contra bactérias por meio de receptores de superfície denominados PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) que são capazes de reconhecer e ligar constituintes comuns a muitas superfícies microbianas. Essas células da imunidade inata secretam citocinas e quimiocinas que atraem os neutrófilos e os monócitos da corrente sanguínea e estimulam uma resposta inflamatória aguda (AIR - Acute inflammatory reaction) ou evolui para uma cronicidade (GORDON, 2002; LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002).

No microambiente tumoral podemos encontrar uma variedade de células inflamatórias, no qual a sua presença poderá influenciar o desenvolvimento neoplásico. As células mieloides têm um papel importante no reconhecimento de patógenos e na resposta imune inata e, a sua função no desenvolvimento tumoral ocorre através de interações diretas e indiretas com as células tumorais (DENG; FLEMING, 2022).

Os macrófagos são formados pela diferenciação dos monócitos após uma lesão no tecido, infecção ou inflamação, com o intuito de remover o agente lesivo e manter a integridade do tecido. Podem ser divididos em 2 subgrupos: macrófagos M1, associados a um efeito pró-inflamatório, e macrófagos M2, associados a um efeito

anti-inflamatório. Num câncer, os macrófagos associados a tumores (TAMs – Tumor-associated macrophages), podem alterar o seu estado, dependendo dos fatores presentes no microambiente tumoral. TAMs M1 podem ser inicialmente ativados pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) ou outros fatores, levando ao recrutamento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e células NK com o intuito de eliminar células tumorais. Já durante a progressão tumoral os TAMs podem também alterar o seu estado para um efeito anti-inflamatório M2 após exposição a algumas citocinas presentes no microambiente tumoral, como a interleucina 10 (IL-10) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ). O TGF- $\beta$  também inibe células T citotóxicas e as células NK, que contribuíram para uma resposta imune antitumoral. Sendo assim, os TAMs estão envolvidos tanto direta como indiretamente no desenvolvimento neoplásico através da promoção da angiogênese, evasão e metástase (DENG; FLEMING, 2022; DUAN; LUO, 2021; SINGH et al., 2019). As citocinas liberadas por TAMs M1 apresentam um efeito antitumoral, no entanto, as citocinas imunossupressoras liberadas por TAMs M2 resultam na inibição de células T citotóxicas, promovendo a progressão tumoral (DENG; FLEMING, 2022).

As células dendríticas (DCs – Dendritic cells) também são células apresentadoras de antígeno, no entanto, alguns estudos sugerem que as mesmas, exibem um efeito oposto aos TAMs na progressão neoplásica. As células dendríticas associadas ao tumor são encontradas no microambiente tumoral de diferentes tipos de câncer, como o de pulmão, e o seu efeito depende da fase do tumor, inicial ou avançada. Estudos recentes sugerem que as células maduras deste tipo numa fase inicial do tumor, apresentam um efeito antitumoral, porém, num estado avançado, um maior número de células imaturas mostrou promover a progressão maligna tumoral (DENG; FLEMING, 2022).

Os neutrófilos são células inflamatórias que compõem a primeira linha de defesa contra patógenos e em resposta a agentes químicos ou físicos, tendo a capacidade de suprimir ou promover o crescimento tumoral, dependendo da sua função (ANDERSON; SIMON, 2020). Quando associados ao desenvolvimento neoplásico, podem ser divididos em dois subgrupos, N1 associados a um fenótipo antitumoral e N2, no qual existe um fenótipo pró-tumoral. Os neutrófilos N1 liberam citocinas pró-inflamatórias, que facilitam o recrutamento e ativação de linfócitos T

CD8. Contrariamente, os neutrófilos N2 promovem a angiogênese e metástase. Na presença de TGF- $\beta$ , os neutrófilos são polarizados para o fenótipo N2, enquanto o bloqueio de TGF- $\beta$  facilita o desenvolvimento dos neutrófilos num fenótipo N1 (DENG; FLEMING, 2022; QUAIL et al., 2022). Numa fase aguda, os neutrófilos são recrutados para o microambiente tumoral e promovem a inflamação, resultando em apoptose das células tumorais, já num processo crônico, onde o tumor já está em desenvolvimento, a presença de neutrófilos irá promover o seu crescimento e progressão tumoral (ANDERSON; SIMON, 2020).

As células mieloides supressoras (MDSC – Myeloid-derived suppressor cells) originam-se quando células mieloides progenitoras falham em se diferenciar na sua forma madura final, algo que pode acontecer em várias condições patológicas como em neoplasias. Estas células possuem características de neutrófilos ou macrófagos e apresentam função imunossupressora por meio do consumo de arginina do meio, impedindo a ativação de células do sistema imune sobretudo as células T citotóxicas, T CD8 (MIRET et al., 2019). A presença de MDSCs revela um prognóstico não favorável, uma vez que estas células são capazes de estimular a produção de IL-10 e induzir a transformação de TAMs M1 em M2, inibindo assim as respostas imunes e promovendo a progressão tumoral (DENG; FLEMING, 2022). Adicionalmente, a sua função imunossupressora, favorece o crescimento tumoral através da supressão da atividade dos linfócitos T citotóxicos, mediando a imunossupressão do tumor (TSUBAKI et al., 2018).

Os linfócitos T CD4 são elementos importantes na regulação da resposta imune, podendo ser diferenciados em linfócitos T CD4 auxiliares, geralmente associados a um prognóstico tumoral promissor em vários tipos de cânceres, e em linfócitos T regulatórios (Treg), imunossupressores e que favorecem a progressão e desenvolvimento tumoral pela diminuição das respostas imunes antitumorais. Os linfócitos T CD8 são células citotóxicas que eliminam células cancerígenas, suprimem a angiogênese, e estão geralmente associadas a um prognóstico positivo em pacientes com câncer (ANDERSON; SIMON, 2020).

O microambiente tumoral é um sistema bastante complexo rico em interações celulares capazes de suprimir ou promover o desenvolvimento tumoral. Desta forma,

é crucial o desenvolvimento de estudos *in vivo* para uma melhor compreensão destas interações e para a seleção de novos alvos terapêuticos na luta contra o câncer.

### 1.3 Uretana (URT) e Gene *kras*

Os camundongos são considerados modelos adequados para o estudo experimental de câncer, uma vez que, permitem simular mecanismos importantes de tumores humanos (KWON; BERNIS, 2013). Os adenocarcinomas pulmonares humanos, no que concerne à resposta a carcinogênicos químicos ou indução genética com oncogenes como o gene KRAS (Kirsten Rat Sarcoma Virus), assemelham-se geneticamente e histologicamente a adenocarcinomas pulmonares de camundongo. Os adenocarcinomas podem ser induzidos quimicamente nesses animais, permitindo o estudo dos mecanismos envolvidos na formação do tumor (SOZIO et al., 2021).

A uretana (carbamato de etila) é um composto utilizado para indução de tumor experimental em camundongo, sendo o pulmão um órgão particularmente suscetível a esse composto. A uretana é um éster etílico de ácido carbâmico produzido espontaneamente durante o processo de fermentação pela reação de ureia com álcool. Pode ser encontrado em alimentos fermentados e em bebidas alcoólicas, sendo também encontrado como um composto natural do tabaco (SOZIO et al., 2021).

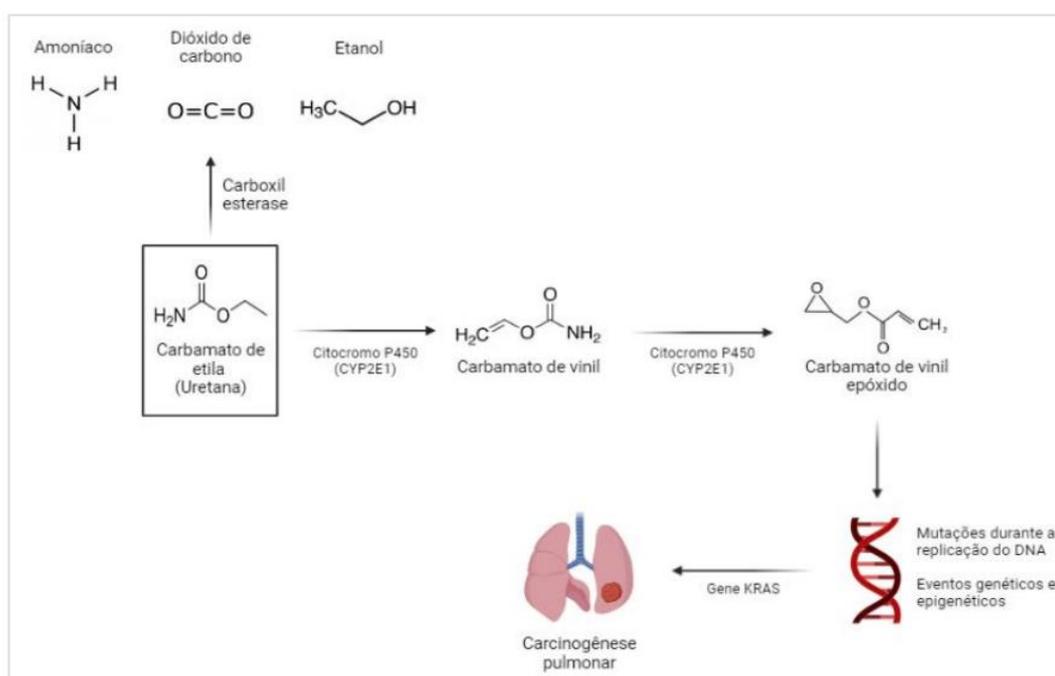
Durante a metabolização da uretana (Figura 2), ocorrem mutações que resultam no desenvolvimento de carcinogênese pulmonar. Em camundongos, quando existe exposição a este composto, o principal gene responsável pela indução de tumores é o gene *kras* (SOZIO et al., 2021). Adicionalmente, na indução química de tumores pulmonares, a ativação do gene *kras* é um dos principais eventos iniciais que ocorrem no processo neoplásico (WAKAMATSU et al., 2007).

O locus *pas1* (Pulmonary adenoma susceptibility 1), encontra-se no cromossomo 6 do camundongo, e é o principal locus responsável pela predisposição genética ao tumor pulmonar em camundongos (DASSANO et al., 2014; MARIA et al., 2003). Entre os genes mapeados nesse locus, são propostos como principais candidatos reguladores da sensibilidade à tumorigênese pulmonar: *casc1*, *kras2*, *lmp*, *iftd1* e *lasc1* (DASSANO et al., 2014; LIU et al., 2006). No entanto, o gene *kras* é

considerado o principal candidato para a função do *pas1*, uma vez que existem evidências substanciais que apoiam o seu envolvimento como principal efector neste locus.

O gene *kras* está envolvido na divisão, diferenciação e apoptose celular. É considerado um oncogene, logo, quando sofre mutações, tem o potencial de tornar células normais em células cancerígenas. Essas mutações são somáticas, ou seja, são adquiridas ao longo da vida de uma pessoa, não são hereditárias, e estão presentes apenas em células tumorais. O gene *kras* codifica a proteína K-Ras que é uma GTPase que converte a molécula de GTP (trifosfato de guanosina) em GDP (guanossina difosfato). Quando essa proteína é constantemente ativada resulta em mutações, e conseqüentemente, leva a uma proliferação celular descontrolada, ocasionando formação de tumor. Mutações no gene *kras* podem ser encontradas em mais de 30% dos casos de câncer, sendo frequentemente associadas à exposição ao tabaco (NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2017; PEREIRA et al., 2022).

**Figura 2** - Metabolização da uretana em camundongos. Pequenas quantidades de uretana são transformadas em carbamato de vinil pela atividade da enzima CYP2E1 no Citocromo P450, resultando na formação de carbamato de vinil epóxido que se liga covalentemente ao DNA, podendo resultar na incorporação incorreta de bases durante a replicação de DNA e, conseqüentemente, a mutações pontuais. Mutações genéticas e eventos epigenéticos contribuem para o desenvolvimento e progressão da carcinogênese pulmonar.



**Fonte:** Modificado de SOZIO et al., 2021.

## 1.4 Crotoxina (CTX)

As serpentes do gênero *Crotalus*, conhecidas popularmente como cascavéis, distribuem-se de forma irregular pelo território brasileiro. Pertencem à família *Viperidae* e existem cerca de 70 espécies e subespécies. Estas serpentes são responsáveis por aproximadamente 7,7% dos acidentes ofídicos brasileiros e dentro do coeficiente de letalidade, elas apresentam o maior entre os demais acidentes ofídicos. Em 2017, as serpentes deste gênero foram responsáveis por 2503 casos de envenenamento, com uma letalidade de 0,71% (CRUZ; VARGAS; LOPES, 2009; FRARE et al., 2019; PINHO; PEREIRA, 2001).

Em um envenenamento por picada de cascavel, o local da injúria muitas vezes não se apresenta dolorido ou com uma lesão evidente. Os sintomas geralmente apresentados são formigamento, sonolência, visão turva ou dupla, mal-estar, náuseas e cefaleia, acompanhadas por dores musculares generalizadas e urina escura em casos graves, levando a insuficiência renal aguda, uma das principais causas da sua letalidade (PINHO; PEREIRA, 2001).

Entre as espécies deste gênero, a subespécie *Crotalus durissus terrificus* está frequentemente associada a acidentes ofídicos no Brasil. O veneno desta subespécie contém uma variedade de toxinas, como a crotoxina, crotamina, giroxina e convulxina (CRUZ; VARGAS; LOPES, 2009; FRARE et al., 2019).

A CTX é o principal componente do veneno da cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) correspondendo a 60% da composição total do mesmo e é responsável por sua grande toxicidade (SARTIM; MENALDO; SAMPAIO, 2018). É composta por uma subunidade não-tóxica, ácida e enzimaticamente inativa, a crotapotina (CA), e por uma fosfolipase A2 (PLA2) ligeiramente tóxica, básica e com alta atividade enzimática (CB) (CARDOSO et al., 2001; FRARE et al., 2019; FREITAS et al., 2018). De acordo com alguns autores, a CTX apresenta propriedades anti-inflamatórias (ALMEIDA et al., 2023; NUNES et al., 2010) e antitumorais (ALMEIDA et al., 2023; WANG et al., 2014; YE et al., 2011), assim como ação imunomoduladora (FREITAS et al., 2018), neurotóxica e miotóxica (MEDIONI et al., 2017; SANT'ANA MALAQUE; GUTIÉRREZ, 2015).

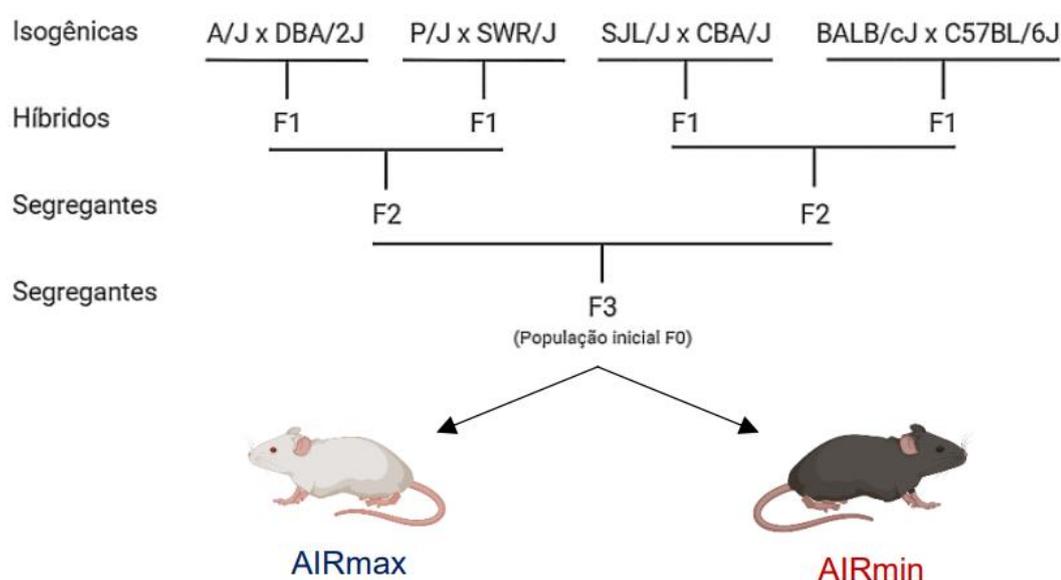
A ação antitumoral da CTX tem sido sugerida recentemente em vários estudos. Em relação ao pulmão, por exemplo, a CTX atua *in vitro* inibindo o crescimento de células de adenocarcinoma pulmonar humano SPCA-1 pelo bloqueio da sua fase G1. Neste estudo, a CTX inibiu o crescimento celular e potencializou a atividade antitumoral de Iressa® (gefitinib), um inibidor do receptor do fator epidérmico de crescimento, atualmente utilizado como terapia contra o câncer de pulmão (WANG et al., 2014). Em células de adenocarcinoma de pulmão humano, A549, a CTX também inibiu seu crescimento *in vitro*, assim como demonstrou efeitos antiangiogênicos *in vivo* em modelo de xenoenxerto que resultaram na inibição do crescimento tumoral (YE et al., 2011). Em células humanas de carcinoma pulmonar SK-MES-1, também se observou uma ação antitumoral *in vitro* por parte da CTX através da ativação da via de sinalização p38MAPK, no qual a mesma induziu a apoptose e autofagia celular (HAN et al., 2014).

Nos estudos mencionados, apesar de serem observados efeitos antitumorais da CTX *in vitro*, induzindo apoptose celular e inibindo o crescimento e proliferação de células tumorais, os mesmos ainda não são conclusivos devido à complexidade nas interações da CTX e necessidade de serem reproduzidos *in vivo*. Foram realizados alguns estudos clínicos de fase I, no entanto, estes também apresentam resultados variáveis e não conclusivos em relação ao efeito da CTX no câncer, assim como algumas dificuldades em relação ao ajustamento da dose aplicada nos pacientes devido à grande toxicidade característica desta toxina (CURA et al., 2002; MEDIONI et al., 2017).

## 1.5 Camundongos AIRmax e AIRmin

Linhagens de camundongos AIRmax e AIRmin foram fenotipicamente selecionadas no laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan a partir de uma população geneticamente heterogênea produzida pelo cruzamento entre oito linhagens isogênicas, conforme o diagrama a seguir:

**Figura 3** - Diagrama representativo do modelo de cruzamento utilizado para obtenção da população inicial F0.



**Fonte:** Modificado de IBANEZ et al., 1992.

Cada indivíduo herdou da população F0 a combinação aleatória de 12,5% do *pool* genético de cada linhagem isogênica parental. O processo de seleção foi feito com base no fenótipo da reação inflamatória aguda induzida por Biogel P100 (partículas de poliacrilamida) injetado subcutaneamente no dorso do animal e avaliado 24 horas após a injeção. Foram determinados o número e a morfologia das células do infiltrado, além do conteúdo proteico. Desse modo, a população F0 apresentou uma grande variabilidade fenotípica obedecendo a uma curva de distribuição normal de frequências (IBANEZ et al., 1992; STIFFEL et al., 1990).

Para o processo de seleção, foram acasalados os animais situados nos extremos opostos da curva de distribuição, consoante a intensidade da resposta

inflamatória aguda máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin). O processo de seleção foi realizado até ao limite de 20 gerações, quando todos os alelos responsáveis pelo caráter de inflamação aguda fixaram-se em homozigose, resultando na obtenção de duas linhagens heterogêneas, AIRmax e AIRmin.

Considerando a susceptibilidade à tumorigênese, os camundongos AIRmax são em geral mais resistentes do que os AIRmin no que concerne ao desenvolvimento de tumor de pulmão induzido por uretana. Essas linhagens diferem grandemente na sua susceptibilidade, no qual, após setenta dias de tratamento, 100% dos camundongos AIRmin desenvolvem lesões tumorais no pulmão, enquanto na linhagem AIRmax apenas alguns camundongos desenvolveram pequenos adenomas pulmonares (RIBEIRO et al., 2005).

Em estudos de associação fenotípica entre a intensidade de inflamação e a multiplicidade de lesões tumorais realizado em populações de segregantes F2, verificou-se uma correlação inversa entre esses dois fenótipos, e por serem duas características reguladas poligeneticamente, tal correlação sugere ligação funcional entre AIR e tumorigênese (RIBEIRO et al., 2005).

Alguns estudos mostram que o locus *pas1* está também relacionado com os dois fenótipos de resposta inflamatória aguda, sugerindo que alelos de efeitos opostos tenham sido fixados diferencialmente nesse locus durante o processo de seleção. Neste caso, o alelo de suscetibilidade (*pas1<sup>s</sup>*) na linhagem AIRmin, e o alelo de resistência (*pas1<sup>r</sup>*) na linhagem AIRmax, apontam para um envolvimento do *pas1* na regulação da AIR (MARIA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2005).

Esses camundongos possuem um background genético heterogêneo, porém são homozigotos para os *loci* onde se encontram os genes reguladores da resposta inflamatória aguda, portanto constituem um modelo adequado para o estudo de modulação da carcinogênese pulmonar pela CTX. As características genéticas únicas dessas linhagens AIRmax e AIRmin, torna possível, uma representação com maior fidelidade de uma população geneticamente heterogênea como é a humana, possibilitando estudos translacionais futuros.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi o de avaliar a ação sistêmica da crotoxina como agente modulador do desenvolvimento da carcinogênese pulmonar quimicamente induzida por URT nas linhagens de camundongos AIRmin e AIRmax. Para isso, nos propomos a realizar:

1. A análise do fenótipo de resistência ou susceptibilidade das linhagens AIRmax e AIRmin ao longo de 120 dias de tratamento por meio da avaliação da incidência e multiplicidade de lesões;
2. A identificação das populações celulares presentes no parênquima pulmonar;
3. A avaliação histopatológica dos tecidos pulmonares, considerando o seu aspecto morfológico, inflamatório e classificação tumoral;
4. A avaliação da expressão gênica de citocinas, de modo a ter um melhor entendimento dos mecanismos operantes no câncer.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Camundongos**

Foram utilizados camundongos machos AIRmin e AIRmax de 8 a 12 semanas de idade, mantidos no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Os camundongos receberam dieta industrializada e água ad libitum. Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação animal do Instituto Butantan (CEUA nº 5563300921).

#### **3.2 Determinação da DL50**

A determinação da DL50 da crotoxina por via intraperitoneal foi realizada em animais AIRmax e AIRmin pelo grupo do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Os camundongos foram tratados com diferentes concentrações de crotoxina ao longo de 7 dias, sendo estabelecida em 80 µg/kg de peso corpóreo. No presente estudo experimental de modulação, utilizou-se 0,1 e 0,2 da DL50 que corresponde a 8 e 16 µg/kg, respectivamente, para as duas linhagens. Não foram verificados efeitos tóxicos aparentes nessas doses.

#### **3.3 Indução de tumor e grupos de tratamento**

Para identificar um possível mecanismo de regulação da CTX na carcinogênese pulmonar quimicamente induzida por URT, foram realizados dois experimentos com diferentes grupos de tratamento e doses de crotoxina.

No experimento inicial, foi induzido tumor nos camundongos AIRmax e AIRmin por administração de URT por via intraperitoneal (1000 mg/kg) em duas doses com um intervalo de 48h entre elas. Cada grupo foi composto por 5 animais de cada linhagem e avaliados aos 30, 60 e 120 dias após a administração da primeira dose de URT. A dose aplicada de crotoxina intraperitoneal foi de 0,1 da DL50 que corresponde

a 8µg/kg. Os camundongos foram divididos em grupos de tratamento, conforme a tabela seguinte:

**Tabela 1** – Descrição do tratamento realizado para cada grupo do experimento inicial. C – Controle; CTX – Crotoxina; UU – Uretana + Uretana; UUCTX10 – Uretana + Uretana + Crotoxina 10 dias.

Grupo	Tratamento
C	Controle (Sem tratamento)
CTX	Dose única de CTX
UU	2 doses de URT com um intervalo de 48h
UUCTX10	2 doses de URT com um intervalo de 48h + CTX 10 dias após a primeira dose de URT

Fonte: próprio autor, 2023.

No segundo experimento realizado, foi induzido tumor apenas nos animais AIRmin, sensíveis à tumorigênese, também por meio da administração de URT por via intraperitoneal (1000 mg/kg) em duas doses com um intervalo de 48h. Neste experimento, foram realizados tratamentos com crotoxina diferentes, no primeiro tratamento (Tabela 2), foi aplicada uma dose contínua de crotoxina intraperitoneal, de 10 em 10 dias, no qual foi aplicada 0,1 da DL50 (8µg/kg). No segundo tratamento (Tabela 3), foi aplicada uma dose única de CTX intraperitoneal, 10 dias após a administração de URT, sendo aplicada 0,2 da DL50 (16µg/kg). Os grupos CM, C10, CTX10 e CTXM foram compostos por 4 camundongos e os grupos UU, UUCTXM e UUCTX10 por 9 camundongos.

**Tabela 2** – Descrição do tratamento realizado com crotoxina contínua no segundo experimento. CM – Controle (PBS); CTXM – Crotoxina Múltipla; UU – Uretana + Uretana; UUCTXM – Uretana + Uretana + Crotoxina Múltipla.

Grupo	Tratamento
CM	Controle (PBS de 10 em 10 dias)
CTXM	CTX de 10 em 10 dias
UU	2 doses de URT com um intervalo de 48h
UUCTXM	2 doses de URT com um intervalo de 48h + CTX de 10 em 10 dias

Fonte: próprio autor, 2023.

**Tabela 3** – Descrição do tratamento realizado com crotoxina em dose única no segundo experimento. C10 – Controle (PBS); CTX10 – Crotoxina; UU – Uretana + Uretana; UUCTX10 – Uretana + Uretana + Crotoxina.

<b>Grupo</b>	<b>Tratamento</b>
C10	Controle (PBS)
CTX10	Dose única de CTX
UU	2 doses de URT com um intervalo de 48h
UUCTX10	2 doses de URT com um intervalo de 48h + CTX 10 dias após a primeira dose de URT

**Fonte:** próprio autor, 2023.

### **3.4 Extração dos pulmões**

Para a realização das análises de 30, 60 e 120 dias, os animais foram eutanasiados pela administração intraperitoneal de uma solução composta por Ketamina (300 mg/kg) e Xilazina (30 mg/kg). Após eutanásia, procedeu-se à extração dos pulmões. Para extração dos pulmões, foi realizada uma perfusão de 10 mL de PBS suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) através do ventrículo direito do coração, para lavagem. Em seguida, os pulmões foram extraídos e os lobos separados para uma melhor observação e quantificação das lesões tumorais.

### **3.5 Quantificação das lesões tumorais**

A quantificação de lesões tumorais foi realizada macroscopicamente, logo após a extração dos pulmões, com auxílio de uma lupa. A lavagem dos pulmões com a solução de PBS 10% SFB, permitindo uma melhor visualização das lesões. O número total de lesões em cada pulmão foi registrado e utilizado para a realização dos gráficos de multiplicidade e incidência.

### **3.6 Obtenção das células do pulmão**

Fragmentos dos pulmões extraídos foram colocados em placas de Petri e picotados com o auxílio de uma pinça e tesoura. Foram adicionados 3mL de

colagenase tipo I (Sigma) na concentração de 0,50 mg/mL e incubados por 40 minutos a 37°C em estufa. Para inibição da ação da colagenase, o conteúdo foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL juntamente com 10 mL de PBS com 20% SFB. Em seguida, todo o conteúdo foi transferido para outro tubo Falcon de 50 mL, passando por um filtro. O tecido foi homogenizado e, em seguida, o conteúdo foi passado por um filtro de nylon 70 µm previamente lavado com 1 mL de PBS 10% SFB para retirada dos debris celulares. As hemácias presentes na suspensão celular foram lisadas com tampão de lise (4,15 g de cloreto de amônia, 0,84 g de bicarbonato de sódio, 1 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0) por 5 minutos a 37°C em banho-maria. As amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 1200 rpm, a uma temperatura de 4°C. O pellet foi ressuspenso em 1 mL de PBS 10% SFB e a concentração celular foi determinada por contagem em Câmara Hemocitométrica de Malassez.

### **3.7 Imunofenotipagem por citometria de fluxo**

Foram identificadas as diferentes populações de células obtidas dos pulmões por citometria de fluxo. Inicialmente, as suspensões celulares ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas durante 15 minutos em temperatura ambiente com FVS – Pacific Blue (Fixable Viability Stain), a uma concentração de 1:1000 diluído em PBS. Em seguida, as suspensões foram lavadas, adicionando-se 100 µL de PBS 2% SFB e a placa foi centrifugada a 1200 rpm por 5 minutos. Para evitar ligações inespecíficas, as células foram incubadas com 10 µL de anti-CD16/CD32 (Clone 93 – FC Block) durante 10 minutos a uma temperatura de 4°C e lavadas, como citado anteriormente. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos específicos acoplados a fluorocromos, considerando as diferentes análises. Para neutrófilos e células mieloides, foram utilizados anticorpos dirigidos às moléculas GR1-FITC (clone RB6-8C5), CD11b-PE (clone M1/80) e CD38-APC (clone 90), e para as células NK, T CD8 e T CD4, anticorpos dirigidos às moléculas NK-PE (clone GL3), CD8-APC (clone 53-6.7) e CD4-FITC (clone RM4-5), respectivamente, diluídos em PBS 2% SFB e incubados durante 30 minutos a 4°C no escuro. Foi ainda realizada a marcação para identificação de células dendríticas, no qual foram utilizados anticorpos dirigidos às moléculas CD11c-PE-Cy7 (clone HL3) e MHCII-APC (clone M5/114.15.2), e para a identificação de macrófagos, por meio dos anticorpos dirigidos às moléculas CD11b-

PE (clone M1/70) e F4/80-Alexa Fluor 488 (clone T45-2342). Todas as amostras foram também marcadas com CD45 para identificação de células leucocitárias. As células foram analisadas em citômetro de fluxo FACS Canto II (BD), considerando 20000 eventos, e as análises realizadas no programa FlowJo® (Tree Star) V.10.

### **3.8 Expressão gênica por RT-qPCR**

Após a extração dos pulmões, foram armazenados os seus fragmentos em 1 mL de RNA *latter* e armazenados a -20°C para processamento. Mais tarde, para avaliação da expressão gênica de citocinas presentes nos pulmões dos animais analisados, estes foram pesados. Seguidamente, foi realizada a extração de RNA mensageiro (mRNA), a síntese de DNA complementar (cDNA) e a amplificação das sequências de primers de interesse por RT-qPCR (Reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction).

#### **3.8.1 Extração de mRNA**

Para extração de mRNA, os fragmentos de pulmão foram lisados com recurso de aparelho TissueLyser, juntamente com tampão de Lise e  $\beta$ -mercaptoetanol. Seguidamente, o lisado foi filtrado de modo a reduzir a viscosidade. As amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 11000xg, e passadas por uma coluna para retenção do RNA. Foram acrescentados 95  $\mu$ L de DNase diluída em tampão, seguido de uma incubação por 10 minutos. Por fim, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 11000xg. O lisado, passado pela coluna, foi quantificado pelo aparelho espectrofotômetro NanoVue® e foi realizada a análise de integridade no aparelho Bioanalyzer®. Todo este processo foi realizado com recurso ao RNAspin Mini (Kit GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. Até ao momento de uso, as amostras foram mantidas a -80°C, de modo a evitar a sua degradação.

### 3.8.2 Síntese de cDNA

O cDNA foi obtido a partir do mRNA extraído. Para isso, a 1 µg de RNA obtido foram adicionados 12 µL de uma solução composta por: tampão 5x (Fermentas, EUA), dNTP 10mM (Fermentas, EUA), random primers (Invitrogen, EUA), OLigoDT primers (Invitrogen, EUA), RNase inhibitor cloned 10 U/µL (Fermentas, EUA) e RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase 200 U/µL (Fermentas, EUA) em água autoclavada. As amostras foram incubadas em aparelho termociclador MJ Research PTC 200, durante 5 minutos a 65°C, durante 1 hora a 50°C, e por fim, durante 15 minutos a 70°C. Seguidamente, as mesmas foram armazenadas a -20°C até utilização.

### 3.8.3 RT-qPCR

Para avaliar a expressão de citocinas por RT-qPCR, foram utilizadas sequências de *primers* sense e antisense (Tabela 4) específicas para as citocinas *Csf2* (Colony-stimulating factor 2), *Ifn-γ* (Interferon gamma), *Il-1β* (Interleukin-1 beta), *Il-6* (Interleukin-6), *Il-10* (Interleukin-10), *Il-17* (Interleukin-17), *Tnf-α* (Tumor necrosis factor alpha), *Tgf-β* (Transforming growth factor beta) e *Vegf* (Vascular Endothelial Growth Factor), assim como para o gene constitutivo Ciclofilina, utilizado como controle positivo, expressa em todas as células de mamífero.

**Tabela 4** – Sequências de *primers* utilizadas para análise das citocinas por RT-qPCR.

Iniciadores	Sequências	
<i>Csf2</i>	5' TGAACCTCCTGGATGACATG 3'	5' GTGTTTCACAGTCCGTTTCC 3'
<i>lfn-y</i>	5' GCTCTGAGACAATGAACGCT 3'	5' AAAGAGATAATCTGGCTCTGC 3'
<i>Il1-β</i>	5' AGATGAAGGGCTGCTTCCAAACC 3'	5' TTGTTGATGTGCTGCTGCGAGA 3'
<i>Il-6</i>	5' GTTCTCTGGGAAATCGTGGA 3'	5' TGTACTCCAGGTAGCTATGG 3'
<i>Il-10</i>	5' GCTGGACAACATACTGCTAACC 3'	5' CCCAAGTAACCCTTAAAGTCCTG 3'
<i>Il-17</i>	5' GCGTGTCCAAACACTGAGGCCA 3'	5' ATTGCGGTGGAGAGTCCAGGGT 3'
<i>Tnf-α</i>	5' TCTCATCAGTTCTATGGCCC 3'	5' GGGAGTAGACAAGGTACAAC 3'
<i>Tgf-β</i>	5' ACCGCAACAACGCCATCTAT 3'	5' GTAACGCCAGGAATTGTTGC 3'
<i>Vegf</i>	5' AGTCCCATGAAGTGATCAAGTTCA 3'	5' ATCCGCATGATCTGCATGG 3'
Ciclofilina	5' AGCGTTTTGGGTCCAGGAAT 3'	5' AAATGCCCGCAAGTCAAAAG 3'

**Fonte:** próprio autor, 2023.

A cada amostra foi adicionada uma solução contendo os *primers*, Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems®) e água, de modo a ajustar o volume final das soluções. As reações foram incubadas no termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems®).

Os resultados foram analisados no StepOne Software v.2.3 e a cada amostra foi atribuído um valor de cT (Cycle Threshold), isto é, o número de ciclos necessários para que a fluorescência ultrapasse o *threshold*. Para quantificar os resultados obtidos pelo RT-qPCR utilizamos o Método do Threshold Comparativo (GIULIETTI et al., 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Neste método, fórmulas aritméticas são usadas para calcular níveis de expressão tendo como referência um calibrador, que pode ser uma amostra controle. A quantidade do gene alvo, normalizado por um gene endógeno e relativo à amostra que serve como calibrador, é dada pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , no qual  $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ (amostra)} - \Delta Ct \text{ (calibrador)})$ , e o  $\Delta Ct = (Ct \text{ (gene constitutivo)} - Ct \text{ (gene alvo)})$ . Desta forma, a equação representa a expressão normalizada da amostra calibradora.

### 3.9 Análises histológicas do pulmão

Os fragmentos dos pulmões extraídos foram fixados em formaldeído a 10% e processados: os fragmentos foram desidratados, diafanizados, embebidos em parafina e cortados em micrótomo (Leica) para uma espessura de 5  $\mu\text{m}$ . Seguidamente, as amostras foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E). Para a análise histopatológica, os tecidos ou células anormais foram classificados com base nas alterações observadas nas lesões pré-malignas e malignas, seguindo a seguinte métrica:

**Tabela 5** – Escore patológico utilizado para a classificação das lesões presentes nos tecidos dos pulmões dos animais AIRmin.

Score	Descrição
0	Tecido normal
1	Inflamação crônica, ulceração, atrofia ou hiperplasia
2	Atipia celular, metaplasia ou células em estágio de mitose
3	Displasia
4 - 5	Carcinoma positivo

Fonte: próprio autor, 2023.

A evolução da tumorigênese, bem como a ocorrência de lesões pré-cancerosas e cancerígenas no tecido pulmonar dos camundongos da linhagem AIRmin foram comparados nos diferentes tratamentos. As análises foram feitas por um patologista certificado e as cegas.

### 3.10 Análise estatística

As significâncias entre as médias de cada grupo foram calculadas por meio do teste ANOVA (GraphPad InStat), seguido de teste de Tukey. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $\bar{x} \pm \text{EPM}$ ) e as diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$  bicaudal.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Modulação da carcinogênese pulmonar induzida por uretana por meio da administração de crotoxina (8 µg/kg) 10 dias após a administração do carcinógeno

Numa abordagem inicial, avaliamos o efeito da CTX na carcinogênese pulmonar, no qual a mesma foi administrada na concentração de 8 µg/kg 10 dias após a administração de URT em animais da linhagem AIRmax e AIRmin. Foram avaliados os fenótipos de multiplicidade e incidência, as alterações histológicas e a dinâmica celular ao longo de 120 dias.

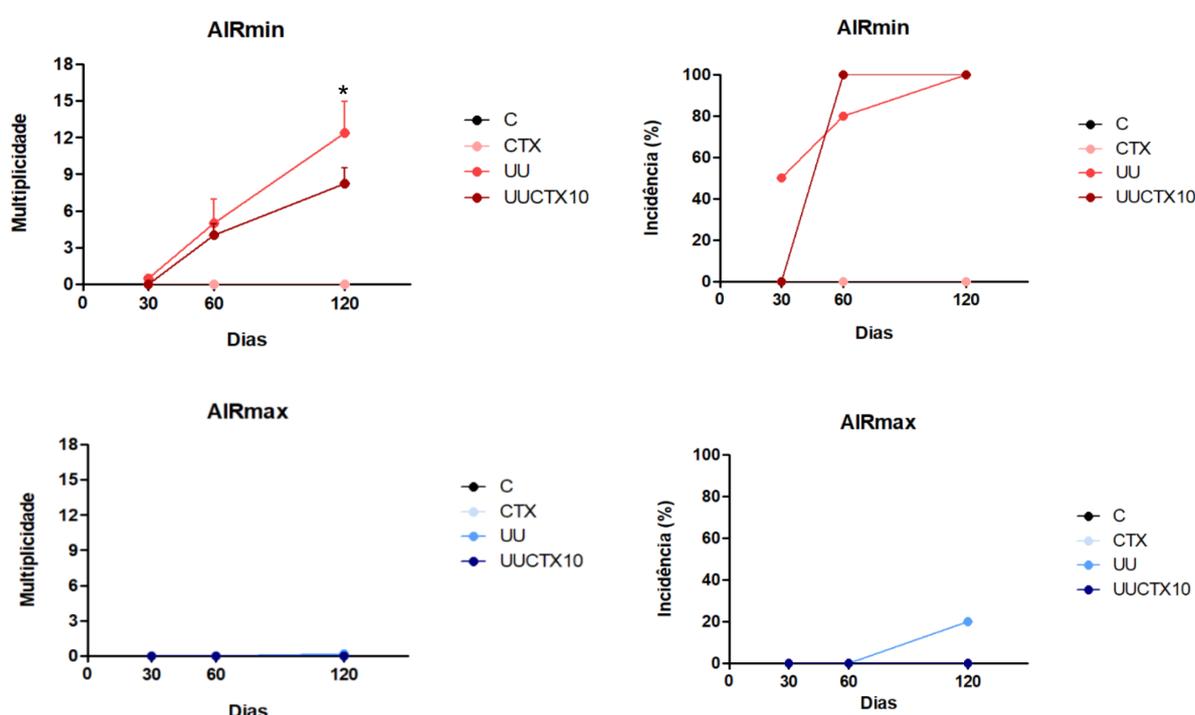
#### 4.1.1 Análise fenotípica da tumorigênese

Com a finalidade de avaliar o efeito supressor da CTX no número de lesões tumorais induzidas por uretana, as lesões tumorais macroscópicas foram registradas e as médias do número de lesões por grupo foram plotadas em gráficos de multiplicidade, onde observamos o número médio de lesões em cada grupo aos 30, 60 e 120 dias, e de incidência, onde está representada a porcentagem de animais que apresentaram lesões tumorais em cada grupo e nos diferentes tempos analisados (**Figura 4**).

É possível observar, inicialmente, que o fenótipo de resistência e suscetibilidade à carcinogênese pulmonar induzida por URT nas linhagens AIRmax e AIRmin foi preservado, como descrito por Ribeiro et al. (2005), sendo os camundongos AIRmax mais resistentes e os AIRmin mais susceptíveis à formação de tumores. Este fenótipo manteve-se também no grupo tratado com crotoxina, mostrando assim que a crotoxina *per se* não causa tumor. Nos animais da linhagem AIRmax, o número médio de lesões foi nulo ou consideravelmente baixo em todos os grupos de tratamento aos 30, 60 e 120 dias, não sendo possível observar qualquer tipo de modulação por parte da crotoxina no desenvolvimento tumoral. Por outro lado, nos animais da linhagem AIRmin, ambos os grupos administrados com URT

apresentaram lesões a partir dos 60 dias, mesmo após o tratamento com crotoxina. Aos 120 dias, os grupos administrados com URT apresentaram um número médio de lesões elevado. No entanto, o grupo UUCTX10 apresentou um menor número médio de lesões tumorais (8,25) do que o grupo UU (12,4), porém, não significativa.

**Figura 4** – Multiplicidade (esquerda) e incidência (direita) das lesões tumorais macroscópicas observadas nos camundongos das linhagens AIRmax (azul) e AIRmin (vermelho) tratados com CTX (0,8 µg/kg) administrada 10 dias após a administração de URT. Os valores de multiplicidade refletem a média do número de lesões tumorais registradas. Os gráficos de incidência representam a porcentagem de camundongos em cada grupo que apresentou lesões tumorais. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média ( $\bar{x} \pm EPM$ ). \*diferenças significativas entre o grupo C e CTX e o grupo UU.



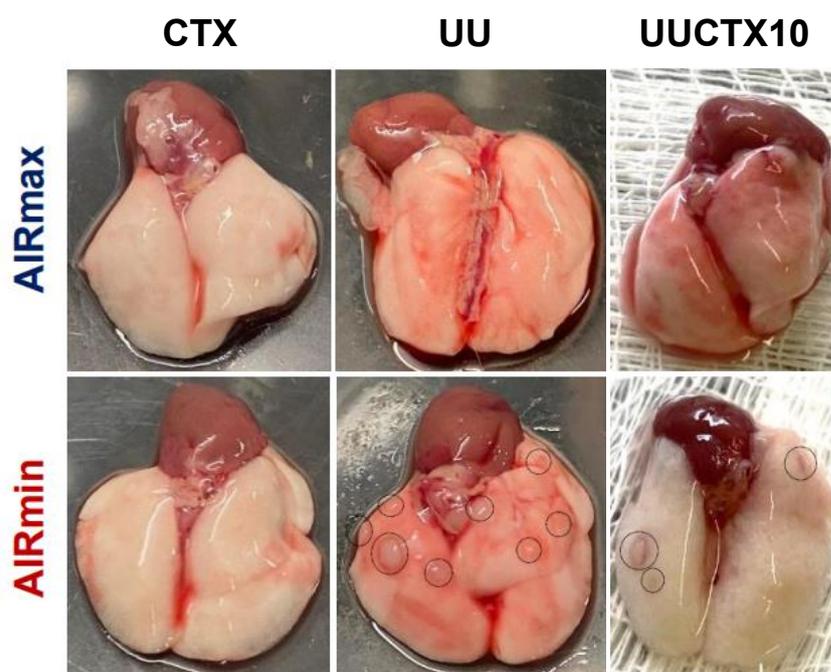
Fonte: próprio autor, 2023.

A diferença fenotípica entre as linhagens AIRmax e AIRmin é resultante da segregação alélica do *locus pas1*, em consequência do processo de seleção genética para AIR (Resposta Inflamatória Aguda) que deu origem às duas linhagens, sendo os animais AIRmax portadores do alelo de resistência (*pas1<sup>r</sup>*) e os animais AIRmin do alelo de suscetibilidade (*pas1<sup>s</sup>*), como descrito por Maria et al. (2003).

Logo após a extração dos pulmões, as lesões macroscópicas observadas foram registradas. Na **figura 5**, podemos observar as imagens das lesões tumorais superficiais aos 120 dias, permitindo a sua comparação entre os diferentes grupos. A

avaliação de 120 dias foi a última análise realizada, na qual podemos observar, com bastante clareza, a diferença no fenótipo de resistência e susceptibilidade das duas linhagens. Neste tempo, os animais AIRmax apresentaram lesões pequenas e em número reduzido, enquanto os animais AIRmin apresentaram um número elevado de lesões e com variações no tamanho.

**Figura 5** - Lesões tumorais macroscópicas observadas em cada grupo das respectivas linhagens. As lesões encontram-se destacadas com um círculo à sua volta em cada imagem.



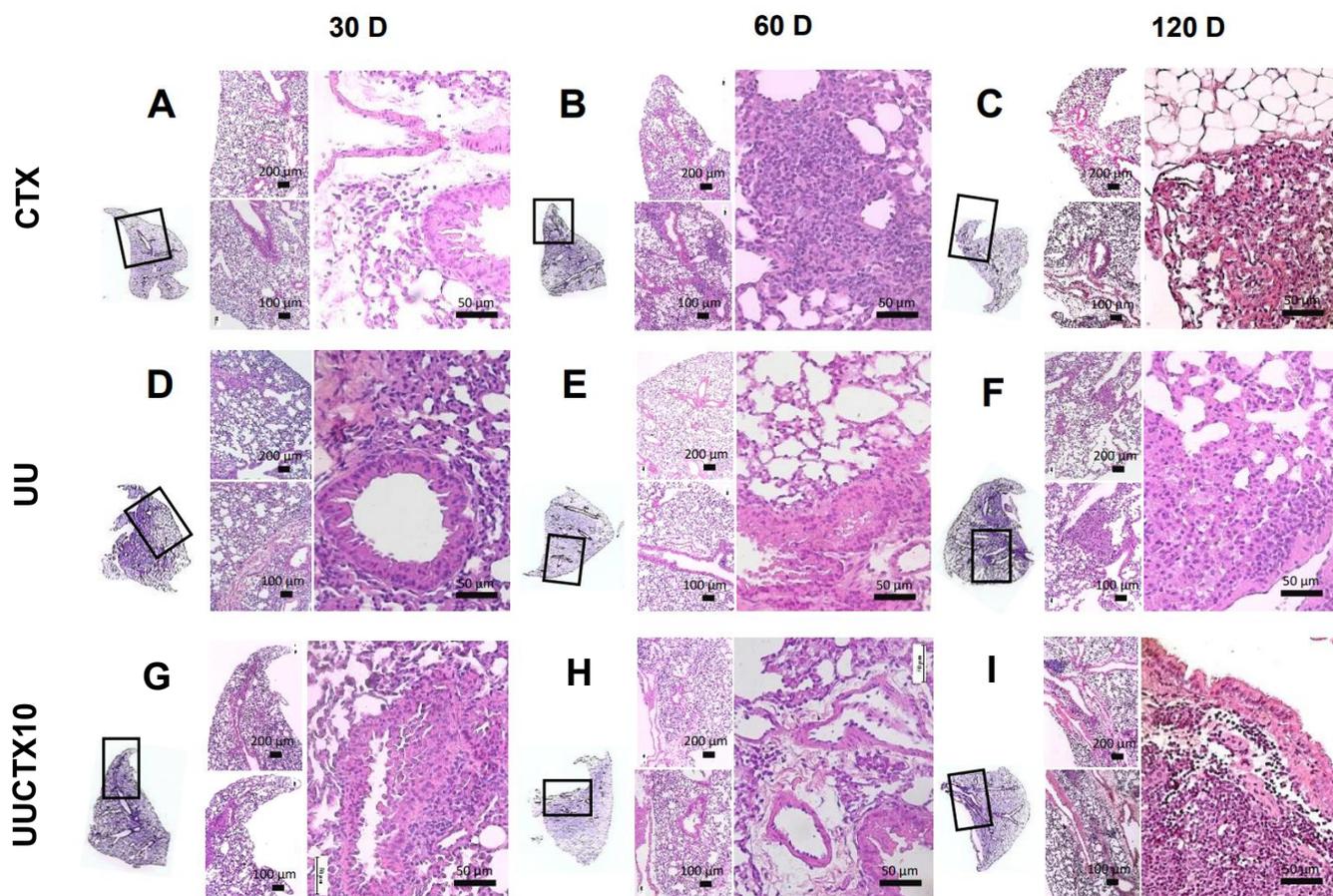
Fonte: próprio autor, 2023.

#### 4.1.2 Análises histológicas dos pulmões

De forma a comparar a morfologia dos tumores presentes nos diferentes grupos de tratamento das linhagens AIRmax e AIRmin, foi realizada a análise histológica dos pulmões aos 30, 60 e 120 dias. As fotomicrografias dos pulmões nos diferentes tempos podem ser visualizadas nas **figuras 6 e 7**, respectivamente, para a linhagem AIRmax e linhagem AIRmin.

Nos animais AIRmax, não foram observadas lesões tumorais diferenciadas nas análises de 30 e 60 dias, no entanto, aos 120 dias, é possível visualizar lesões tumorais precursoras, com aspecto neoplásico acentuado, no grupo UU (**Figura 6F**).

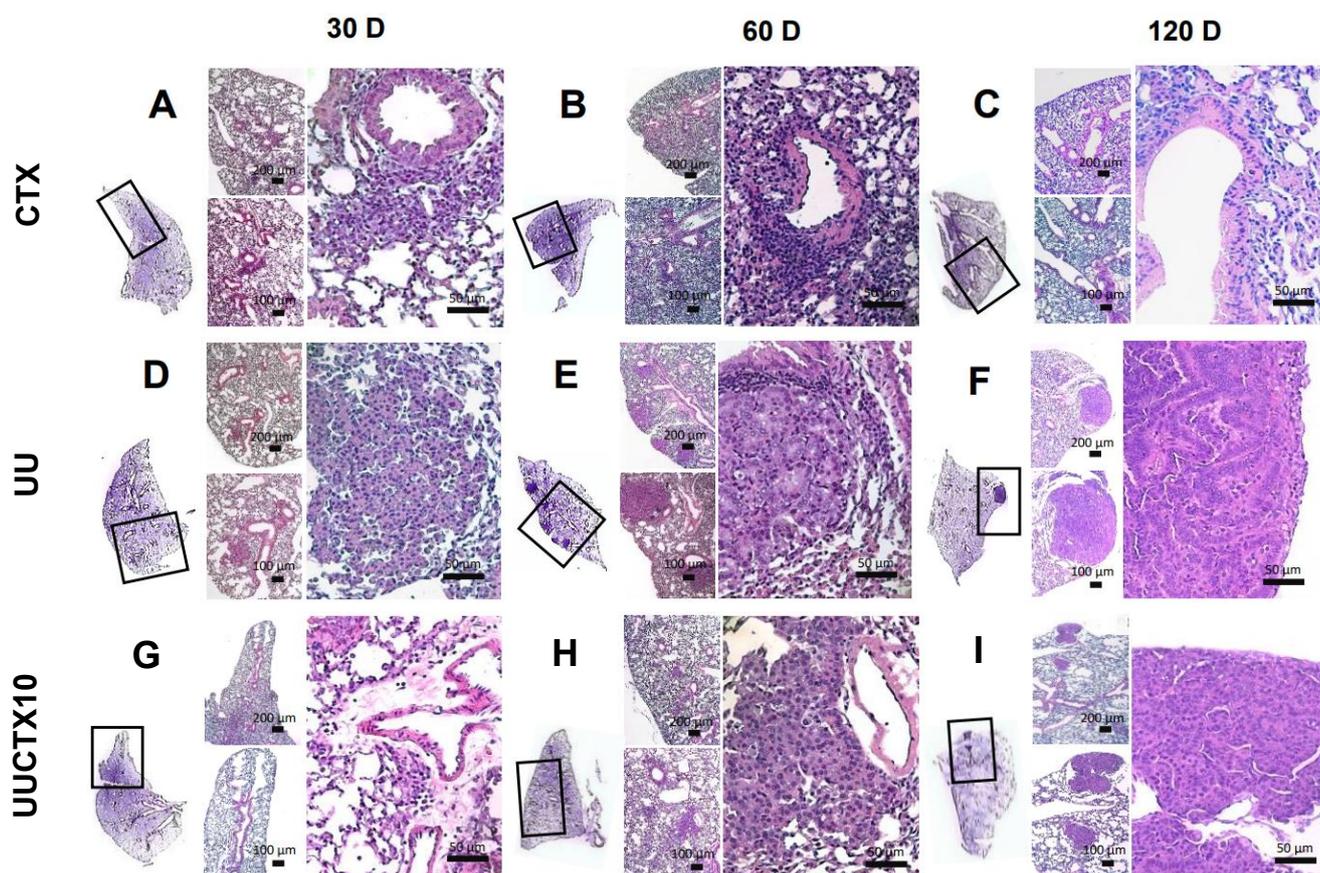
**Figura 6** - Fotomicrografias dos pulmões dos camundongos de cada grupo da linhagem AIRmax, aos 30, 60 e 120 dias após tratamento. Podemos observar o lóbulo pulmonar completo, e as respectivas ampliações das áreas destacadas, sendo, 5x no canto superior esquerdo, 10x no canto inferior esquerdo e 40x na fotomicrografia da direita. Coloração H&E em corte de 5 µm de espessura.



Fonte: próprio autor, 2023.

Nos animais AIRmin, foi observado no grupo de tratamento CTX, um efeito inflamatório leve, caracterizado pela presença de infiltrado leucocitário peribronquiolar em todos os tempos analisados, provavelmente devido à ação da CTX (**Figura 7A, 7B e 7C**).

**Figura 7** - Fotomicrografias dos pulmões dos camundongos de cada grupo da linhagem AIRmin, aos 30, 60 e 120 dias após tratamento. Podemos observar o lóbulo completo e as diferentes ampliações das áreas destacadas, sendo, 5x no canto superior esquerdo, 10x no canto inferior esquerdo e 40x na fotomicrografia da direita. Coloração H&E em corte de 5 µm de espessura



Fonte: próprio autor, 2023.

Adicionalmente, a análise histopatológica do grupo UU revelou uma progressão do processo neoplásico, de forma que, aos 30 dias de análise, é observada uma massa neoplásica com características difusas ou pouco delimitadas, formando tapetes celulares hepatizados pouco diferenciados com origem no epitélio brônquico e migração para os alvéolos (**Figura 7D**). Na sequência dos eventos da tumorigênese, aos 60 e 120 dias, ocorre uma diferenciação da massa neoplásica, caracterizada por uma área delimitada com características histomorfológicas de adenocarcinoma *in situ*, com células formando arranjos glandulares e lesões invasivas originárias dos grandes brônquios, com a presença de êmbolos neoplásicos na luz dos vasos sanguíneos e linfáticos sugerindo possível metástase (**Figura 7E**). Ademais, aos 120 dias, a massa neoplásica apresenta uma diferenciação mais acentuada com extensas áreas de

necrose (**Figura 7F**). Sendo assim, é possível visualizar o princípio do processo neoplásico aos 30 dias, tornando-se este processo cada vez mais agressivo até aos 120 dias.

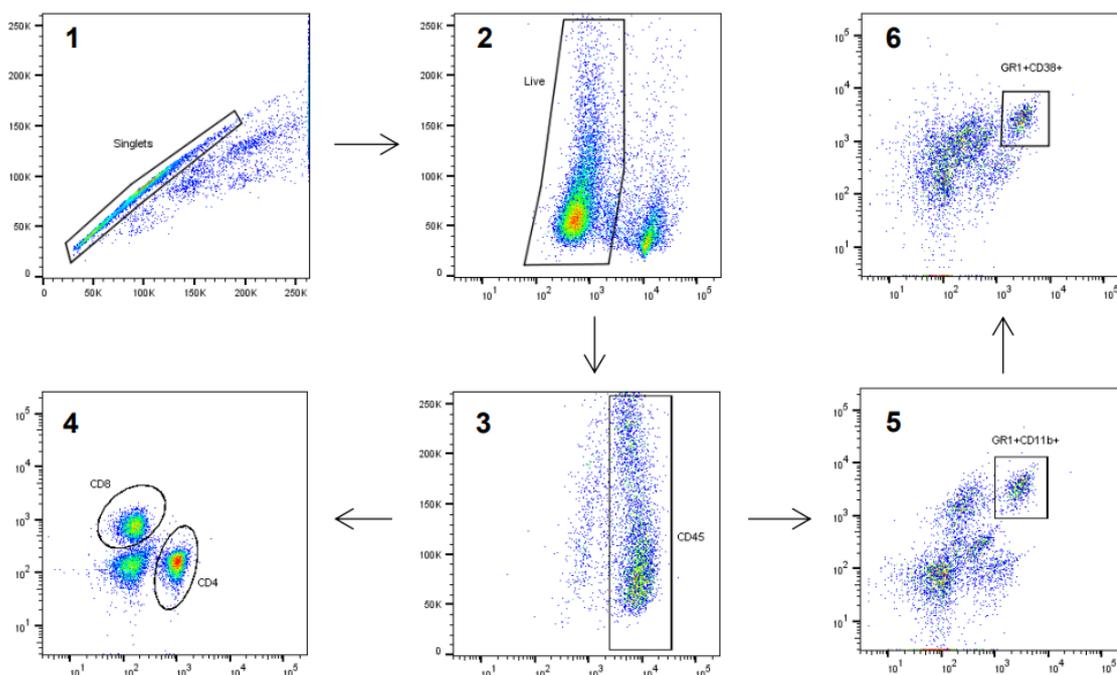
No entanto, a progressão tumoral aos 30 e 60 dias não é tão evidente no grupo UUCTX10, sugerindo um possível efeito inibitório do processo neoplásico por parte da CTX nesses tempos. Aos 120 dias, no que concerne ao efeito antitumoral descrito da CTX, não foi observado uma inibição total do desenvolvimento tumoral no grupo de tratamento UUCTX10, quando comparado com o grupo UU, porém, mostrou lesões menos invasivas (**Figura 7I**).

Apesar de terem sido observados alguns efeitos da CTX no grupo de tratamento UUCTX10, não é possível quantificar com clareza o efeito terapêutico antitumoral da crotoxina *in situ* no tecido pulmonar. Em relação aos fenótipos de resistência e suscetibilidade das linhagens AIRmax e AIRmin, estas se diferem na progressão da tumorigênese pulmonar, como descrito por Ribeiro et al. (2005).

### 4.1.3 Imunofenotipagem

Foi realizada a identificação das populações celulares presentes nos pulmões dos animais AIRmax e AIRmin, para isso, as mesmas foram marcadas com anticorpos específicos dirigidos às moléculas de superfície da célula, com o intuito de analisar células T CD4, células T CD8 e neutrófilos. Para esta análise, foi adotada a estratégia de identificação das populações representada na **figura 8**.

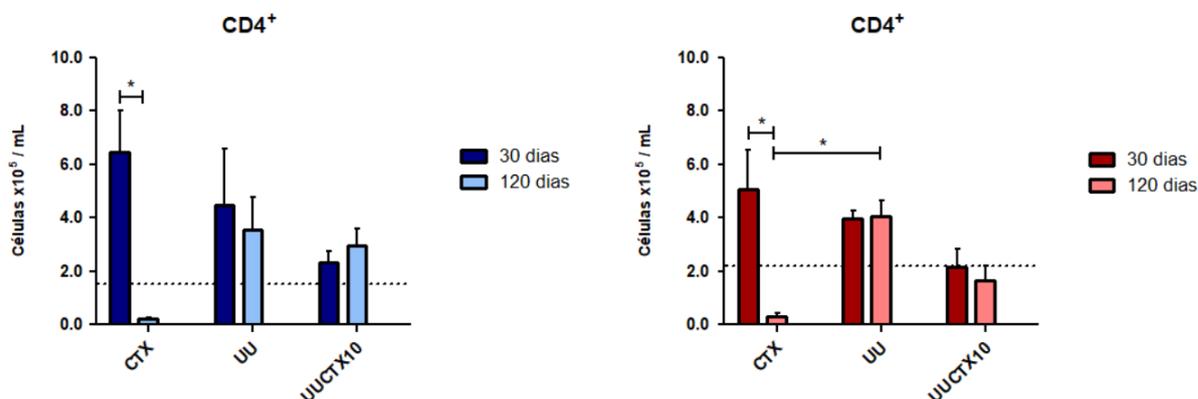
**Figura 8** - Estratégia adotada para análise das células responsáveis pela resposta inflamatória (neutrófilos) evidenciadas pela marcação GR1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> ou GR1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>, assim como para as células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. A estratégia adotada para seleção das populações celulares iniciou-se com a exclusão das células duplicadas (1), e em seguida, foram eliminados os debris celulares (2). A população CD45<sup>+</sup> foi identificada, de modo a avaliar apenas os leucócitos (3). Em seguida, foram identificadas as populações celulares de interesse: linfócitos T CD4 e T CD8 (4), neutrófilos (5) e células mieloides imaturas (CD38) (6). As análises foram realizadas no programa FlowJo.



Fonte: próprio autor, 2023.

Na **figura 9**, apresentamos o perfil de linfócitos T CD4 no pulmão, no qual podemos observar um perfil semelhante entre as linhagens AIRmax e AIRmin. O grupo CTX, em ambas as linhagens, apresenta uma diminuição significativa de células T CD4 dos 30 para os 120 dias

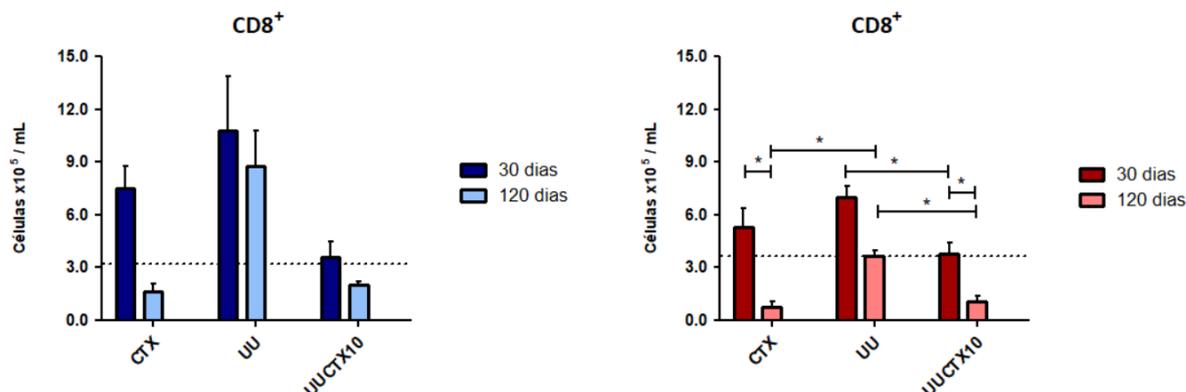
**Figura 9** - Análise de células T CD4 presentes nos pulmões dos animais das linhagens AIRmax (azul) e AIRmin (vermelho), e respectivos grupos de tratamento. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $\bar{x} \pm$  EPM) da concentração celular. O tracejado refere-se ao grupo Controle. \* São considerados significativos os valores  $p < 0,05$



Fonte: próprio autor, 2023.

Em relação ao perfil dos linfócitos T CD8 nas duas linhagens e respectivos tratamentos (**Figura 10**), podemos observar mais uma vez, que no pulmão, ambas as linhagens apresentam um perfil semelhante. O grupo UU apresenta uma maior quantidade de células T CD8 aos 30 e 120 dias na linhagem AIRmin, quando comparado com o grupo de tratamento UUCTX10. A célula T CD8 é citotóxica e promove a apoptose de células tumorais, no entanto, na linhagem AIRmin, apesar do grupo UU apresentar um nível mais elevado de célula T CD8, esses animais apresentaram um número elevado de lesões (**Figura 4**). Já aos 120 dias, na linhagem AIRmin, o grupo de tratamento UUCTX10 apresenta uma menor quantidade de células T CD8 e de lesões tumorais (**Figura 4**), sugerindo uma falta de correlação entre a quantidade deste tipo celular e o número de lesões macroscópicas observadas.

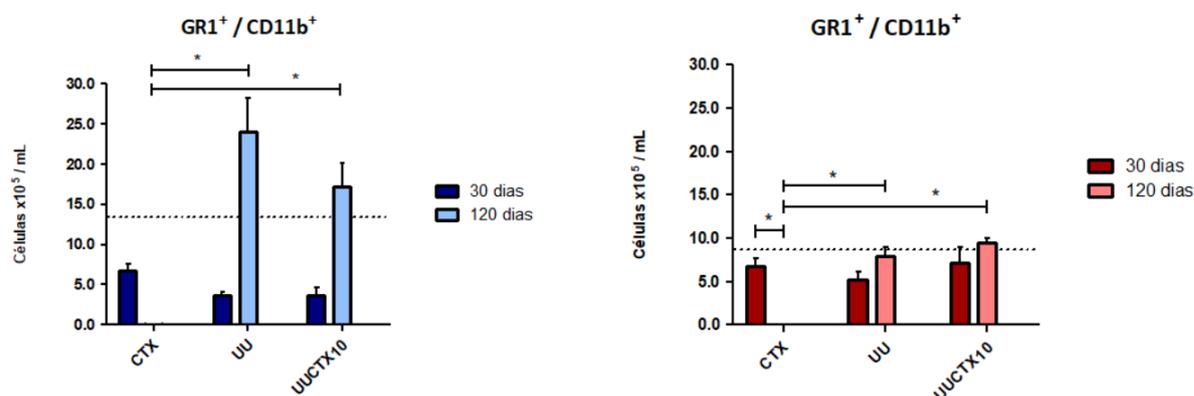
**Figura 10** - Análise de células T CD8 presentes nos pulmões dos animais das linhagens AIRmax (azul) e AIRmin (vermelho), e respectivos grupos de tratamento. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $\bar{x} \pm$  EPM) da concentração celular. O tracejado refere-se ao grupo Controle. \* São considerados significativos os valores  $p < 0,05$ .



Fonte: próprio autor, 2023.

No que concerne às células neutrofílicas (GR1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>) presentes no pulmão (**Figura 11**), é possível observar que o perfil difere nas duas linhagens, condizendo com o fenótipo de seleção, onde a linhagem AIRmax apresenta maior capacidade de formar uma reação inflamatória crônica, resultando no maior número de neutrófilos após 120 dias de tratamento. Quanto aos animais AIRmin, estes mantiveram níveis basais dessas células.

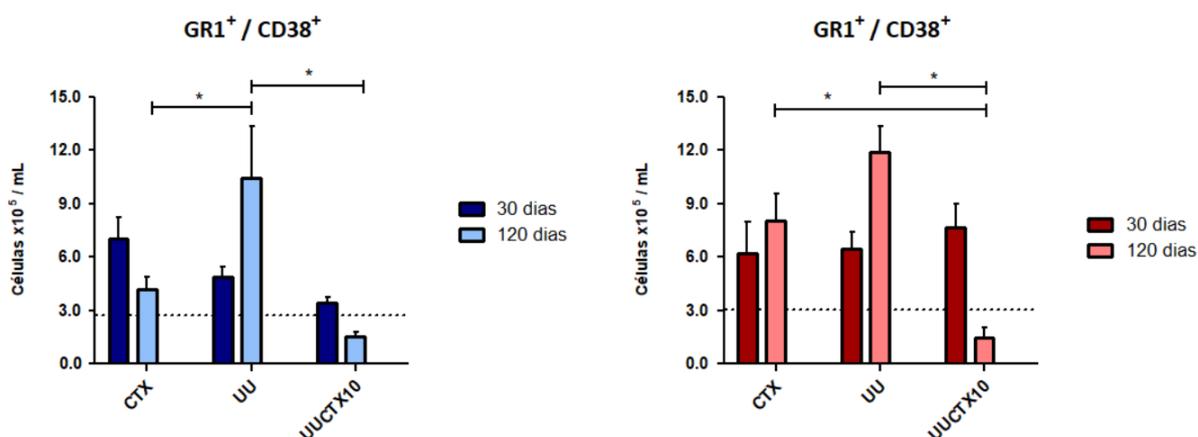
**Figura 11** - Análise de células GR1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> (neutrófilos) presentes nos pulmões dos animais das linhagens AIRmax (azul) e AIRmin (vermelho), e respectivos grupos de tratamento. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $\bar{x} \pm$  EPM) da concentração celular. O tracejado refere-se ao grupo Controle. \* São considerados significativos os valores  $p < 0,05$ .



Fonte: próprio autor, 2023.

Na **figura 12**, temos o perfil das células GR1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>, células mieloides imaturas, no qual é possível observar novamente um perfil semelhante nas duas linhagens. Esta marcação pode revelar a presença de células mieloides supressoras (MDSCs), que auxiliam a progressão tumoral, suprimindo a atividade de linfócitos T citotóxicos. O grupo de tratamento UUCTX10, apresenta menor quantidade de GR1<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> aos 120 dias na linhagem AIRmin em relação aos demais grupos, podendo resultar no menor aparecimento de lesões tumorais nesta linhagem como observado no gráfico de multiplicidade (**Figura 4**). O contrário pode ser considerado para o grupo UU.

**Figura 12** - Análise de células GR1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> (células mieloides imaturas) presentes nos pulmões dos animais das linhagens AIRmax (azul) e AIRmin (vermelho), e respectivos grupos de tratamento. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $\bar{x} \pm$  EPM) da concentração celular. O tracejado refere-se ao grupo Controle. \* São considerados significativos os valores  $p < 0,05$ .



Fonte: próprio autor, 2023.

## 4.2 Modulação da carcinogênese pulmonar induzida por uretana por meio da administração de crotoxina (16 µg/kg) 10 dias após a administração do carcinógeno ou crotoxina (8 µg/kg) em doses múltiplas

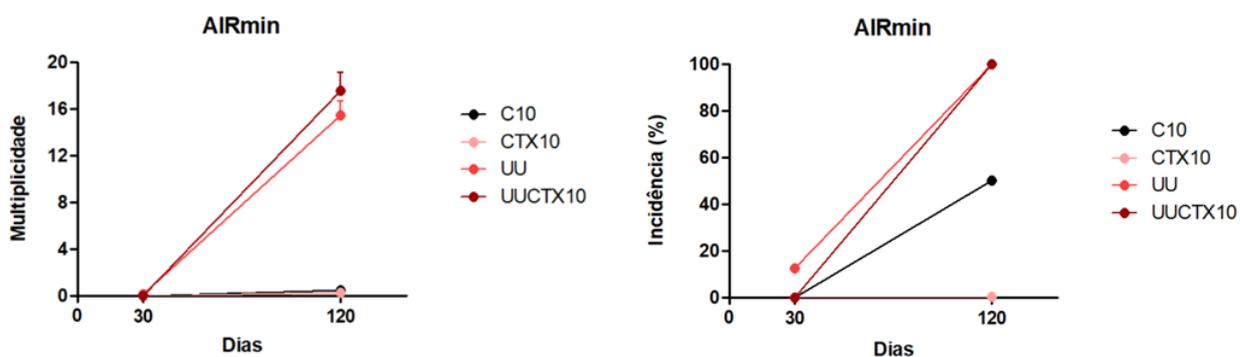
No segundo experimento realizado, para uma tentativa de inibição da carcinogênese pulmonar, foram abordados dois tratamentos: o primeiro, com uma dose única de crotoxina (16 µg/kg) aplicada 10 dias após a administração de URT, e o segundo, contínuo, no qual foram aplicadas múltiplas doses de crotoxina (8 µg/kg) a cada 10 dias. Foram apenas analisados os animais AIRmin, sensíveis à tumorigênese, uma vez que no experimento anterior os efeitos da CTX não foram notórios na linhagem AIRmax, uma linhagem resistente à tumorigênese, assim como foram escolhidos apenas 2 tempos de análise, 30 dias, para observação do início da formação do processo tumoral, e 120 dias, onde a tumorigênese já estaria instalada.

### 4.2.1 Análise fenotípica da tumorigênese

Foram avaliados os parâmetros de multiplicidade e incidência a partir do número médio de lesões tumorais observadas macroscopicamente. No que concerne ao tratamento com uma única dose de crotoxina, os grupos UU e UUCTX10 apresentaram um número médio de lesões semelhante, não sendo aparente qualquer tipo de efeito proveniente da crotoxina administrada (**Figura 13**), no que concerne à diminuição do aparecimento de lesões tumorais. O mesmo acontece no tratamento com múltiplas doses de crotoxina (**Figura 14**).

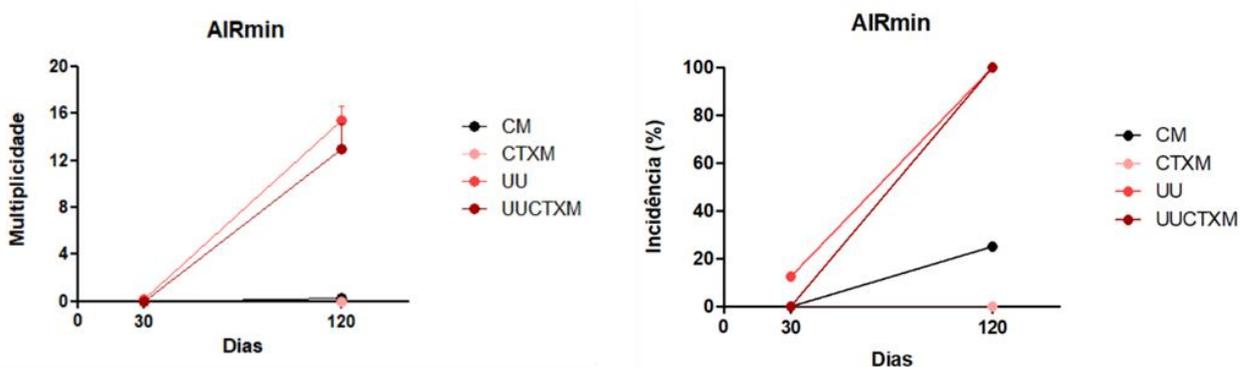
Adicionalmente, podemos observar em ambos os tratamentos, uma incidência de lesões nos grupos controle CM e C10, de 20 e 50%, respectivamente, possivelmente devido a um menor número de animais por grupo e, também por conta dos camundongos da linhagem AIRmin desenvolverem espontaneamente adenomas pulmonares ao longo da sua vida. No entanto, apesar de existir lesões, sempre aparecem em número reduzido, praticamente nulo, como podemos observar nos gráficos de multiplicidade.

**Figura 13** - Multiplicidade (esquerda) e incidência (direita) das lesões tumorais macroscópicas observadas nos camundongos da linhagem AIRmin tratados com uretana (UU) e com uma dose única de crotoxina (16 µg/kg) administrada 10 dias após a primeira dose de uretana (UUCTX10), além dos respectivos controles (C10 e CTX10). Os valores de multiplicidade refletem a média do número de lesões tumorais registradas. Os gráficos de incidência representam a porcentagem de camundongos em cada grupo que apresentou lesões tumorais. Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média ( $\bar{x} \pm$  EPM).



Fonte: próprio autor, 2023.

**Figura 14** - Multiplicidade (esquerda) e incidência (direita) das lesões tumorais macroscópicas observadas nos camundongos da linhagem AIRmin tratados com uretana (UU) e com doses múltiplas de crotoxina (8 µg/kg) administradas a cada 10 dias após a primeira dose de uretana (UUCTXM), além dos respectivos controles (CM e CTXM). Os valores de multiplicidade refletem a média do número de lesões tumorais registradas. Os gráficos de incidência representam a porcentagem de camundongos em cada grupo que apresentou lesões tumorais. Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média ( $\bar{x} \pm$  EPM).



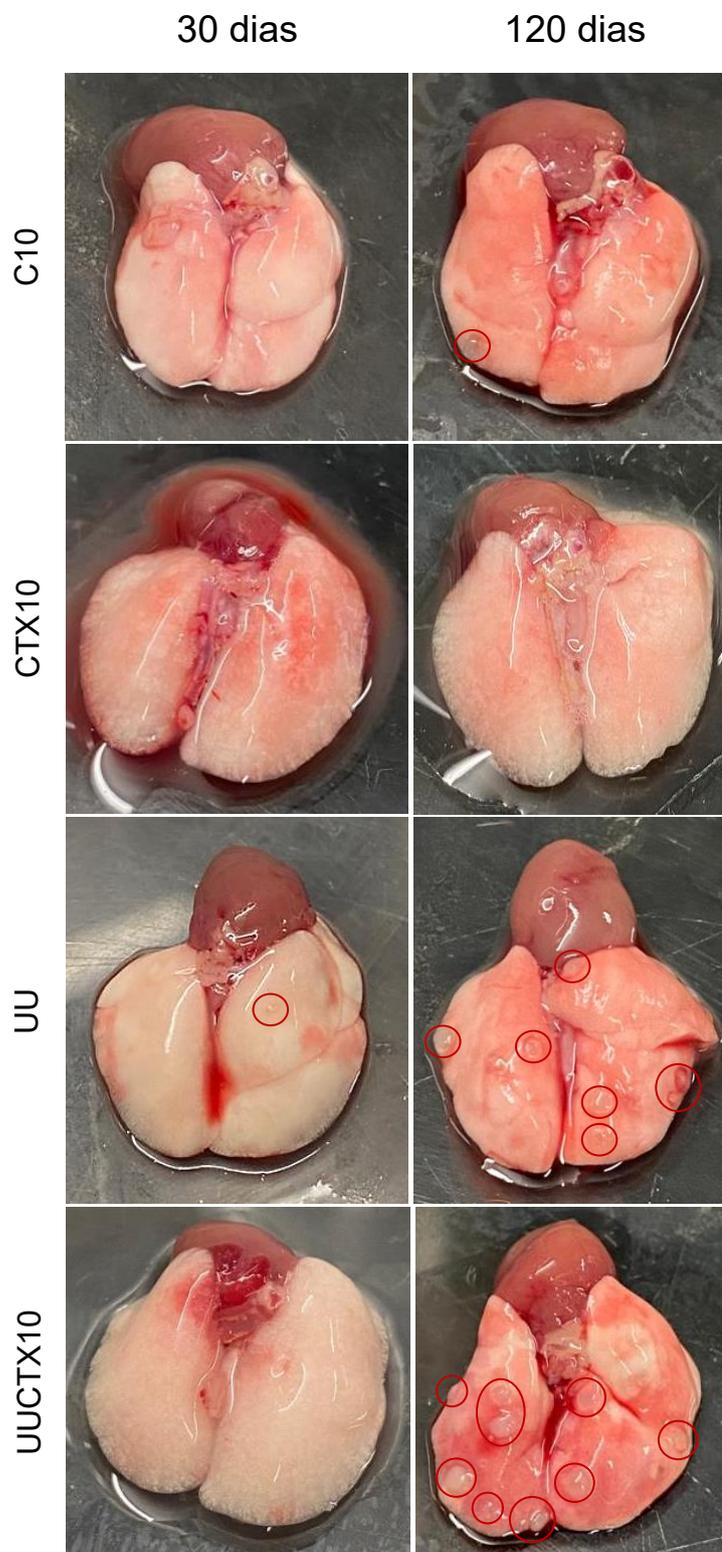
Fonte: próprio autor, 2023.

Nas **figuras 15 e 16** observamos as imagens das lesões tumorais macroscópicas aos 120 dias, permitindo uma comparação entre os diferentes tratamentos.

Na **figura 15** é possível observar as lesões tumorais nos grupos tratados com dose única de crotoxina. Aos 30 dias, o número de lesões observadas é praticamente nulo, sendo apenas observada 1 lesão no grupo UU. Já aos 120 dias, enquanto os grupos CM e CTX 10 continuam praticamente sem lesões aparentes, os grupos UU e UUCTX10 apresentam um número consideravelmente elevado, sendo 20 e 24 o número máximo de lesões observadas, respectivamente. Na **figura 16** podemos observar que o mesmo acontece com o tratamento no qual foram aplicadas múltiplas doses de crotoxina, sendo 24 o número máximo de lesões contabilizadas no grupo UUCTXM.

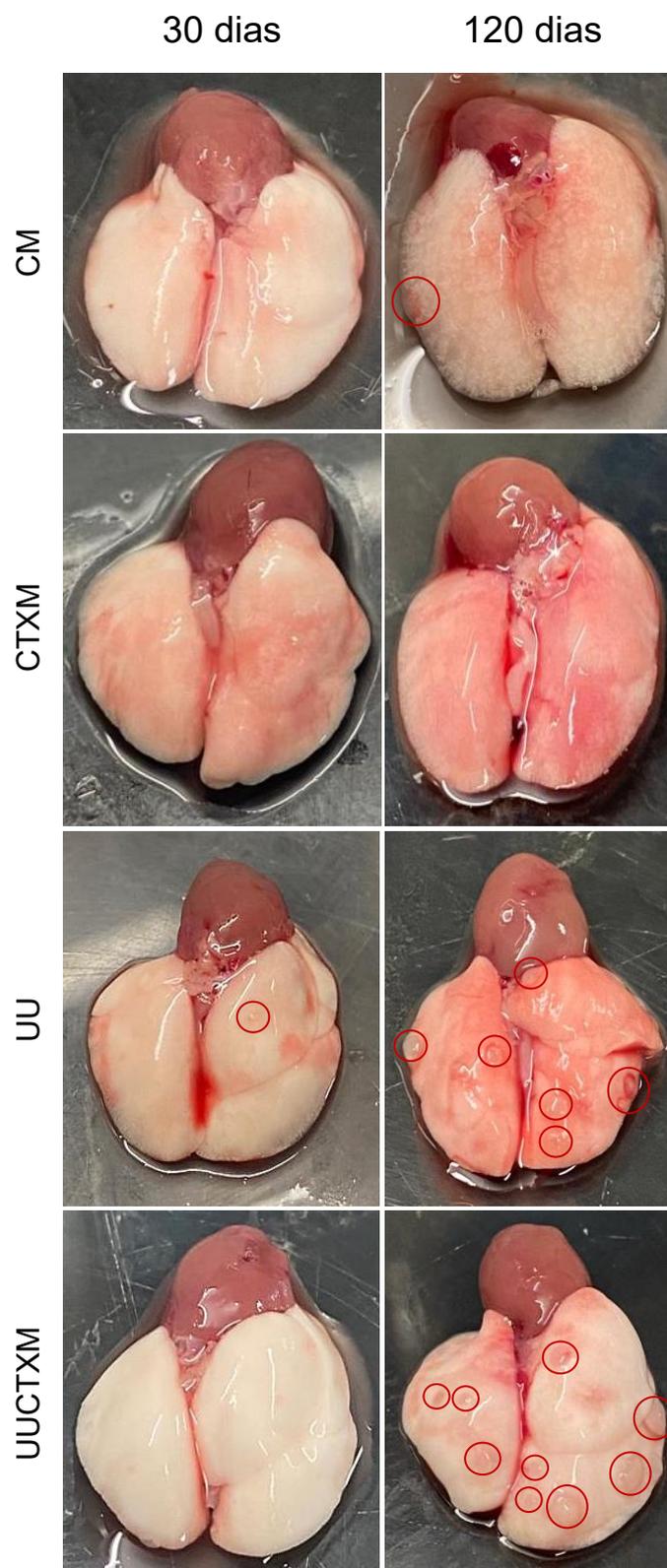
Nestas imagens apenas podemos visualizar as lesões superficiais. Durante a contagem das lesões, os lóbulos do pulmão foram divididos para uma melhor e mais precisa quantificação.

**Figura 15** - Lesões tumorais macroscópicas observadas em cada grupo do tratamento com uma dose única de crotoxina 10 dias após a administração de uretana. As lesões encontram-se destacadas com um círculo vermelho à sua volta em cada imagem.



Fonte: próprio autor, 2023.

**Figura 16** - Lesões tumorais macroscópicas observadas em cada grupo do tratamento com doses múltiplas de crotoxina a cada 10 dias. As lesões encontram-se destacadas com um círculo vermelho à sua volta em cada imagem.



Fonte: próprio autor, 2023.

Foram também medidos os diâmetros das lesões com recurso de um paquímetro. Podemos observar nas seguintes **tabelas 6 e 7**, que não houve diferenças entre o grupo UU e os grupos UUCTXM e UUCTX10. Sendo assim, não é possível constatar nenhum efeito modulador da crotoxina, assim como observado nos parâmetros de multiplicidade e incidência.

**Tabela 6** – Diâmetro médio (mm)  $\pm$  erro padrão da média ( $\bar{x} \pm$  EPM) das lesões macroscópicas observadas nos camundongos tratados com uma dose única de crotoxina.

	30 dias	120 dias
C10	0,00 $\pm$ 0,00	0,80 $\pm$ 0,46
CTX10	0,00 $\pm$ 0,00	0,32 $\pm$ 0,32
UU	0,04 $\pm$ 0,04	1,38 $\pm$ 0,06
UUCTX10	0,00 $\pm$ 0,00	1,33 $\pm$ 0,08

Fonte: próprio autor, 2023.

**Tabela 7** – Diâmetro médio (mm)  $\pm$  erro padrão da média ( $\bar{x} \pm$  EPM) das lesões macroscópicas observadas nos camundongos tratados com múltiplas doses de crotoxina.

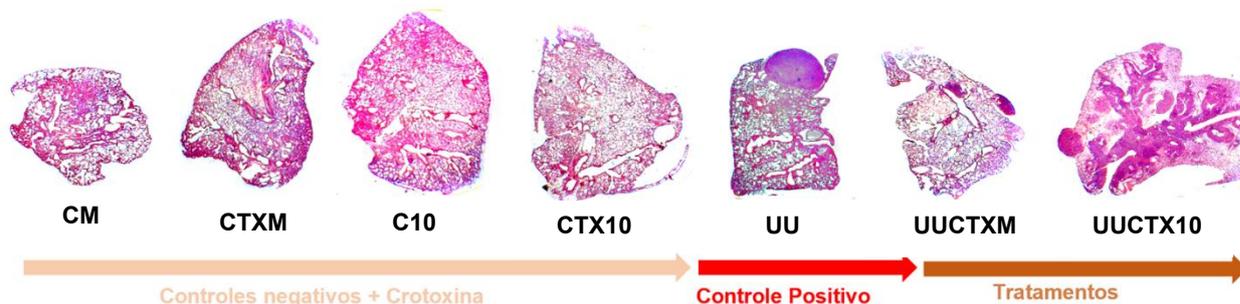
	30 dias	120 dias
CM	0,00 $\pm$ 0,00	0,43 $\pm$ 0,43
CTXM	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
UU	0,04 $\pm$ 0,04	1,38 $\pm$ 0,06
UUCTXM	0,00 $\pm$ 0,00	1,39 $\pm$ 0,10

Fonte: próprio autor, 2023.

#### 4.2.2 Análises histológicas dos pulmões

Na **figura 17**, observamos nas imagens histopatológicas, a evolução da carcinogênese pulmonar, assim como o efeito da CTX nos diferentes tratamentos realizados.

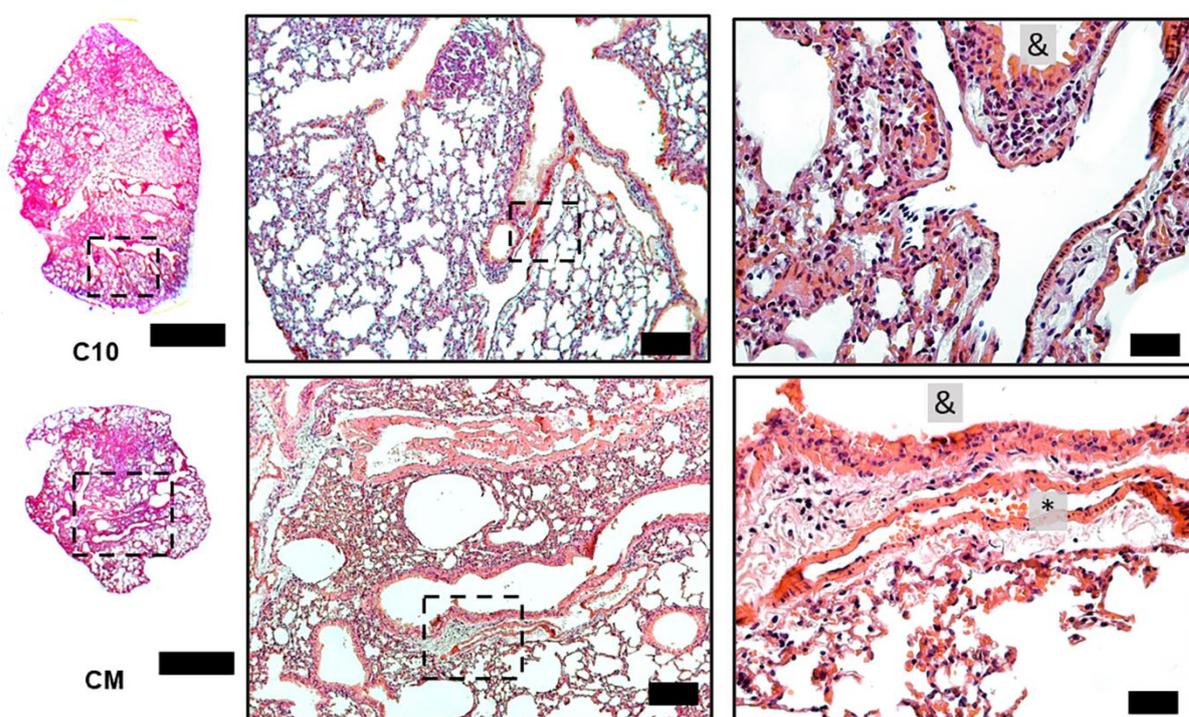
**Figura 17** - Imagens representativas dos fragmentos de tecido pulmonar, evidenciando um possível efeito terapêutico no tratamento com uma dose única ou múltiplas doses de crotoxina.



Fonte: próprio autor, 2023.

O exame histopatológico dos fragmentos de tecido pulmonar dos camundongos da linhagem AIRmin pertencentes aos grupos de tratamento C10, controle negativo do grupo de tratamento com uma dose única de crotoxina, e CM, controle negativo do grupo de tratamento com múltiplas doses de crotoxina, mostraram um padrão de normalidade não apresentando nenhuma alteração histopatológica digna de nota (**Figura 18**).

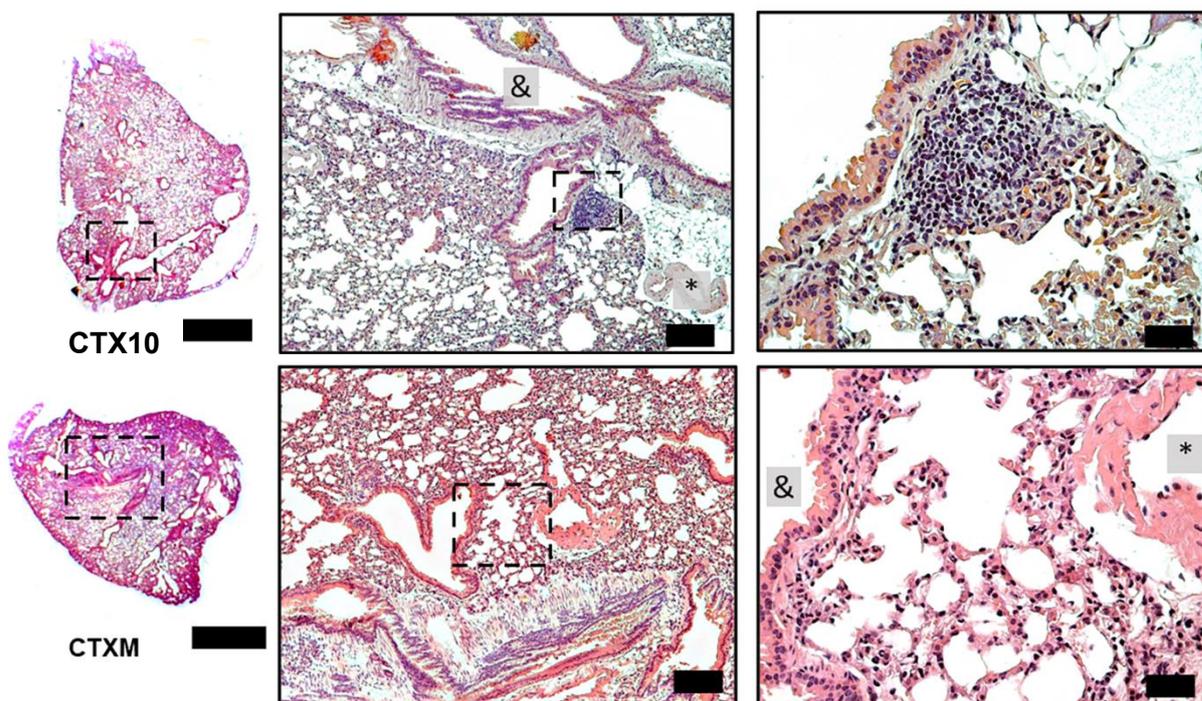
**Figura 18** - Imagens representativas dos fragmentos de tecido pulmonar dos controles negativos dos grupos de tratamento com uma dose única de crotoxina (C10) e múltiplas doses (CM). Barras de escala de 0,25 mm nos lóbulos pulmonares e 10-50  $\mu$ m nas ampliações. Coloração de H&E. \* - Luz da arteríola brônquica; & - Luz do bronquíolo ou brônquico.



Fonte: próprio autor, 2023.

Foi observado um leve infiltrado inflamatório em um dos fragmentos analisados de tecido pulmonar do grupo de tratamento CTX10. O mesmo não aconteceu em nenhum fragmento do grupo de tratamento CTXM, evidenciado o papel anti-inflamatório da CTX administrada continuamente nesse grupo (**Figura 19**).

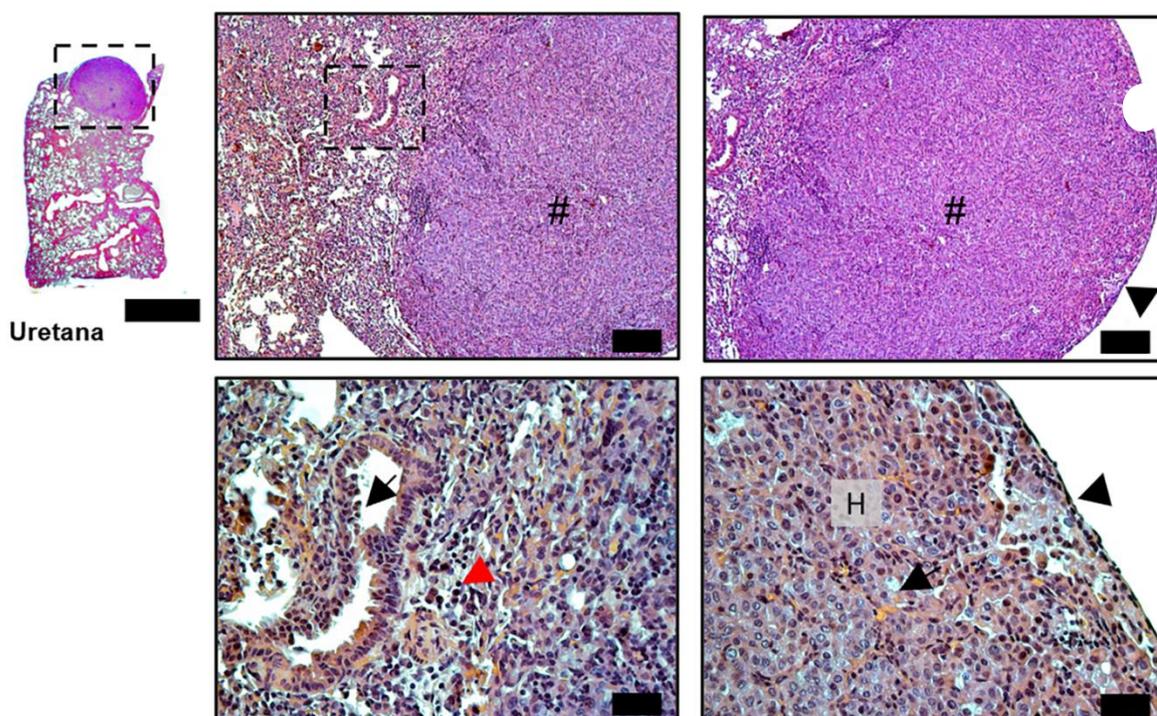
**Figura 19** - Imagens representativas dos fragmentos de tecido pulmonar dos grupos de tratamento com uma dose única de crotoxina (CTX10) e múltiplas doses (CTXM). Barras de escala de 0,25 mm nos lóbulos pulmonares e 10-50 µm nas ampliações. Coloração de H&E. \* - Luz da arteríola brônquica; & - Luz do bronquíolo ou brônquico.



**Fonte:** próprio autor, 2023.

Ademais, os fragmentos do grupo UU (**Figura 20**) mostraram uma tumorigênese evoluída caracterizada por uma massa neoplásica composta de tapetes celulares hepatizados bem diferenciados, com origem no epitélio brônquico e migração para os alvéolos, tal como a formação de uma cápsula neoplásica, caracterizando um diagnóstico de adenocarcinoma *in situ* com células formando arranjos glandulares e lesões invasivas originárias dos grandes brônquios, assim como a presença de êmbolos neoplásicos na luz dos vasos sanguíneos e linfáticos, sugerindo possível metástase.

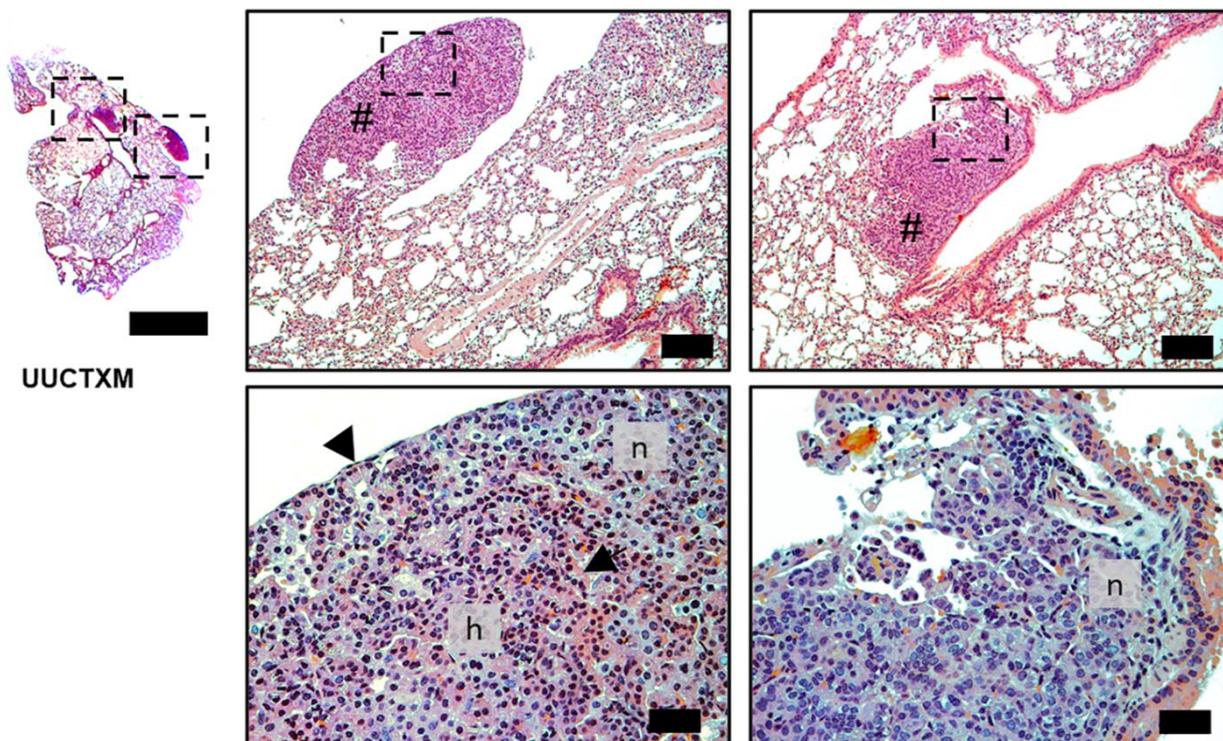
**Figura 20** - Imagens representativas dos fragmentos de tecido pulmonar do grupo de tratamento UU, controle positivo para tumorigênese induzida por uretana. Barras de escala de 0,25 mm nos lóbulos pulmonares e 10-50 µm nas ampliações. Coloração de H&E. # - Área neoplásica; Seta preta - Epitélio brônquico; Ponta da seta preta - Cápsula neoplásica ou neovascularização; Ponta da seta vermelha - Êmbolos neoplásicos.



Fonte: próprio autor, 2023.

Nas imagens dos grupos tratados com crotoxina, é possível observar um efeito modulatório na evolução da tumorigênese. O grupo UUCTXM parece apresentar uma massa neoplásica reduzida quando comparada com a massa neoplásica observada no grupo UU (**Figura 21**). As áreas de necrose são mais extensas e a diferenciação ou hepatização das células neoplásicas não ocorre de forma acentuada como no grupo UU, assim como os êmbolos neoplásicos associados à metástase não são observados. Adicionalmente, a neovascularização acentuada na massa tumoral sugere a atuação dos mecanismos de reparo tecidual marcado pela presença de fibroblastos.

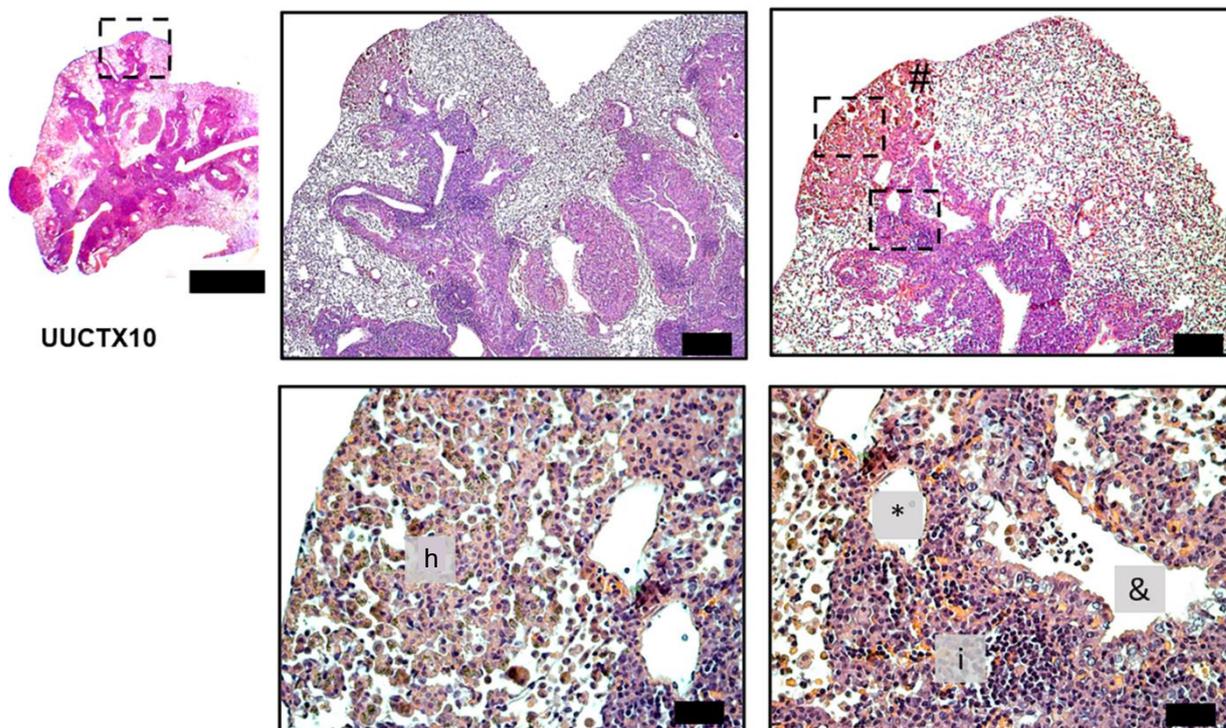
**Figura 21** - Imagens representativas dos fragmentos de tecido pulmonar do grupo tratado com múltiplas doses de crotoxina (UUCTXM). Barras de escala de 0,25 mm nos lóbulos pulmonares e 10-50  $\mu$ m nas ampliações. Coloração de H&E. # - Área neoplásica; Seta preta - Epitélio brônquico; Ponta da seta preta - Cápsula neoplásica ou neovascularização; n - Necrose; h - Formação de tapetes celulares hepatizados.



**Fonte:** próprio autor, 2023.

Na sequência da análise, os fragmentos do tecido pulmonar do grupo UUCTX10 revelaram um processo inflamatório intenso e generalizado, assim como a cinética leucocitária parece ocorrer do epitélio brônquico para o interstício do órgão e, em seguida, para os alvéolos (**Figura 22**). Além disso, a presença de cordões de células hepatizadas iniciando a formação de tapetes celulares, é algo característico da instalação do processo neoplásico. No entanto, apesar da presença de nódulos neoplásicos apicais no tecido pulmonar destes animais, a crotoxina sugestivamente parece ter desorganizado a estrutura do nódulo neoplásico, reduzindo os tapetes celulares hepatizados que caracterizam a malignidade da neoplasia. De forma distinta do grupo de tratamento UUCTXM, no grupo UUCTX10 o mecanismo da crotoxina na tumorigênese não teve influência na área de necrose. Todavia, é possível observar uma metaplasia acentuada e hiperplasia além de neovascularização.

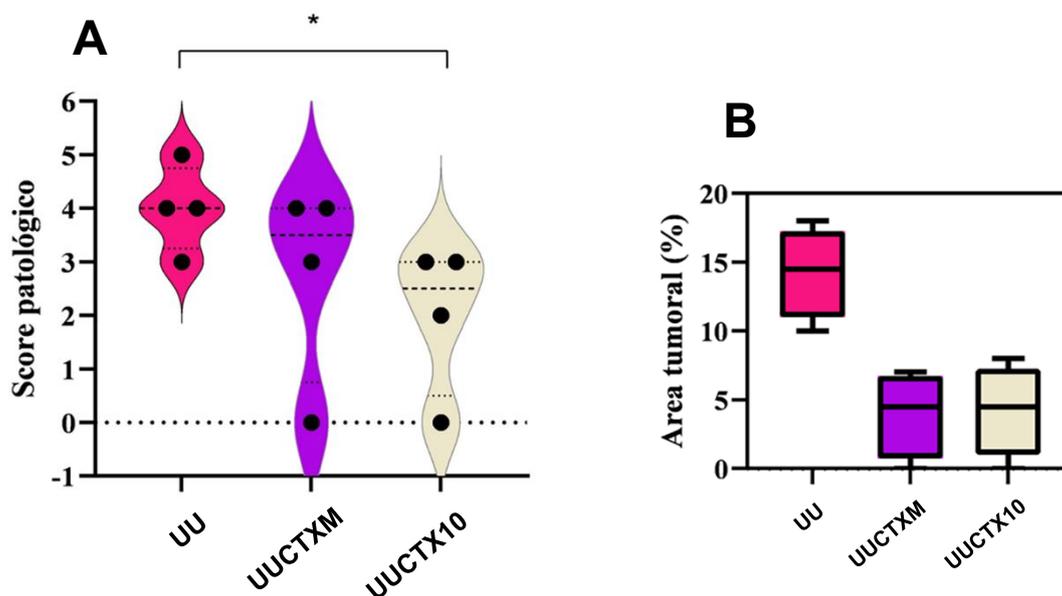
**Figura 22** - Imagens representativas dos fragmentos de tecido pulmonar do grupo tratado com uma dose única de crotoxina (UUCTX10). Barras de escala de 0,25 mm nos lóbulos pulmonares e 10-50 µm nas ampliações. Coloração de H&E. # - Área neoplásica; h - Formação de tapetes celulares hepatizados; \* - Luz da arteríola brônquica; & - Luz do bronquíolo ou brônquico; i - Infiltrado inflamatório.



Fonte: próprio autor, 2023.

Por fim, quando analisamos a somatória destas alterações, em escores patológicos, é possível observar uma discreta redução no grupo de tratamento UUCTXM e moderada no grupo UUCTX10, quando comparados com o grupo UU (Figura 23A). Assim como uma redução no valor da área tumoral nesses grupos (Figura 23B).

**Figura 23** – A - Score patológico baseado nas métricas presentes na tabela 5: 0 - Tecido normal; 1 - Inflamação crônica, ulceração, atrofia ou hiperplasia; 2 - Atipia celular, metaplasia ou células em estágio de mitose; 3 - Displasia; e 4 - 5 - Carcinoma positivo. B - Gráfico referente à porcentagem (%) de área tumoral em cada um dos grupos de tratamento.

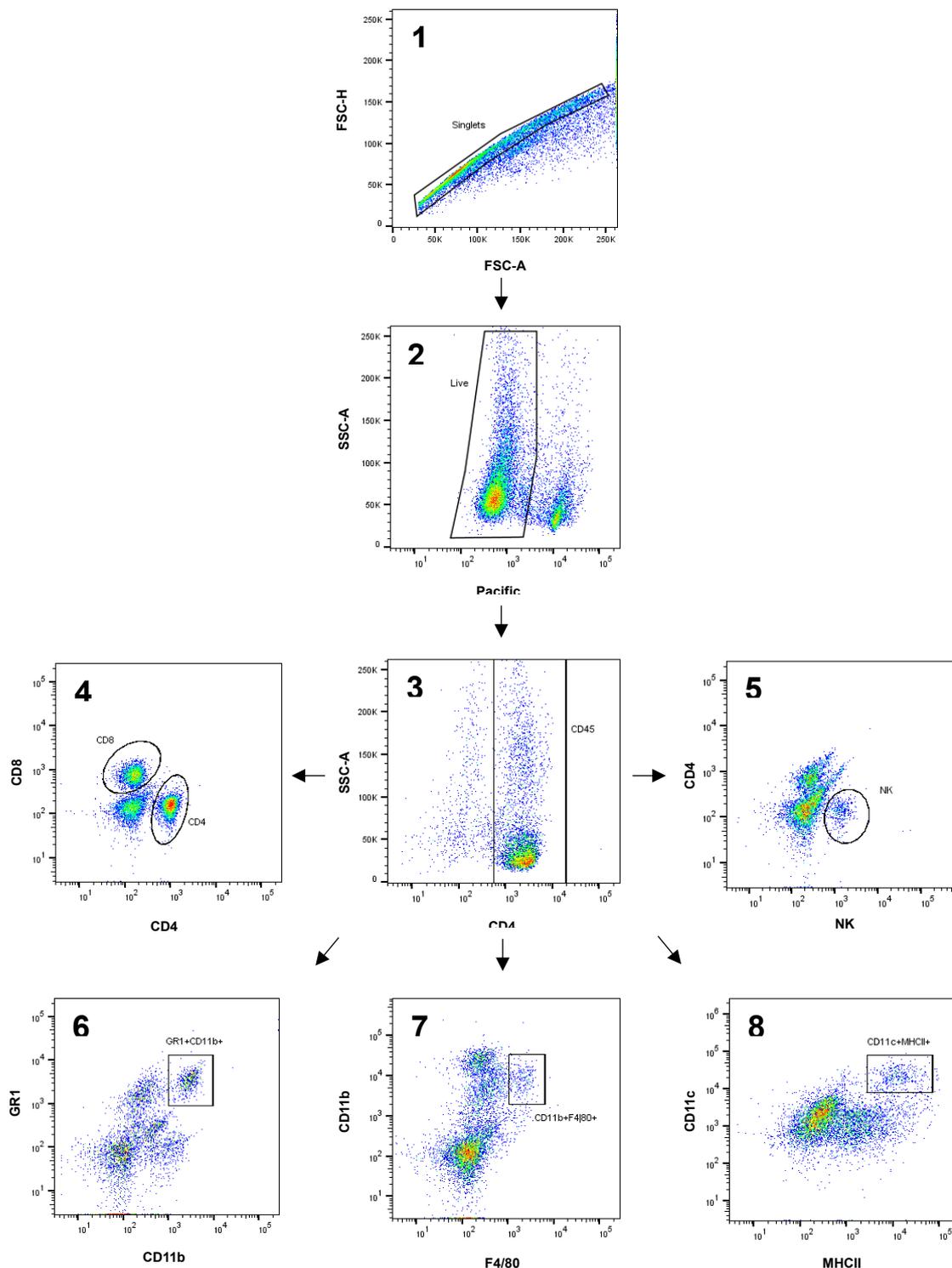


Fonte: próprio autor, 2023.

### 4.2.3 Imunofenotipagem

Para identificação das populações celulares presentes nos pulmões dos animais da linhagem AIRmin tratados com dose única de crotoxina e com múltiplas doses, foi realizada a marcação celular com anticorpos específicos dirigidos às moléculas de superfície das células T CD4, T CD8, NK, neutrófilos, células dendríticas e macrófagos. Para esta análise, foi adotada a estratégia de identificação das populações representada na **figura 24**.

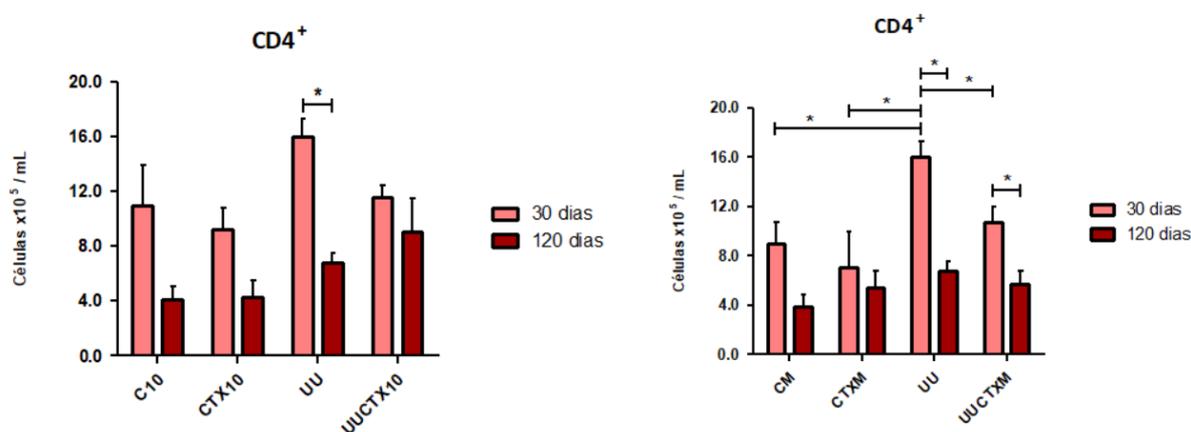
**Figura 24** - Estratégia adotada para análise das células responsáveis pela resposta inflamatória (neutrófilos) evidenciadas pela marcação GR1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> assim como as células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, NK<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> e CD11b<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>. A estratégia adotada para seleção das populações celulares iniciou-se com a exclusão das células duplicadas (1), e em seguida, foram eliminados os debris celulares (2). A população CD45<sup>+</sup> foi identificada, de modo a avaliar apenas os leucócitos (3). Em seguida, foram identificadas as populações celulares de interesse: linfócitos T CD4 e T CD8 (4), células NK (5), neutrófilos (6), macrófagos (7) e células dendríticas (8). As análises foram realizadas no programa FlowJo.



Fonte: próprio autor, 2023.

Na **figura 25** observamos o perfil de células T CD4 presente nos pulmões dos animais AIRmin. Em relação ao tratamento com dose única de crotoxina (16 µg/kg), podemos observar uma diminuição deste tipo celular no grupo UU dos 30 dias para os 120 dias. Já no tratamento com múltiplas doses de crotoxina (8 µg/kg), o grupo UU diferencia-se dos demais aos 30 dias, apresentando um maior número de células T CD4. Seria necessário a diferenciação deste tipo celular, de modo a determinar se são células T CD4 auxiliares ou células T regulatórias (Treg), uma vez que este tipos celulares apresentam diferentes papéis no que concerne ao desenvolvimento tumoral, sendo as células T CD4 auxiliares associadas a um prognóstico tumoral promissor em vários tipos de cânceres, e as células Treg a uma imunossupressão que favorece a progressão e desenvolvimento tumoral, no entanto, não foi possível realizar esta diferenciação com o anticorpo anti-FOXP3.

**Figura 25** - Análise de células T CD4 presentes nos pulmões dos animais da linhagem AIRmin com tratamento com dose única de crotoxina (16 µg/kg) (esquerda) e com múltiplas doses de crotoxina (8 µg/kg) (direita). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média ( $\bar{x} \pm EPM$ ) da concentração celular. \* São considerados significativos os valores  $p < 0,05$ .

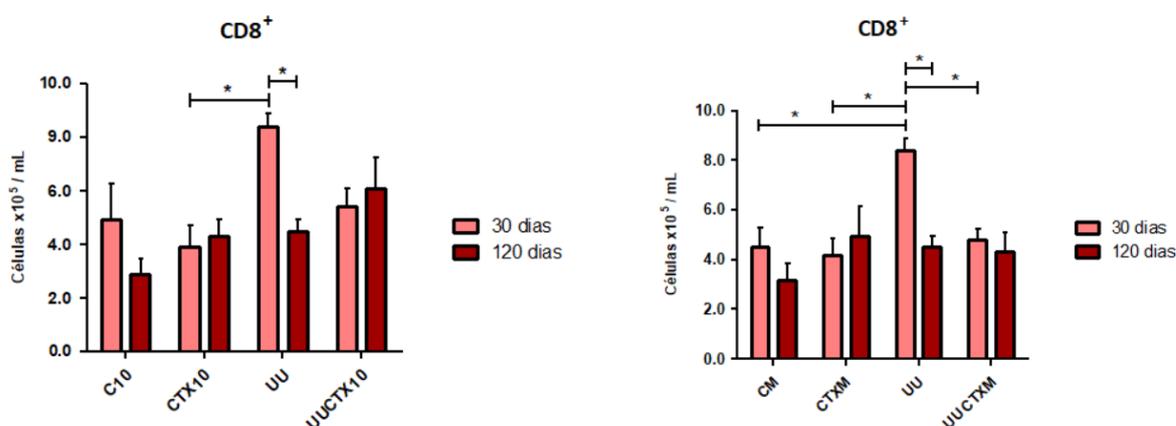


**Fonte:** próprio autor, 2023.

Podemos observar o perfil das células T CD8 na **figura 26**. No tratamento com uretana (UU), verificamos novamente uma diminuição significativa dos 30 para os 120 dias, o que pode revelar uma inibição de células T CD8, conseqüente de alterações no microambiente tumoral, favorecendo assim a progressão do tumor. Este perfil de diminuição de T CD8 é considerado um padrão de dinâmica celular após tratamento com Uretana. Nos tratamentos com CTX (UUCTX10 ou UUCTXM) não observamos qualquer alteração dessa população entre os tempos de 30 e 120 dias pós uretana.

Uma significativa diminuição no grupo UUCTXM em relação ao UU foi observado aos 30 dias. Isto pode acontecer devido a um processo mais acelerado no grupo onde não houve administração de CTX, havendo assim um recrutamento de células T CD8 maior, para combate a um tumor que se desenvolveu precocemente, condizendo com o gráfico de incidência deste grupo de tratamento (**Figura 14**), onde o grupo UU revelou uma incidência ligeiramente maior que os restantes grupos aos 30 dias.

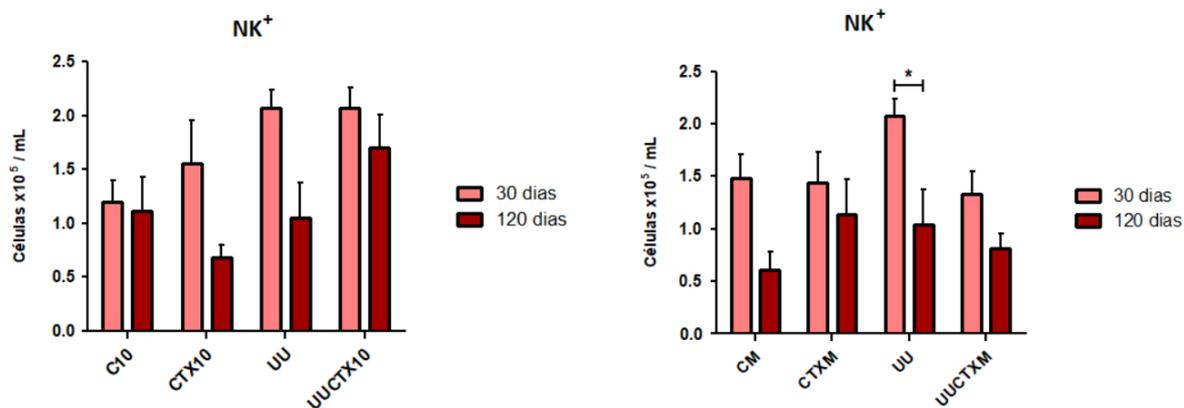
**Figura 26** - Análise de células T CD8 presentes nos pulmões dos animais da linhagem AIRmin com tratamento com dose única de crotoxina (16 µg/kg) (esquerda) e com múltiplas doses de crotoxina (8 µg/kg) (direita). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média ( $\bar{x} \pm EPM$ ) da concentração celular. \* São considerados significativos os valores  $p < 0,05$ .



Fonte: próprio autor, 2023.

No que concerne às células NK (**Figura 27**), não foi possível observar, em ambos os tratamentos, diferenças significativas relevantes. No entanto, assim como para as células T CD8, houve diminuição no grupo UU aos 120 dias, possivelmente devido às mesmas razões mencionadas anteriormente para as células T CD8.

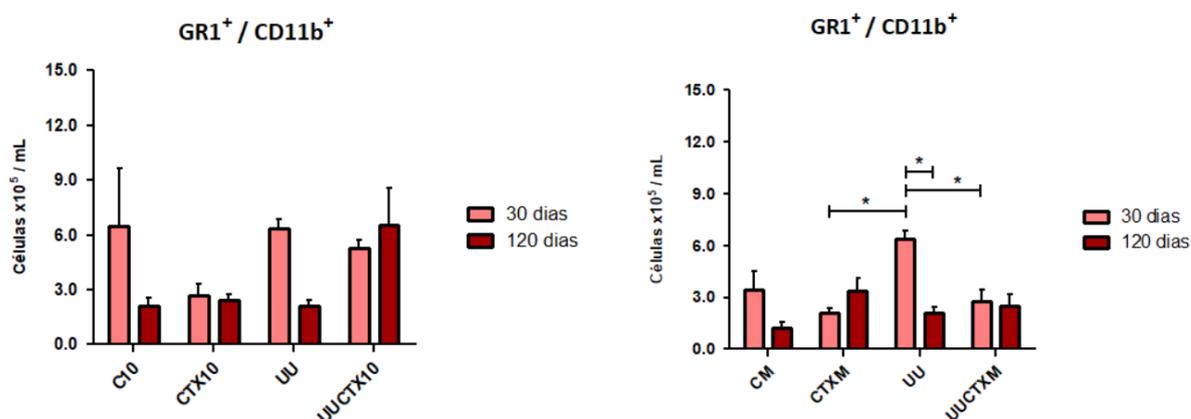
**Figura 27** - Análise de células NK presentes nos pulmões dos animais da linhagem AIRmin com tratamento com dose única de crotoxina (16 µg/kg) (esquerda) e com múltiplas doses de crotoxina (8 µg/kg) (direita). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média ( $\bar{x} \pm \text{EPM}$ ) da concentração celular. \* São considerados significativos os valores  $p < 0,05$ .



Fonte: próprio autor, 2023.

Em relação ao perfil das células neutrofílicas representado na **figura 28**, podemos apenas visualizar diferenças significativas no gráfico que representa o tratamento com múltiplas doses de crotoxina, sendo, mais uma vez, essas diferenças observadas apenas aos 30 dias. O grupo UU apresentou um maior número de células neutrofílicas do que os grupos onde foi administrada crotoxina, provavelmente devido à ação anti-inflamatória da mesma, já descrita na literatura.

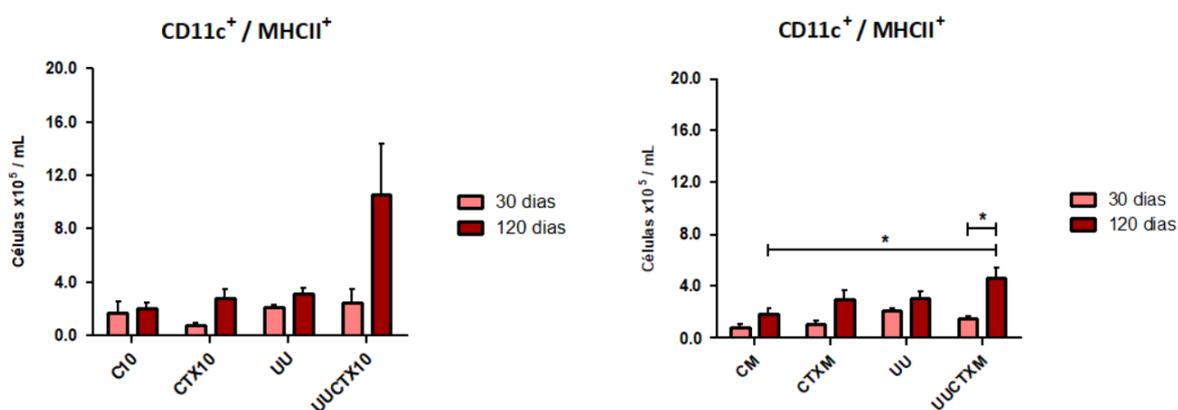
**Figura 28** - Análise de células neutrofílicas (GR1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>) presentes nos pulmões dos animais da linhagem AIRmin com tratamento com dose única de crotoxina (16 µg/kg) (esquerda) e com múltiplas doses de crotoxina (8 µg/kg) (direita). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média ( $\bar{x} \pm \text{EPM}$ ) da concentração celular. \* São considerados significativos os valores  $p < 0,05$ .



Fonte: próprio autor, 2023.

Não foi possível observar, em ambos os tratamentos, diferenças significativas entre o grupo UU e os grupos tratados UUCTX10 e UUCTXM, no perfil das células dendríticas (**Figura 29**). Apenas é possível visualizar um aumento significativo deste tipo celular dos 30 para os 120 dias no grupo UUCTXM.

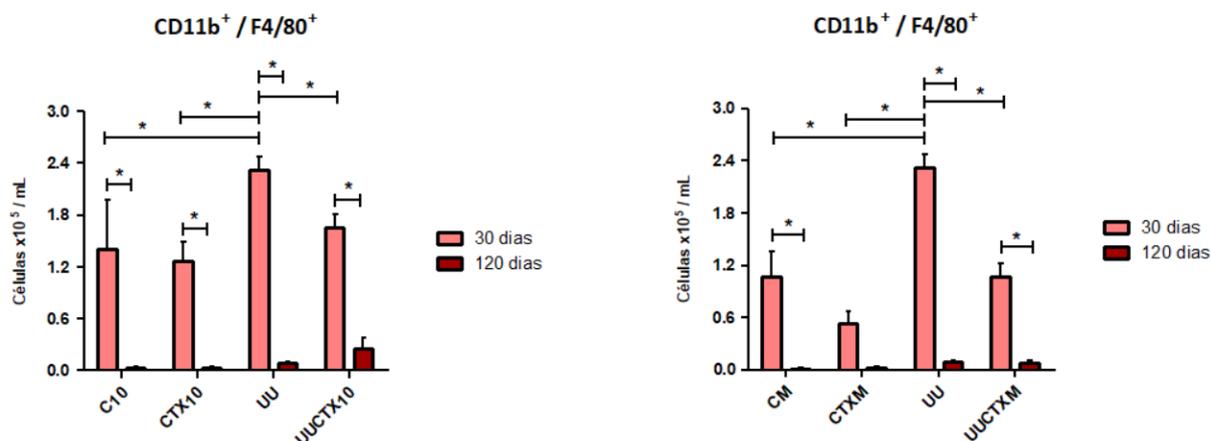
**Figura 29** - Análise de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>) presentes nos pulmões dos animais da linhagem AIRmin com tratamento com dose única de crotoxina (16 µg/kg) (esquerda) e com múltiplas doses de crotoxina (8 µg/kg) (direita). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média ( $\bar{x} \pm \text{EPM}$ ) da concentração celular. \* São considerados significativos os valores  $p < 0,05$ .



Fonte: próprio autor, 2023.

Na **figura 30**, é possível visualizar um desaparecimento de macrófagos em todos os grupos de tratamento, dos 30 dias para os 120 dias. Considerando o tempo de 30 dias, verificamos diminuições significativas destas células em decorrência dos tratamentos com CTX, efeito este semelhante ao ocorrido com os neutrófilos que, como células inflamatórias, podem ser inibidos pela CTX.

**Figura 30** - Análise de macrófagos ( $CD11b^+/F4/80^+$ ) presentes nos pulmões dos animais da linhagem AIRmin com tratamento com dose única de crotoxina ( $16 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) (esquerda) e com múltiplas doses de crotoxina ( $8 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) (direita). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $\bar{x} \pm \text{EPM}$ ) da concentração celular. \* São considerados significativos os valores  $p < 0,05$ .

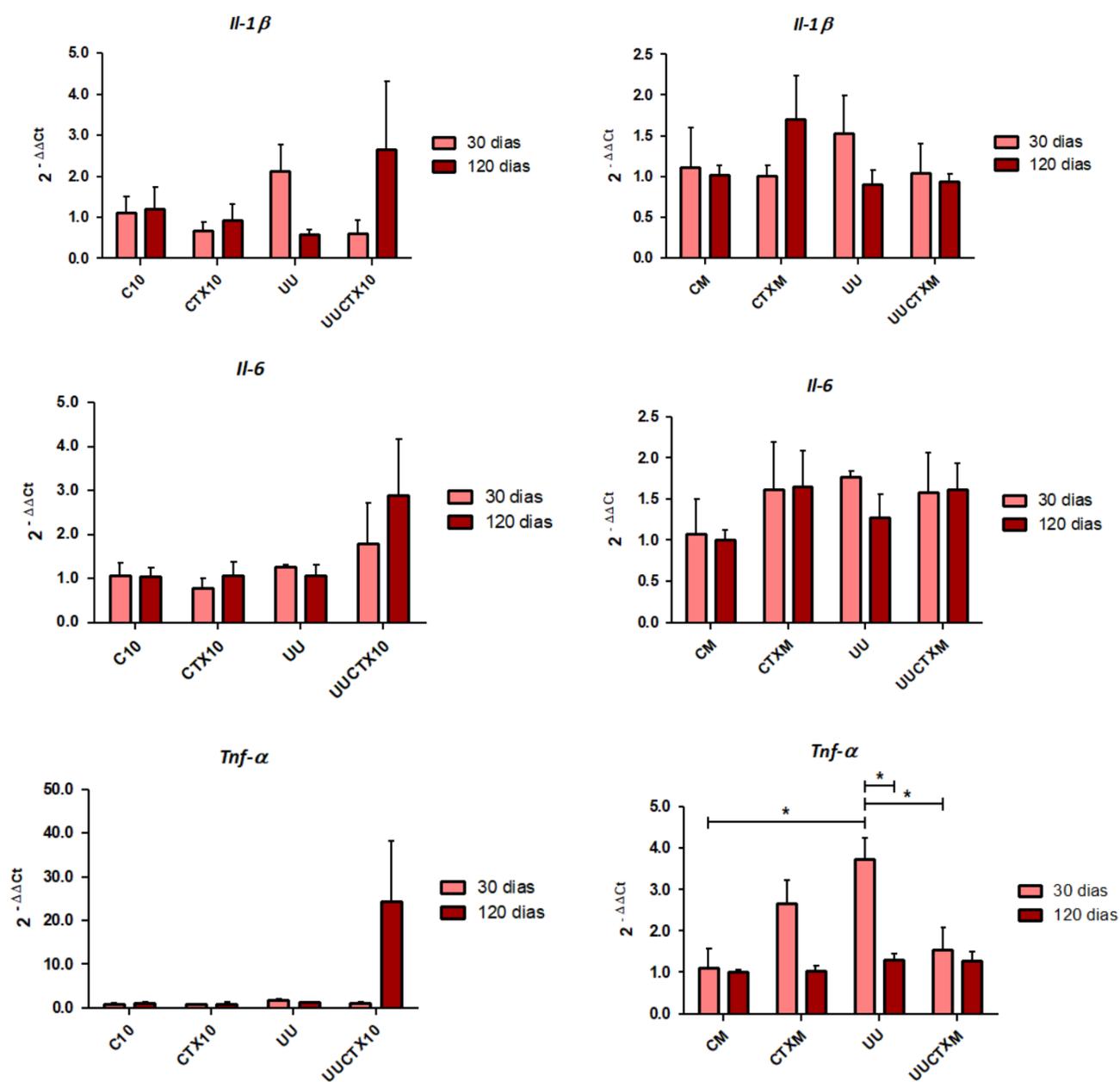


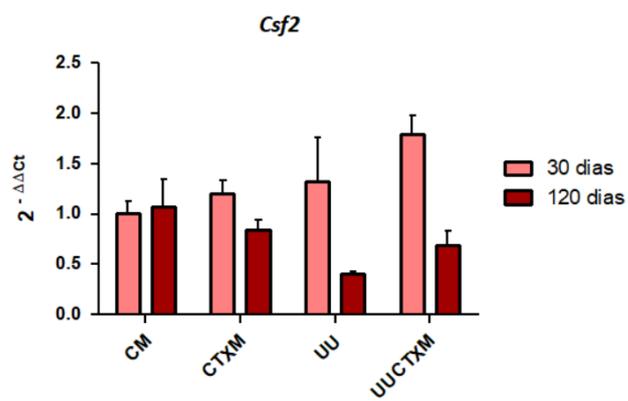
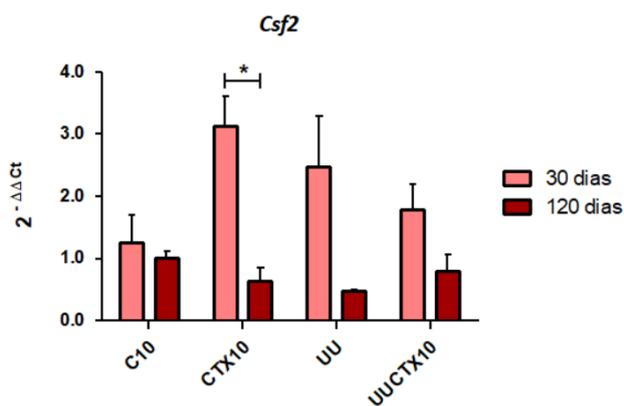
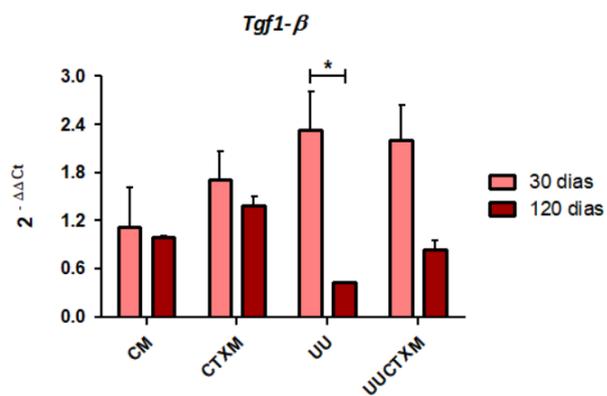
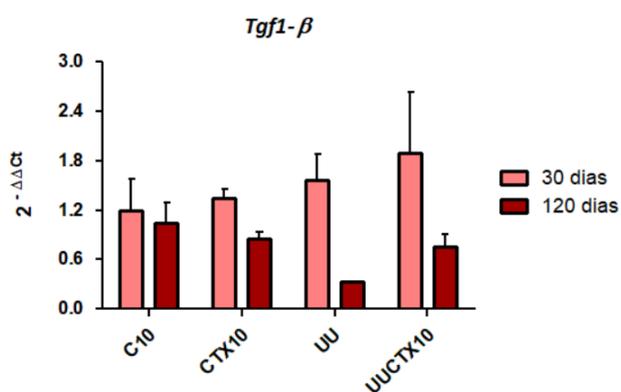
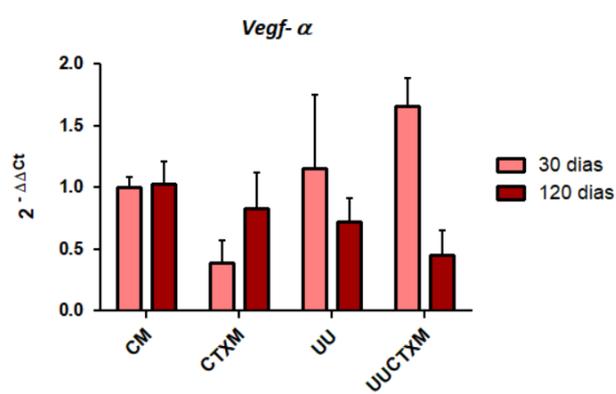
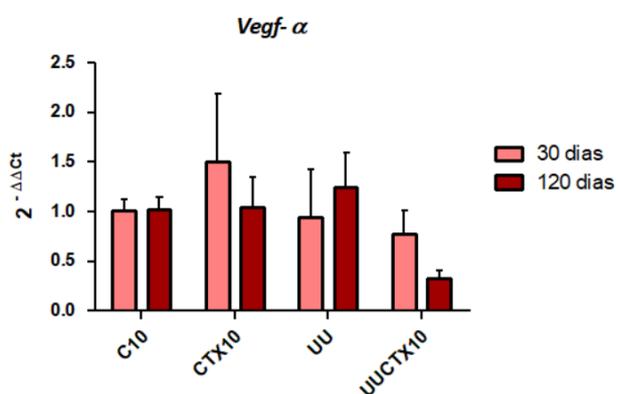
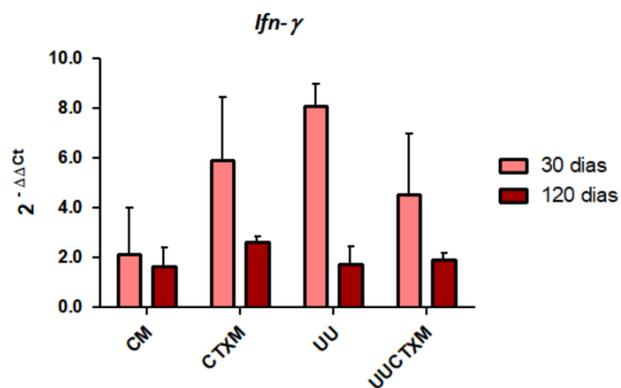
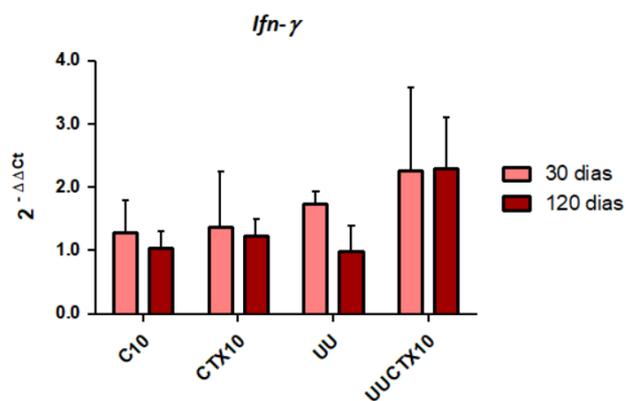
Fonte: próprio autor, 2023.

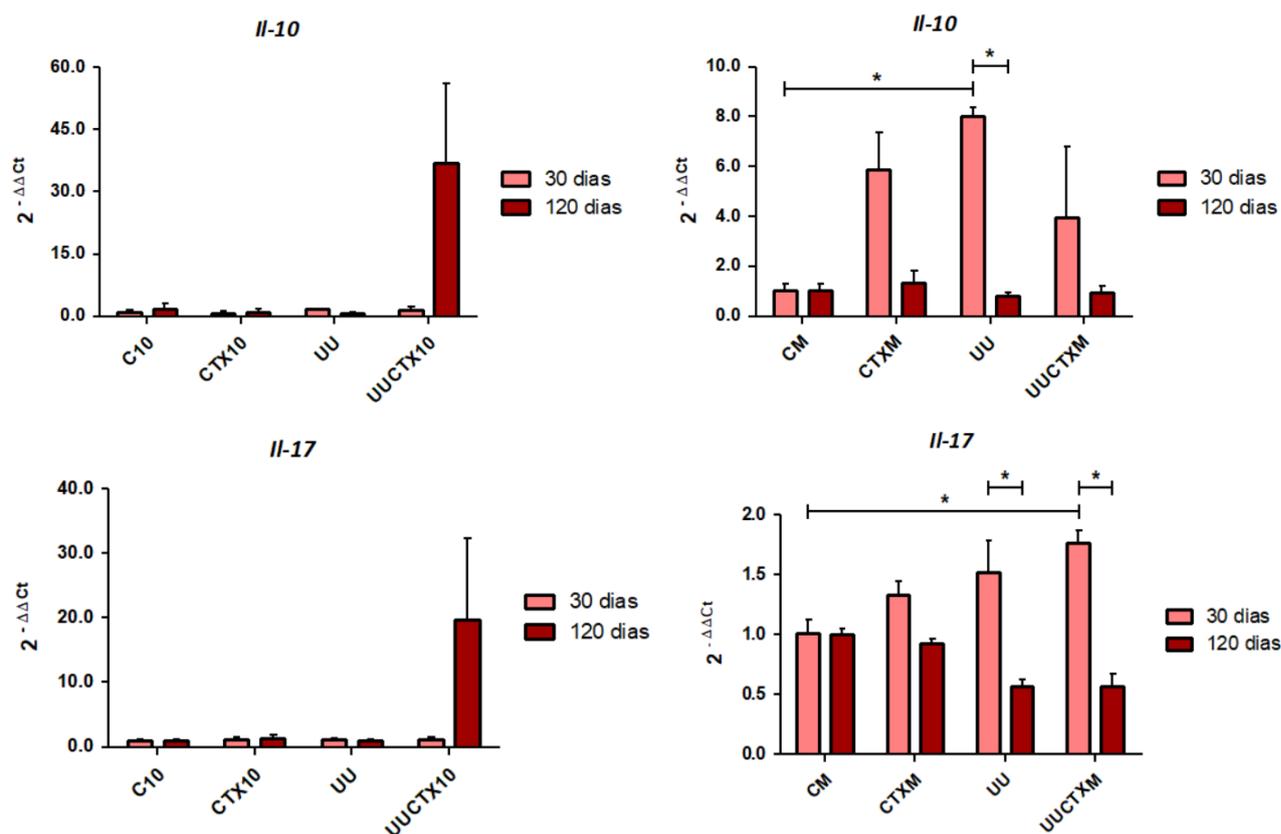
#### 4.2.4 Expressão de gênica de citocinas

A análise da expressão gênica foi realizada a partir da extração do RNA total dos pulmões dos animais da linhagem AIRmin. Na **figura 31**, podemos observar os gráficos referentes à expressão dos genes *Il1-β*, *Il-6*, *Tnf-α*, *lfn-y*, *Vegf-α*, *Tgf1-β*, *Csf2*, *Il-10* e *Il-17* para cada tratamento realizado.

**Figura 31** – Expressão gênica nos pulmões dos animais da linhagem AIRmin aos 30 e 120 dias de tratamento com uma dose única de CTX (esquerda) e múltiplas doses de CTX (direita). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $\bar{x} \pm$  EPM). \* São considerados significativos os valores  $p < 0,05$ .







Fonte: próprio autor, 2023.

Não é possível constatar diferenças significativas na expressão dos genes analisados em ambos os tratamentos, quando comparamos o grupo UU e UUCTX10 ou UUCTXM, exceto na expressão do gene *Tnf-α*, que se diferencia aos 30 dias no grupo de tratamento com doses múltiplas de crotoxina. A expressão de *Tnf-α* em tumores tem sido debatida, podendo apresentar um papel de supressão da proliferação de células tumorais promovendo a regressão do tumor, ou um papel favorável ao desenvolvimento tumoral e metástase. Uma vez que não foi possível observar diferenças aos 120 dias na incidência e multiplicidade no grupo tratado com múltiplas doses de crotoxina em relação ao grupo UU, a interpretação do papel do *Tnf-α* no câncer induzido, nestas condições específicas, torna-se mais complexa.

Com relação à *Il-10*, verificamos um aumento significativo do potencial de produção desta citocina aos 30 dias nos animais tratados com uretana (UU) o que pode indicar uma tentativa do organismo de inibir as reações inflamatórias associadas ao tumor.

Quanto à *IL-17*, verificamos diminuição significativa aos 120 dias nos grupos onde foi induzido tumor por administração de uretana. Este fato poderia estar relacionado com a evolução tumoral, pois esta citocina está associada com angiogênese. No entanto esta associação não é direta pois não houve diminuição de tumorigênese no grupo UU aos 120 dias.

## 5 DISCUSSÃO

Entre todos os tipos existentes de câncer, o pulmonar é o responsável pelo maior número de óbitos mundialmente. Seu prognóstico é, geralmente, pouco promissor devido ao diagnóstico num estágio frequentemente tardio. O sistema imune tem o potencial de reconhecer e eliminar células malignas, no entanto, a presença de tumores envolve mecanismos de evasão que resultam em um microambiente imunossupressor, sinalização anormal de células T e aumento da atividade das células inibitórias que seriam responsáveis por evitar um ataque indiscriminado contra células próprias (SAAB et al., 2020).

O microambiente tumoral é complexo e rico em células que podem promover ou suprimir o crescimento tumoral. Desta forma, qualquer alteração pode desencadear um prognóstico tumoral diferente (ANDERSON; SIMON, 2020).

Neste estudo, avaliamos o papel da CTX na modulação da carcinogênese pulmonar induzida por URT em camundongos da linhagem AIRmax e AIRmin, considerando os seus efeitos “antitumorais”, anti-inflamatórios e/ou imunomoduladores descritos na literatura (FREITAS et al., 2018; NUNES et al., 2010; WANG et al., 2014). O real efeito antitumoral da crotoxina só foi descrito experimentalmente em 2023 por Da Rocha e colaboradores que demonstraram um efeito inibidor parcial de carcinoma de boca em camundongos *Swiss*, com diminuição significativa das lesões de células escamosas após tratamento com 10 µg/kg de crotoxina (DA ROCHA et al., 2023).

Em relação ao modelo animal adotado, as duas linhagens AIRmax e AIRmin adquiriram, ao longo do processo seletivo, alelos de efeitos opostos no locus *pas1*, resultando em diferenças no fenótipo de resistência e susceptibilidade à carcinogênese pulmonar induzida por URT, sendo os animais AIRmax resistentes (*pas1<sup>r</sup>*) e os animais AIRmin susceptíveis (*pas1<sup>s</sup>*), como descrito por Maria et al. (2003). Essa correlação sugere ligação funcional entre AIR e a tumorigênese (RIBEIRO et al., 2005). O principal efector do locus *pas1* é o gene *kras*, responsável pela indução de tumores através da administração de URT (DASSANO et al., 2014; SOZIO et al., 2021). Sendo assim, devido à diferença no aparecimento de lesões nas linhagens, no qual os animais AIRmax apresentam lesões pequenas num período

tardio, enquanto, os animais AIRmin apresentam lesões de maiores dimensões precocemente, é possível que a expressão do gene *kras* nos animais AIRmax seja menor, em comparação com os animais AIRmin. Estudo recente nestas linhagens indicou a participação de genes que codificam a transcrição de fatores angiogênicos, de proteção ao DNA e de ativação do complexo inflamassomo, além de genes que codificam mediadores que modulam a atividade de células imunocompetentes (BORREGO et al., 2022).

Considerando os resultados das análises das lesões tumorais nos pulmões dos animais AIRmax e AIRmin, podemos concluir que o fenótipo de resistência e susceptibilidade descrito por Ribeiro et al. (2005) se manteve, não apresentando nenhuma alteração com os tratamentos de CTX. No primeiro experimento realizado, no qual a CTX foi aplicada 10 dias após a administração de URT numa concentração de 8 µg/kg, observamos que o grupo de tratamento UU não se diferencia do grupo de tratamento com CTX associada, que, mesmo apresentando um menor número de lesões, não apresentou significância, não evidenciando, portanto, qualquer papel antitumoral da CTX nesse grupo de tratamento.

Nas demais análises, o grupo de tratamento UUCTX10 apresentou resultados com um perfil distinto, principalmente, nas histologias, onde esse grupo apresentou lesões menos invasivas, o que pode evidenciar que a administração de CTX aos 10 dias após URT pode ser considerada uma abordagem razoável na tentativa de inibição da carcinogênese pulmonar.

No que concerne à celularidade, nestas condições, apenas foi possível observar diferenças significativas no perfil de células T CD8 e células mieloderivadas imaturas pela expressão da molécula CD38, células com fenótipo GR1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> (RIBEIRO et al., 2003). Estas podem representar um grupo de células supressoras (MDSCs) com propriedades inibitórias de células citotóxicas pelo consumo de arginase do microambiente tumoral (VANHAVER; VAN DER BRUGGEN; BRUGER, 2021), propriedade verificada experimentalmente pelo nosso grupo do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan (TAMIRIS ISABELA GUIDUGLI, 2019).

Os linfócitos T CD8 são células citotóxicas que eliminam células cancerígenas, suprimem a angiogênese, e estão geralmente associadas a um prognóstico positivo

em pacientes com câncer (ANDERSON; SIMON, 2020). Desta forma, era esperado uma presença populacional maior desses linfócitos no grupo tratado com CTX devido à sua ação antitumoral descrita na literatura, com experimentos realizados *in vitro* (WANG et al., 2014; YE et al., 2011). No entanto, no grupo UUCTX10 foi observada uma menor concentração dessas células quando comparada ao grupo que recebeu apenas uretana (UU) aos 30 e 120 dias, o que poderia refletir uma imunossupressão pela crotoxina ou por células mieloides supressoras presentes (MDSC).

As células MDSC possuem características de neutrófilos ou macrófagos e apresentam função imunossupressora, favorecendo o crescimento tumoral através da supressão da atividade dos linfócitos T citotóxicos, mediando a imunossupressão do tumor (JAYARAMAN et al., 2012; TSUBAKI et al., 2018). Verificamos que o grupo de tratamento UUCTX10 diferencia-se aos 120 dias de tratamento do grupo UU, apresentando uma quantidade menor deste tipo celular, o que, possivelmente, se reflete na leve diminuição na multiplicidade de lesões. No entanto, seria necessário demonstrar essa eventual função supressora em ensaios *in vitro* de inibição de proliferação de linfócitos.

Na tentativa de inibição da carcinogênese pulmonar induzida por URT, foi testada uma nova abordagem em um segundo experimento, no qual foram estabelecidos dois grupos de tratamento: 1 – com uma dose única de crotoxina aplicada 10 dias após a administração de URT numa concentração de 16 µg/kg, de modo a averiguar se uma concentração maior resultaria em melhor inibição nos fenótipos de multiplicidade ou incidência e 2 – com múltiplas doses (8 µg/kg) de crotoxina administradas a cada 10 dias, de modo a avaliar o papel da crotoxina quando aplicada continuamente. Adicionalmente, neste segundo experimento, apenas foram analisados os animais AIRmin, de modo a ter uma melhor visão do papel da crotoxina numa linhagem susceptível, assim como foram escolhidos apenas dois tempos para análise, os 30 dias, para observação do início da formação do processo tumoral, e os 120 dias, onde a tumorigênese já estaria instalada.

Tendo em conta os resultados das análises fenotípicas de multiplicidade e incidência, não foi observado qualquer efeito inibitório pela crotoxina oferecida em uma única dose de 16 µg/kg ou em doses múltiplas de 8 µg/kg, indicando que o uso de doses maiores não melhora o efeito inibitório esperado. Ao contrário, a dose de 8 µg/kg aplicada uma única vez foi, aparentemente, mais eficaz na redução de

multiplicidade e incidência se considerarmos apenas os valores médios do número de lesões ou de animais acometidos. De fato, o uso de doses menores de crotoxina para modulação de eventos imunológicos e farmacológicos foi abordado por Sant'Anna em 2019 em estudo de analgesia pela crotoxina (SANT'ANNA et al., 2019).

Além dos dados fenotípicos, a dinâmica celular avaliada em condições de tumorigênese não evidenciou diferenças importantes sob influência dos tratamentos com crotoxina. As células T CD8 e NK, responsáveis pela citotoxicidade tumoral, apresentaram diminuição aos 120 dias, enquanto o número de lesões aumentou, evidenciando uma correlação negativa. Este perfil pode estar relacionado com a presença de células imunossupressoras, MDSC e células T regulatórias (Treg).

A população de células inflamatórias clássicas como neutrófilos (CD11b/GR1) e macrófagos (CD11b/F4/80) também estiveram aumentados no período inicial, caracterizando um processo inflamatório crônico associado à tumorigênese em todos os grupos. Diferente dos macrófagos, onde as concentrações foram diminuídas, os neutrófilos mantiveram-se nos mesmos níveis aos 120 dias. Este perfil pode estar associado à função imunossupressora destas células de fenótipo G-MDSC ou PMN-MDSC (VANHAVER; VAN DER BRUGGEN; BRUGER, 2021). Quanto aos macrófagos, estes podem constituir as células associadas ao tumor (TAM), favorecendo a evolução do tumor por neovascularização e metástase, embora significativamente diminuídos nos grupos tratados com crotoxina.

No estudo de expressão gênica de citocinas pro- e anti-inflamatórias, verificamos que houve uma condição propícia para a resposta a uretana onde fatores imunossupressores, inflamatórios e hematopoiéticos estiveram elevados nesse grupo no início da tumorigênese aos 30 dias. Aos 120 dias essas expressões de TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-17 estiveram diminuídas, o que pode favorecer as alterações na evolução tumoral. A expressão gênica do TNF- $\alpha$  esteve aumentada no início da tumorigênese no grupo uretana (UU) aos 30 dias na provável tentativa de eliminar o tumor. Este entendimento não se aplicaria ao grupo tratado com crotoxina múltipla. É importante ressaltar que se trata de expressão gênica relativa, portanto susceptível a alterações pós-transcricionais.

No que concerne à análise histopatológica, os dois tratamentos revelaram um efeito modulatório na evolução da tumorigênese, no qual é evidente uma redução da

massa neoplásica quando comparados com o grupo tratado com uretana (UU). Ainda, entre os tratamentos, os mesmos se diferenciam, sendo que o grupo UUCTXM apresenta extensas áreas de necrose, sem indícios de metástase, já o grupo UUCTX10, apesar de revelar um processo inflamatório intenso, que, supostamente, influenciaria o desenvolvimento maligno, parece promover a desorganização estrutural do nódulo neoplásico, reduzindo os tapetes celulares hepatizados que caracterizam a malignidade da neoplasia, assim como não apresentou áreas de necrose diferenciadas. Sendo assim, o grupo de tratamento UUCTX10 parece apresentar menor malignidade quando comparado ao grupo UU, e o grupo UUCTXM, uma redução na massa neoplásica. É possível também ressaltar a presença de infiltrado inflamatório nos grupos UUCTX10 e CTX10 enquanto o mesmo processo não foi verificado nos animais dos grupos UUCTXM e CTXM, podendo dever-se ao papel anti-inflamatório da crotoxina, que, na segunda abordagem, é aplicada continuamente.

Resultados semelhantes de evolução tumoral foram também observados no estudo de tumorigênese oral, onde a crotoxina, administrada intraperitonealmente, também interferiu na estrutura e evolução neoplásica (DA ROCHA et al., 2023).

Assim, estudos deverão ser desenvolvidos no sentido de melhor esclarecer os mecanismos operantes no controle da evolução maligna pela administração da crotoxina em animais geneticamente heterogêneos.

## 6 CONCLUSÃO

Este trabalho foi desenvolvido com o intuito de estudar o papel da CTX *in vivo* na modulação da carcinogênese pulmonar induzida por uretana. Ao longo da realização do trabalho observamos que o tratamento com uretana confirmou o fenótipo de resistência e susceptibilidade das linhagens AIRmax e AIRmin, respectivamente, mesmo quando administrados com CTX. No entanto, no que concerne à multiplicidade e incidência de lesões, nenhum dos tratamentos com CTX revelou um efeito inibidor. Já na análise histopatológica, foi possível observar diferenças nos grupos tratados, onde a administração de CTX indicia um possível e promissor efeito terapêutico na redução da malignidade neoplásica, por meio da desorganização estrutural do nódulo neoplásico no grupo UUCTX10 (16 µg/kg), além da inibição de metástase no grupo UUCTXM (8 µg/kg). Estes efeitos foram constatados inicialmente e confirmados no segundo experimento.

Verificamos que quando a CTX foi aplicada numa concentração menor na primeira abordagem (8 µg/kg), resultou numa menor multiplicidade de lesões tumorais no grupo UUCTX10, do que quando aplicada numa concentração maior (16 µg/kg). Sugerindo assim, que doses menores de CTX parecem ser mais eficazes na tentativa de inibição da carcinogênese pulmonar.

Assim, entendemos que seriam necessários estudos *in vivo* mais aprofundados de modo a verificar a capacidade antitumoral da CTX, uma vez que os fenótipos celulares e moleculares não evidenciaram claramente os mecanismos operantes na modulação da malignidade pela CTX sob as condições trabalhadas.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

AEGERTER, H.; LAMBRECHT, B. N.; JAKUBZICK, C. V. Biology of lung macrophages in health and disease. **ImmunityCell Press**, 13 set. 2022.

ALMEIDA, T. C. et al. Cytotoxic effect of crotoxin on cancer cells and its antitumoral effects correlated to tumor microenvironment: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, Elsevier B.V., 1 jul. 2023.

ANDERSON, N. M.; SIMON, M. C. The tumor microenvironment. **Current Biology**, v. 30, n. 16, p. R921–R925, ago. 2020.

BORREGO, A. et al. Mapping of novel loci involved in lung and colon tumor susceptibility by the use of genetically selected mouse strains. **Genes & Immunity**, v. 23, n. 1, p. 23–32, 29 fev. 2022.

CARDOSO, D. F. et al. Role of crotoxin, a phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. **Mediators of Inflammation**, v. 10, n. 3, p. 125–133, 2001.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, 26 dez. 2002.

CRUZ, L. S.; VARGAS, R.; LOPES, A. A. Snakebite envenomation and death in the developing world. **Ethnicity & disease**, v. 19, n. 1 Suppl 1, p. S1-42–6, 2009.

CURA, J. E. et al. Phase I and Pharmacokinetics Study of Crotoxin (Cytotoxic PLA 2, NSC-624244) in Patients with Advanced Cancer 1, **Clinical Cancer Research**. [s.l: s.n.].

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, p. 106965, jan. 2023.

DASSANO, A. et al. Mouse Pulmonary Adenoma Susceptibility 1 Locus Is an Expression QTL Modulating Kras-4A. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 4, 2014.

---

<sup>1</sup> De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2022.

DENG, J.; FLEMING, J. B. Inflammation and Myeloid Cells in Cancer Progression and Metastasis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Frontiers Media S.A., 21 jan. 2022.

DUAN, Z.; LUO, Y. Targeting macrophages in cancer immunotherapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **Springer Nature**, 1 dez. 2021.

DUBINETT, S. M. Inflammation and Lung Cancer. New York, NY: **Springer New York**, 2015.

FRARE, B. T. et al. Clinical, Laboratory, and Therapeutic Aspects of *Crotalus durissus* (South American Rattlesnake) Victims: A Literature Review. **BioMed Research International**, Hindawi Limited, 2019.

FREITAS, A. P. et al. Crotoxin Isolated from *Crotalus durissus terrificus* Venom Modulates the Functional Activity of Dendritic Cells via Formyl Peptide Receptors. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, 2018.

GIULIETTI, A. et al. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 386–401, dez. 2001.

GORDON, S. Pattern Recognition Receptors. **Cell**, v. 111, n. 7, p. 927–930, dez. 2002.

HAN, R. et al. Crotoxin induces apoptosis and autophagy in human lung carcinoma cells in vitro via activation of the p38MAPK signaling pathway. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 35, n. 10, p. 1323–1332, 1 out. 2014.

IBANEZ, O. M. et al. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 10, p. 2555–2563, out. 1992.

JAYARAMAN, P. et al. Tumor-Expressed Inducible Nitric Oxide Synthase Controls Induction of Functional Myeloid-Derived Suppressor Cells through Modulation of Vascular Endothelial Growth Factor Release. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 11, p. 5365–5376, 1 jun. 2012.

KWON, M. CHUL; BERNIS, A. Mouse models for lung cancer. **Molecular Oncology**. John Wiley and Sons Ltd, 2013.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, out. 2002.

LIU, P. et al. Candidate lung tumor susceptibility genes identified through whole-genome association analyses in inbred mice. **Nature Genetics**, v. 38, n. 8, p. 888–895, ago. 2006.

LUO, G. et al. Projections of Lung Cancer Incidence by 2035 in 40 Countries Worldwide: Population-Based Study. **JMIR Public Health and Surveillance**, v. 9, 2023.

MARIA, D. A. et al. Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas1) locus affects inflammatory response. **Oncogene**, v. 22, n. 3, p. 426–432, 23 jan. 2003.

MEDIONI, J. et al. Innovative design for a phase 1 trial with intra-patient dose escalation: The Crotoxin study. **Contemporary Clinical Trials Communications**, v. 7, p. 186–188, 1 set. 2017.

MIRET, J. J. et al. Suppression of Myeloid Cell Arginase Activity leads to Therapeutic Response in a NSCLC Mouse Model by Activating Anti-Tumor Immunity. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 7, n. 1, p. 32, 6 dez. 2019.

MOLDOVEANU, B. et al. Inflammatory mechanisms in the lung. **Journal of Inflammation Research**. [s.l: s.n.], 2009.

NAKANO-NARUSAWA, Y. et al. Relationship between lung carcinogenesis and chronic inflammation in rodents. **Cancers**. MDPI, 2 jun. 2021.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **KRAS gene**. Disponível em: <<https://medlineplus.gov/genetics/gene/kras/>>. Acesso em: 19 set. 2022.

NUNES, F. P. B. 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, jun. 2010.

PEREIRA, F. et al. KRAS as a Modulator of the Inflammatory Tumor Microenvironment: Therapeutic Implications. **Cells**, v. 11, n. 3, 1 fev. 2022.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24–29, mar. 2001.

QUAIL, D. F. et al. Neutrophil phenotypes and functions in cancer: A consensus statement. **Journal of Experimental Medicine**. Rockefeller University Press, , 6 jun. 2022.

RIBEIRO, O. G. et al. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, n. 4, p. 497–506, 1 out. 2003.

RIBEIRO, O. G. et al. Genetic Selection for High Acute Inflammatory Response Confers Resistance to Lung Carcinogenesis in the Mouse. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, n. 4, p. 497–506, 2005.

SAAB, S. et al. Insights Into Lung Cancer Immune-Based Biology, Prevention, and Treatment. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 11 fev. 2020.

SANT'ANA MALAQUE, C. M.; GUTIÉRREZ, J. M. Snakebite Envenomation in Central and South America. Em: **Critical Care Toxicology**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 1–22.

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, 20 nov. 2019.

SANTOS, M. DE O. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 6 fev. 2023.

SARTIM, M. A.; MENALDO, D. L.; SAMPAIO, S. V. Immunotherapeutic potential of Crotoxin: anti-inflammatory and immunosuppressive properties. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 39, 17 dez. 2018.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 5 jun. 2008.

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

SOZIO, F. et al. Urethane-induced lung carcinogenesis. Em: **Methods in Cell Biology**. [s.l.] Academic Press Inc., 2021. v. 163p. 45–57.

STIFFEL, C. et al. Genetics of acute inflammation: inflammatory reactions in inbred lines of mice and in their interline crosses. **Experimental and clinical immunogenetics**, v. 7, n. 4, p. 221–233, 1990.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.

GUIDUGLI, TAMIRIS ISABELA. **Estudo das células mieloderivadas supressoras na tumorigênese pulmonar em camundongos selecionados para máxima ou mínima resposta inflamatória aguda**. 2019. 124 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

TSUBAKI, T. et al. Novel adherent CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> tumor-infiltrating cells initiate an immunosuppressive tumor microenvironment. **Oncotarget**, v. 9, n. 13, p. 11209–11226, 16 fev. 2018.

VANHAVER, C.; VAN DER BRUGGEN, P.; BRUGER, A. M. MDSC in Mice and Men: Mechanisms of Immunosuppression in Cancer. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 13, p. 2872, 28 jun. 2021.

WAKAMATSU, N. et al. Overview of the Molecular Carcinogenesis of Mouse Lung Tumor Models of Human Lung Cancer. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 1, p. 75–80, 25 jan. 2007.

WANG, J. et al. Crotoxin suppresses the tumorigenic properties and enhances the antitumor activity of Iressa® (gefitinib) in human lung adenocarcinoma SPCA-1 cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 10, n. 6, p. 3009–3014, 1 dez. 2014.

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