

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

Heloisa Martins Padilha Gonçalves

Imunomodulação por frações de veneno de *Bothrops alternatus* em células mononucleares de sangue periférico

São Paulo

2024

Heloisa Martins Padilha Gonçalves

Imunomodulação por frações de veneno de *Bothrops alternatus* em células mononucleares de sangue periférico

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

Orientador (a): Carla Cristina Squaiella Baptistão

São Paulo

2024

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

Padilha Gonçalves, Heloisa Martins

Imunomodulação por frações de veneno de *Bothrops alternatus* em células mononucleares de sangue periférico / Heloisa Martins Padilha Gonçalves ; orientador(a) Carla Cristina Squaiella Baptistão - São Paulo, 2024.

36 p. : il.

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

Versão corrigida final

1. *Bothrops alternatus* 2. Veneno. 3. Imunomodulação. 4. Adjuvantes I. Squaiella Baptistão, Carla Cristina. II. Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Toxinas de Interesse em Saúde. IV. Título.

Geração por Sistema Automatizado.

Bibliotecária Bruna Marques CRB8-9303 - Responsável Técnica

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, **Heloisa Martins Padilha Gonçalves**, aluno(a) do Curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

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

Imediato

06 meses

12 meses

Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 10 de janeiro de 2024.

Heloisa M.P. Gonçalves
aluno(a)

De acordo: Laura Cristina Squaiella Baptista
Orientador(a)

Ao meu marido Phelipe e minha mãe Elisângela, agradeço pelo apoio e carinho em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Carla e ao pesquisador colaborador Fábio.

À toda equipe do laboratório de Imunoquímica.

À turma do curso de Toxinas, especialmente à Mariana, pela alegre companhia nos cafés e à Fernanda, pela parceria de aprendizados na bancada.

À minha espiritualidade, por toda a força e abertura de caminhos.

Este trabalho teve apoio financeiro da Secretaria de Estado de Saúde do Estado de São Paulo.

“A ciência é o grande antídoto do veneno do entusiasmo e da superstição.”

Adam Smith

RESUMO

PADILHA-GONÇALVES, Heloisa Martins. **Imunomodulação por frações de veneno de *Bothrops alternatus* em células mononucleares de sangue periférico**. 2024. 35 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2024.

Os adjuvantes são utilizados para melhorar a imunogenicidade de antígenos de uma vacina, de forma a auxiliar a retenção dos mesmos no organismo e/ou melhorar sua rota de entrega. Atualmente, os adjuvantes com uso predominante e com licença de uso são os sais de alumínio. Os venenos de serpentes são fontes ricas de proteínas e moléculas com potenciais tóxicos, mas também farmacológicos. A *Bothrops alternatus*, popularmente conhecida como Urutu-Cruzeiro, é uma serpente peçonhenta da família Viperidae que está distribuída em países da América do Sul e no Sul e Sudeste do território brasileiro. A ação inflamatória do veneno botrópico é causada por conjuntos de frações com especificidades diversas e substâncias heterogêneas. Essas frações induzem a liberação de substâncias complexas do processo inflamatório. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito imunomodulador de frações de veneno de *B. alternatus* em culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano. Estudando as citocinas liberadas por essas células e isolando as frações que tiverem melhor função pró-inflamatória poderá ser possível avançar em estudos de possíveis novos adjuvantes. Foram realizados: Fracionamento do veneno por cromatografia de exclusão molecular; Dosagem protéica do veneno por método de BCA; Eletroforese em gel de poliacrilamida; Cultura de PBMC estimulada com as frações; Análise de viabilidade celular por ensaio de MTT; Dosagens de citocinas e quimiocinas por ensaio de CBA (Cytometric Bead Array). O fracionamento resultou em 10 frações, cujos perfis foram avaliados em gel de poliacrilamida 12,5%, corados com prata. Foram realizadas culturas de PBMC, que foram estimuladas com as frações de veneno em concentrações de 5 e 10 µg/mL. Com exceção da fração 3, as demais frações não apresentaram efeito citotóxico, avaliado pelo método de MTT. As

frações 8, 9 e 10 induziram aumento da produção de TNF, IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-8 em relação aos controles negativos. Ao avançar com os estudos, talvez seja possível purificar tais frações em busca de uma molécula que possa ser utilizada como um possível novo adjuvante.

Palavras-chave: *Bothrops alternatus*; Veneno; Imunomodulação; Adjuvantes; PBMC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Cromatograma do veneno de <i>Bothrops alternatus</i>	22
Figura 2 - Géis de eletroforese com corrida das frações de veneno diluídas em amostras redutoras e não redutoras.	24
Figura 3 - Gráficos de viabilidade de MTT	26
Figura 4- Gráficos dos resultados de CBA de sobrenadantes estimulados com 5 µg/mL de frações de veneno.	27
Figura 5- Gráficos dos resultados de CBA de sobrenadantes estimulados com acetato de amônio.	28
Figura 6- Gráficos dos resultados de CBA de sobrenadantes estimulados com 10 µg/mL de frações de veneno.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dosagem protéica	22
Tabela 2 - Cálculos das dosagens das frações de veneno	23

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
1.1. Vacinas e adjuvantes	15
1.2. Venenos e imunomodulação	16
1.4. Justificativa	18
2. OBJETIVO	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Veneno de <i>B. alternatus</i>	20
3.2. Fracionamento do veneno	20
3.3. Dosagem protéica	20
3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%	20
3.5. Efeitos do veneno de <i>B. alternatus</i> sobre leucócitos mononucleares do sangue periférico	21
3.5.1. Separação de leucócitos mononucleares do sangue periférico	21
3.5.2. Análise da viabilidade de células mononucleares do sangue periférico na presença do veneno de <i>B. alternatus</i>	22
3.5.3. Dosagem de citocinas e quimiocinas	22
3.6. Forma de análise dos resultados	22
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Perfil cromatográfico do veneno de <i>Bothrops alternatus</i>	23
4.2. Dosagem proteica das frações de veneno	23
4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%	25
4.4. Ensaio de viabilidade celular por MTT	26
4.5. Dosagens de citocinas e quimiocinas	28
5. CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS	35
APÊNDICE	38
OUTRAS ATIVIDADES REALIZADAS NO PERÍODO	38

1.INTRODUÇÃO

1.1. Vacinas e adjuvantes

Ao longo da história mundial, a humanidade foi acometida por variadas doenças, o que tornou as vacinas extremamente necessárias para que houvesse qualidade de vida humana. As vacinas são grandes responsáveis por tornar as doenças menos nocivas e até erradicar algumas delas, como a varíola.

Foi através da varíola que a primeira vacina, como é conhecida hoje, foi criada. Edward Jenner, no século XVIII, observou que camponeses que trabalhavam com vacas não tinham a forma grave da varíola, adquirindo apenas a forma leve da doença. Ele então decidiu pegar o vírus da varíola bovina e inocular em humanos, de modo que esses ficassem protegidos da doença (SHAH; HASSETT; BRITO, 2017).

No começo dos estudos sobre vacinas, estas eram produzidas com microorganismos atenuados. Essas vacinas eram muito imunogênicas, porém poderiam apresentar alguns efeitos colaterais importantes. Ao passar do tempo, as vacinas e as formas de inoculação dos agentes patogênicos foram evoluindo, surgindo também vacinas com microorganismos mortos, com proteínas purificadas ou recombinantes (PLOTKIN, 2014).

Com isso, as vacinas se tornaram mais seguras, porém menos imunogênicas, o que leva à necessidade de um adjuvante, substância que irá melhorar a resposta imune ao antígeno da vacina (TOM *et al*, 2018).

Os adjuvantes são utilizados para induzir a imunogenicidade de antígenos de uma vacina, de forma a auxiliar a retenção dos antígenos no organismo e melhorar a rota de entrega deles. Alguns critérios definem um bom adjuvante, e são eles: baixa citotoxicidade, biodisponibilidade, biodegradabilidade, sem resposta autoimune, baixo custo, adequação para a via de vacinação e boa resposta à doença (MALIK *et al*, 2018).

Atualmente, os adjuvantes com uso predominante e com licença de uso são os sais de alumínio, utilizados desde 1920, que podem ser divididos em hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio. Somente em 1990 foi aprovada a utilização do adjuvante MF59 na vacina de influenza para idosos. Também incluem a composição dos adjuvantes em estudo lipossomas, emulsões, saponinas e agonistas do receptor

Toll-Like (LAERA; HOGENESCH; O'HAGAN, 2023). Esses adjuvantes possuem efeitos colaterais adversos, como inflamação local, dor, necrose, úlceras, febre, alergia e imunotoxicidade (SASAKI; MOMOSE; HIRADATE *et al*, 2018).

Sendo assim, há a necessidade de encontrar adjuvantes com substâncias mais purificadas ou até recombinantes, que provoquem baixos efeitos indesejados e possuam melhor mecanismo de ação (GIUDICE; RAPPUOLI; DIDIERLAURENT, 2018).

Em última análise, o efeito desejado de um adjuvante, como já mencionado anteriormente, é aumentar a imunogenicidade dos antígenos presentes em uma determinada vacina, geralmente avaliada pela produção de anticorpos específicos para o antígeno vacinal. Mas os atuais conhecimentos em Imunologia permitem, sem dúvida, afirmar que a obtenção de qualquer resposta adaptativa eficiente, seja ela celular ou mesmo humoral, depende do direcionamento das respostas celulares, e a etapa de apresentação de antígenos para linfócitos T auxiliares está no centro desse direcionamento.

A apresentação de antígenos aos linfócitos T é realizada por células da imunidade inata, dentre as quais se destacam as células dendríticas e os monócitos/macrófagos. Portanto, moléculas pró-inflamatórias, como os já citados agonistas do receptor Toll-Like, que potencializam a apresentação de antígenos, são boas candidatas para o desenvolvimento de novos adjuvantes. Assim, novos adjuvantes imunológicos que desempenhem seu mecanismo de ação especificamente nessa etapa têm sido buscados.

1.2. Venenos e imunomodulação

Os venenos de serpentes são fontes ricas de proteínas e moléculas com potenciais tóxicos, mas também farmacológicos. Muitos estudos têm sido realizados acerca dos efeitos tóxicos de venenos de serpentes, mas o seu potencial farmacológico ainda pode ser muito explorado. (MAMEDE *et al*, 2016). O laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan vem desenvolvendo trabalhos em busca de moléculas com potencial adjuvante em venenos de animais peçonhentos.

Foram realizados, no laboratório de Imunoquímica, estudos utilizando peçonhas de *Bothrops jararacussu* e *Tityus serrulatus*. Nos estudos com *B. jararacussu*, foi verificada a imunomodulação de células mononucleares do sangue

periférico pelo veneno bruto (SANTOS *et al.*, 2013), além da modulação de macrófagos murinos por frações do veneno (SILVA, 2023), demonstrando a presença de frações de baixa massa molecular com potencial imunomodulador. Já no estudo com o *T. serrulatus*, foram caracterizadas as hipotensinas I e II (TsHpt I e II) em culturas de macrófagos peritoneais murinos (DUZZI *et al.*, 2021). Em ambos os estudos, os efeitos pró-inflamatórios de componentes dos venenos foram observados, pela indução da produção de citocinas *in vitro*. Os estudos estão atualmente em andamento no Laboratório de Imunoquímica.

1.3. Sobre *B. alternatus*

A *Bothrops alternatus*, popularmente conhecida como Urutu-Cruzeiro, é uma serpente peçonhenta da família Viperidae que está distribuída em países da América do Sul e no Sul e Sudeste do território brasileiro (SILVEIRA, 2018). O gênero botrópico é o maior responsável por acidentes ofídicos no Brasil. Esses acidentes são caracterizados por dor, edema e necrose e o veneno possui ação proteolítica, coagulante e hemorrágica (BRASIL, 2001).

Estudos anteriores conseguiram isolar alguns componentes de venenos botrópicos, incluindo proteases (serino e metaloproteases), fosfolipases A2, hialuronidases, lecitinas tipo C, L- aminoácido oxidases, 5'-nucleotidases (QUEIROZ *et al.*, 2018).

A ação inflamatória do veneno botrópico é causada por conjuntos de frações com especificidades diversas e substâncias heterogêneas. Alguns exemplos são a histamina, a fosfolipase A2, proteases, esterases, lecitinas, calicreínas e cininogenases. Essas frações liberam autacóides como bradiginina, leucotrieno, prostaglandina, prostaciclina e outras substâncias complexas do processo inflamatório (CARDOSO *et al.*, 2009).

Alguns estudos vêm sendo feitos usando veneno de *B. alternatus*. Em um deles, foi isolada e estudada uma enzima ácida da fosfolipase A2 que foi denominada Ba Sp II RP4. Descobriu-se, basicamente, que a toxina gera inflamação e edema da pata em camundongos e retardo de coagulação e não apresenta atividade miotóxica (DENEGRÍ *et al.*, 2003).

Já um outro estudo isolou e caracterizou um novo CRISP, proteína secretora rica em cisteína, denominado BaltCRP. Essa toxina afetou correntes de canais de potássio e induziu respostas inflamatórias que foram caracterizadas pelo aumento

do número de leucócitos peritoneais em camundongos, o que estimulou a produção de mediadores inflamatórios, entre eles IL-6, IL-1 β , IL-10, PGE2, PGD2, LTB4, CysLT (BERNARDES *et al*, 2019).

Utilizando veneno bruto de *B. alternatus*, este outro observou eventos pró-inflamatórios que a toxina causava em camundongos. Os resultados demonstraram que o veneno levou a uma elevação nos níveis de IL-1, IL-6, IL-12 e TNF α em células Raw 264.7 e macrófagos peritoneais (ECHEVERRÍA *et al*, 2018).

1.4. Justificativa

O envenenamento por *B. alternatus*, assim como pelas demais serpentes do gênero *Bothrops*, causa intensa reação inflamatória, que pode envolver diferentes toxinas e mecanismos de ação.

Toxinas com papel inflamatório podem ser excelentes fontes para o desenvolvimento de novos imunoestimulantes, uma vez que a imunoestimulação necessariamente passa pela ativação de células da imunidade inata. Resultados anteriores de nosso grupo indicaram que o veneno de *B. jararacussu* exerce alguns efeitos diretos sobre leucócitos do sangue periférico, bem como sobre macrófagos murinos, com modulação da produção de mediadores inflamatórios, indicando que os venenos botrópicos podem ser boas fontes de moléculas adjuvantes, com potencial inflamatório.

Assim, no presente projeto, buscamos avaliar o papel imunomodulador do veneno de *Bothrops alternatus* em células mononucleares do sangue periférico humano, bem como das toxinas resultantes do fracionamento desse veneno, buscando possíveis moléculas com efeito imunoadjuvante.

2. OBJETIVO

Com base no exposto acima, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito imunomodulador de frações do veneno de *B. alternatus* em culturas de PBMC. Estudando as citocinas liberadas por essas células e isolando as frações com melhor função pró-inflamatória, será possível avançar em estudos de possíveis novos adjuvantes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Veneno de *B. alternatus*

O veneno liofilizado foi fornecido pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, e mantido a -20°C . O veneno liofilizado foi pesado e diluído em solução salina apirogênica estéril. As amostras foram preservadas em condição estéril e utilizadas imediatamente nos procedimentos de fracionamento por gel filtração.

3.2. Fracionamento do veneno

O veneno foi fracionado pelo pesquisador Fábio Carlos Magnoli, no laboratório de Imunoquímica. Vinte miligramas de veneno liofilizado foram submetidos à cromatografia de exclusão molecular em uma coluna Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia), equilibrada e eluída com acetato de amônio a 50 mM a pH 7,5, em uma sala com controle de temperatura, utilizando um cromatógrafo ÄKTA purifier 10 plus (GE Healthcare). As amostras foram coletadas a uma taxa de fluxo de 24 mL/h, e seu teor de proteína foi monitorado registrando a absorvância a 280 nm, usando um espectrofotômetro UV-900 (GE Healthcare). Após a realização da separação das frações, as mesmas foram liofilizadas e ressuspensas em 700 μL de salina estéril, sendo aliqüotadas e armazenadas a -80°C .

3.3. Dosagem protéica

A concentração proteica das frações do veneno foi determinada pelo método de BCA (*BCA Protein Assay Kit*, Thermo Fisher, Pierce Protein Research Products, Rockford, IL, USA), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A leitura foi feita no espectrofotômetro. A concentração proteica foi utilizada como base para determinar a quantidade de cada fração a ser utilizada nos ensaios.

3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%

As frações obtidas do fracionamento foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), sob condições redutoras e não redutoras. Foram aplicados 10 µg de cada fração, num volume de 20µL de amostra com 20µL de tampão de amostra, com volume final de 40µL em cada poço do gel. Um padrão de massa molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards – BioRAD) foi incluído na corrida, para estimar a massa molecular das bandas visualizadas nas amostras. A corrida foi realizada em tampão Tris-glicina, com voltagem constante (100 V) e amperagem variável, e os géis foram corados pelo método de impregnação pela prata (MORRISSEY, 1981).

3.5. Efeitos do veneno de *B. alternatus* sobre leucócitos mononucleares do sangue periférico

Os efeitos das frações do veneno de *B. alternatus* foram testados sobre células mononucleares humanas do sangue periférico, utilizando-se diferentes concentrações das frações.

3.5.1. Separação de leucócitos mononucleares do sangue periférico

A utilização de amostras de sangue de doadores voluntários saudáveis foi aprovada pelo CONEP (CAAE: 39970114.3.0000.5469). Todos os doadores assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram coletados 20 mL de sangue periférico humano de doadores saudáveis, em anticoagulante (Tampão Citrato 3,8% pH 6,5), por punção venosa, e o sangue de cada doador foi utilizado individualmente.

Para o isolamento de células mononucleares do sangue periférico, o sangue foi submetido à separação por gradiente de densidade em Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, MO, EUA). Para tanto, o sangue foi diluído em solução salina estéril na proporção 1:1; em seguida, 10 mL de sangue diluído foram adicionados aos tubos cônicos contendo 3 mL de solução Histopaque 1077. Os tubos foram centrifugados a 400 g, por 40 minutos, a 18°C, e o anel de células mononucleares foi coletado. As células foram lavadas e ressuspensas em meio de cultura RPMI suplementado com soro fetal bovino (10%) e antibiótico (1%). Em seguida, foram contadas e plaqueadas em placas de 96 poços, de fundo chato, na concentração de

2×10^5 células/poço e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, na presença dos estímulos.

3.5.2. Análise da viabilidade de células mononucleares do sangue periférico na presença do veneno de *B. alternatus*

As células mononucleares obtidas como descrito acima foram incubadas, por 24 horas, em estufa a 37°C e 5% de CO₂, com as concentrações das frações do veneno de *B. alternatus* de 5 µg/mL e 10 µg/mL. Foram exceções as frações de baixa massa (8, 9 e 10), em que foram adicionadas o volume máximo de 100µL. Após esse período, a viabilidade celular foi avaliada por ensaio de MTT. Deste modo, foram adicionados 10 µL de tetrazolium salt 3 – (4, 5 – dimethylthiazol – 2 – yl) - 2, 5 – diphenyltetrazolium bromide (MTT) em todos os poços seguido por uma nova incubação, nas mesmas condições, por 4 horas. Após foram adicionados 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), por poço, homogeneizado e incubado por 10 minutos na estufa. A leitura das densidades ópticas foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. A partir das absorbâncias das amostras e dos controles positivo e negativo, foi calculada a viabilidade celular.

3.5.3. Dosagem de citocinas e quimiocinas

A concentração de citocinas e quimiocinas pró e anti-inflamatórias (IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-8, IL-1 α , TNF) nas amostras foi determinada por método de CBA (BD Cytometric Bead Array Human Inflammation Kit), de acordo com as instruções do fabricante.

3.6. Forma de análise dos resultados

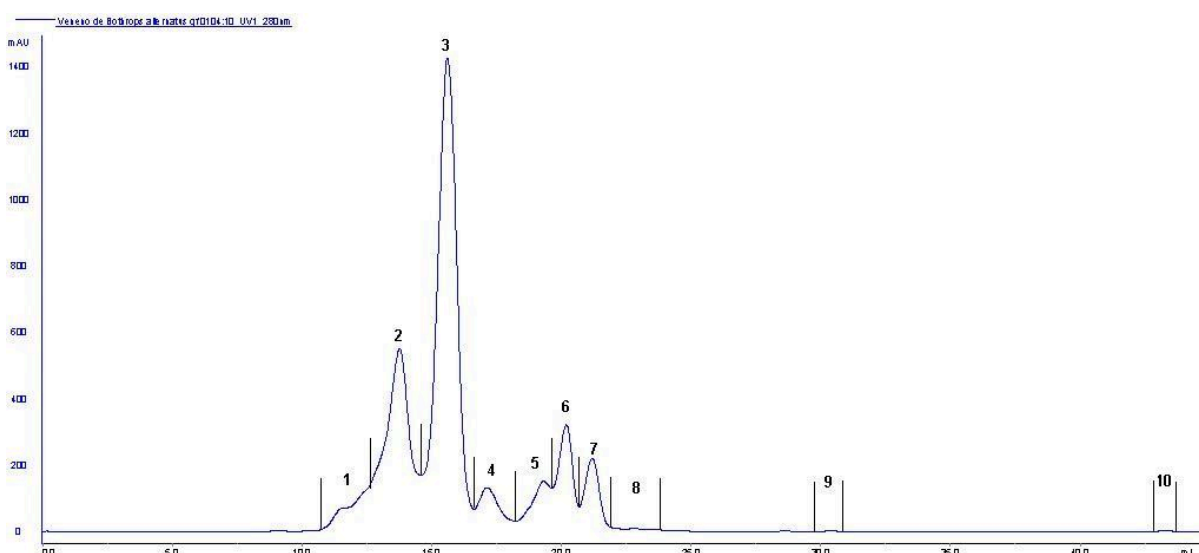
Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente, utilizando-se one-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. Foram considerados significativos os resultados com valor de $p < 0,05$.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Perfil cromatográfico do veneno de *Bothrops alternatus*

O fracionamento do veneno por cromatografia de exclusão molecular resultou em 10 frações considerando as massas moleculares de cada uma delas. Os picos dessas frações estão representados na figura 1.

Figura 1- Cromatograma do veneno de *Bothrops alternatus*



Fonte: Fábio Carlos Magnoli, 2023. Criado por Cromatógrafo AKTA purifier 10 plus.

Legenda: Cromatograma apresentando a separação das frações do veneno de *B.alternatus*.

O veneno foi fracionado para facilitar o processo de busca por uma molécula, visto que este na sua forma bruta é uma mistura complexa de compostos diferentes. A cromatografia de exclusão molecular foi escolhida por fracionar de acordo com a massa das moléculas, e a coluna utilizada no fracionamento tem separação ótima entre 10000 e 200000 Da, o que permite que a separação tivesse um espectro maior, visto que até o momento do fracionamento não se sabia quais moléculas teriam melhor resultado nas culturas.

4.2. Dosagem proteica das frações de veneno

Para se conhecer a dosagem das frações anteriormente fracionadas, foi realizado experimento de dosagem proteica utilizando kit BCA, e as amostras foram testadas em duplicatas. Os resultados foram lidos, plotados e tabelados. Os resultados de concentração foram baseados nos resultados da curva de D.O. (Tabela 1)

Tabela 1 - Dosagem protéica

Fração	Absorbância (562 nm)	µg/mL
F1	0.44	689.35
F2	2.2635	4561.7
F3	2.4945	5052.25
F4	0.916	1700.15
F5	0.5515	926.1
F6	0.548	918.7
F7	0.383	568.3
F8	0.1235	17.25
F9	0.1075	-16.65
F10	0.109	-13.45

Fonte: Próprio autor, 2023.

A dosagem proteica foi utilizada como base para o cálculo do volume de cada fração a ser aplicado no gel de poliacrilamida, considerando-se 10 µg de cada fração. Os cálculos estão demonstrados na Tabela 2. Para as frações que não atingiram dosagem suficiente, foi utilizado o volume máximo de 20 µL.

Tabela 2 - Cálculos das dosagens das frações de veneno

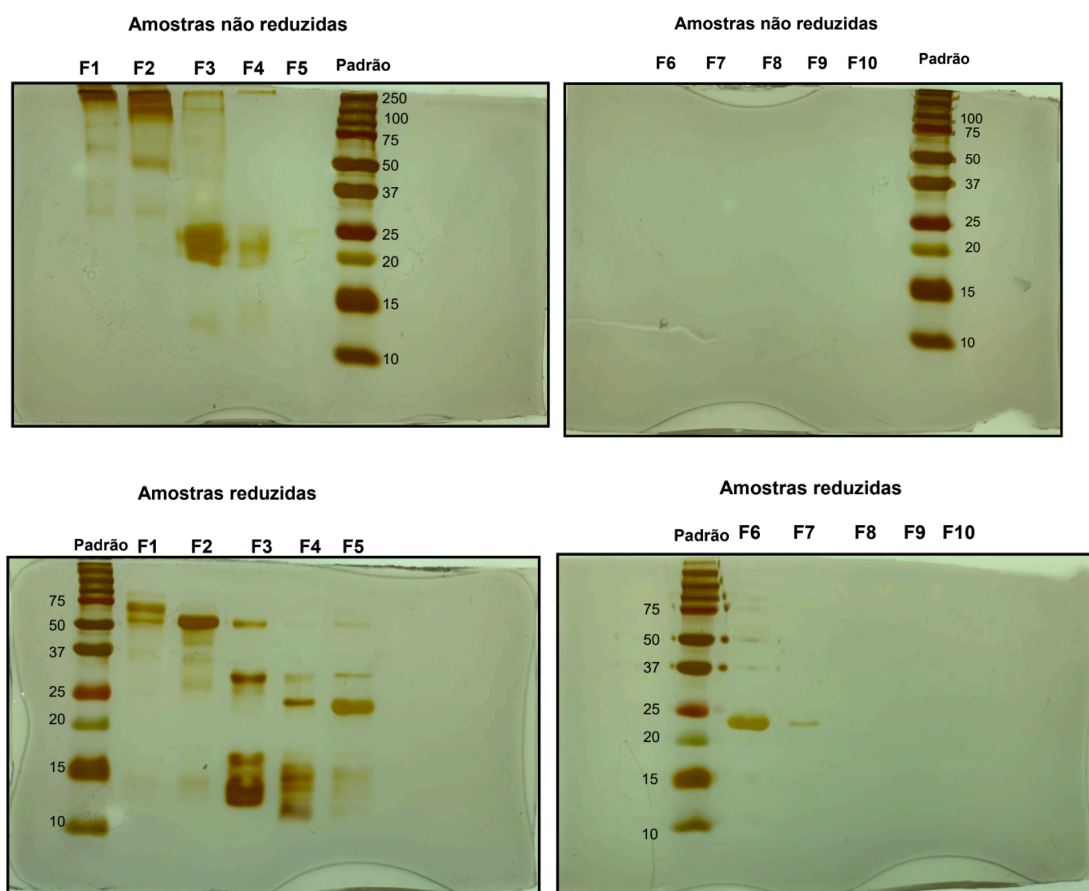
Fração	Média µg/ mL	µg/ µL	Veneno (µL)	Salina (µL)	Tampão de amostra (µL)
F1	689.35	0.689	14.51	5.49	20
F2	4561.7	4.561	2.19	17.81	20
F3	5052.25	5.052	1.97	18.03	20
F4	1700.15	1.7	5.88	14.12	20
F5	926.1	0.926	10.79	9.21	20
F6	918.7	0.918	10.89	9.11	20
F7	568.3	0.568	17.6	2.4	20
F8	17.25	0.017	20	0	20
F9	-16.65	0	20	0	20
F10	-13.45	0	20	0	20

Fonte: Próprio autor, 2023.

4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%

A produção dos reagentes e dos géis de poliacrilamida 12,5% foi feita segundo protocolo. Vinte amostras foram aplicadas no total, sendo elas 10 frações com tampão de amostra redutor e 10 com tampão de amostra não redutor. O agente redutor utilizado no tampão foi o β -mercaptoetanol. Cada amostra tinha volume final de 40 μ L. Após a corrida, os géis foram corados por prata (Figura 2).

Figura 2 - Géis de eletroforese com corrida das frações de veneno diluídas em amostras redutoras e não redutoras.



Fonte: Próprio autor, 2023.

Legenda: Corrida realizada em géis de poliacrilamida 12,5%, onde cada linha representa cada uma das 10 frações do veneno. Os géis foram corados por impregnação de prata.

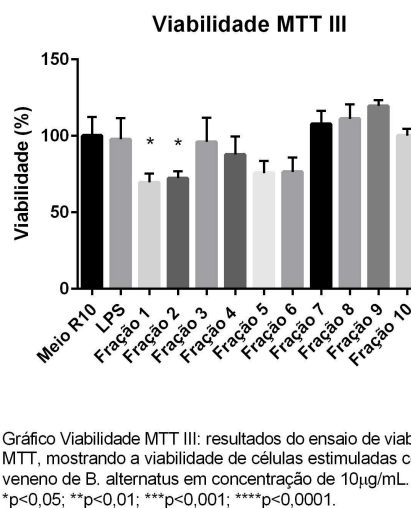
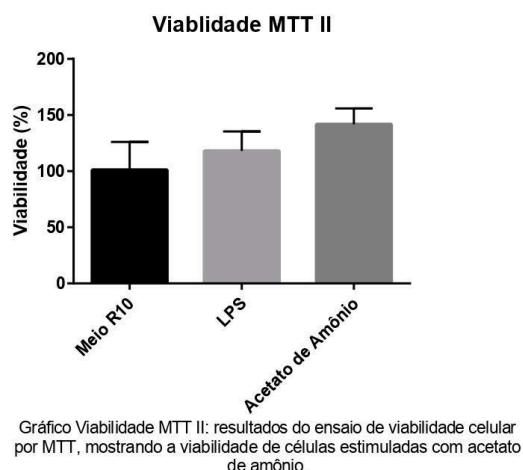
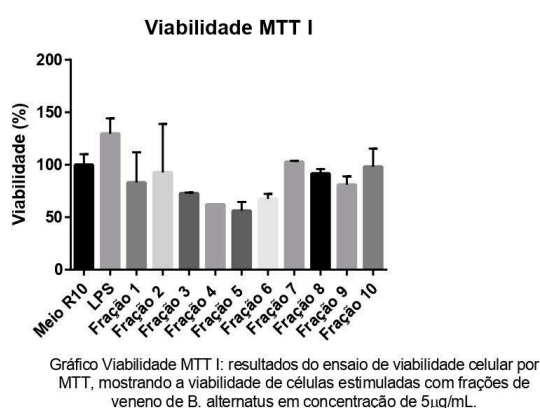
Os resultados dos géis se apresentaram de maneira a confirmar a dosagem proteica e o cromatograma do veneno. Nas canaletas das frações 7, 8, 9 e 10 não foi possível visualizar nenhuma banda, pois os resultados das dosagens se apresentaram muito baixas ou até negativas. Isso pode indicar que essas frações são compostas de proteínas de baixo peso molecular ou de peptídeos.

O agente redutor promove a separação das pontes dissulfeto nas estruturas terciária e quaternária das proteínas, separando as cadeias polipeptídicas de proteínas com estrutura quaternária. Com isso, a utilização de tampão de amostra redutor permitiu a melhor visualização e compreensão das bandas. Algumas frações apresentam bandas na mesma posição, o que pode sugerir que proteínas parecidas compõem várias frações.

4.4. Ensaio de viabilidade celular por MTT

Foram realizadas culturas de PBMC que foram estimuladas com as frações de veneno em concentrações de 5 e 10 µg/mL e com acetato de amônio, como controle negativo. A viabilidade foi realizada por ensaio de MTT, e os resultados, em porcentagem, estão demonstrados nos gráficos abaixo (Figura 3).

Figura 3 - Gráficos de viabilidade de MTT



Fonte: Próprio autor, 2023.

Legenda: Ensaio de MTT de culturas estimuladas com frações de veneno em concentração 5 e 10 µg/mL.

Os resultados do ensaio de MTT mostram que as células, em sua maioria, continuaram viáveis após os estímulos com as frações, em comparação com o controle negativo. O acetato de amônio é utilizado no processo de fracionamento

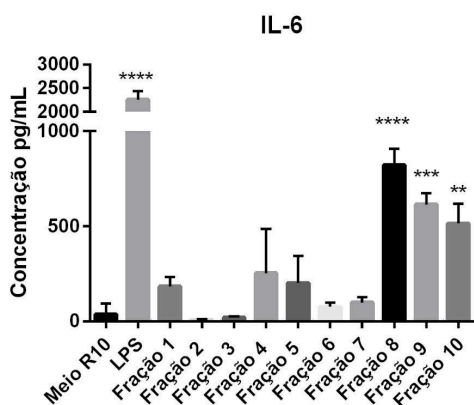
das frações por cromatografia por ser um composto volátil. Contudo, ele foi testado para esclarecer se provocava algum efeito nas células em cultura.

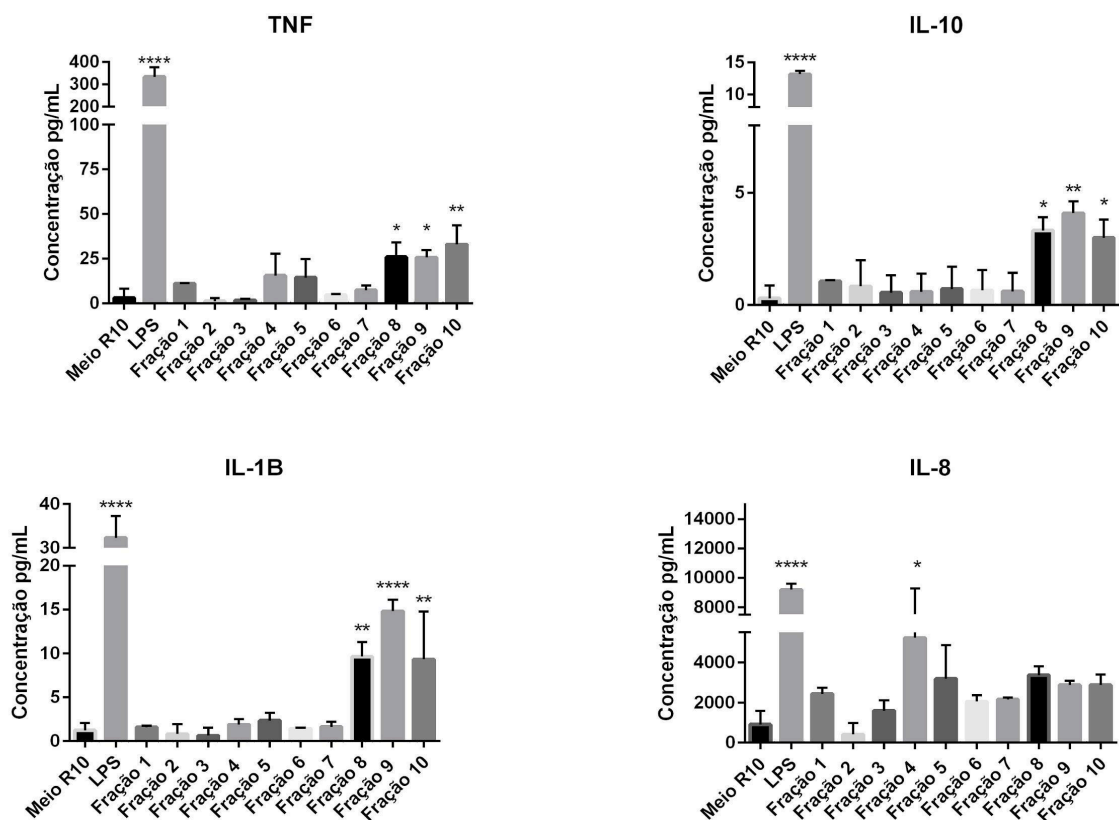
Para isso, solução salina foi injetada no cromatógrafo seguindo exatamente o mesmo processo do fracionamento das frações de veneno, sendo coletada em acetato de amônio. Após, o conteúdo coletado da cromatografia foi liofilizado e ressuspendido do mesmo modo que as frações.

4.5. Dosagens de citocinas e quimiocinas

Após as culturas e os ensaios de viabilidade, foram realizados ensaios de CBA segundo manual do kit, em que foram quantificadas as citocinas IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-8, IL-1 α e TNF nos sobrenadantes de culturas estimuladas com 5 e 10 μ g/mL de frações de veneno e com acetato de amônio. As amostras foram diluídas 1:100, e os resultados foram analisados no programa GraphPad Prisma (Figuras 4, 5 e 6).

Figura 4: Gráficos dos resultados de CBA de sobrenadantes estimulados com 5 μ g/mL de frações de veneno.





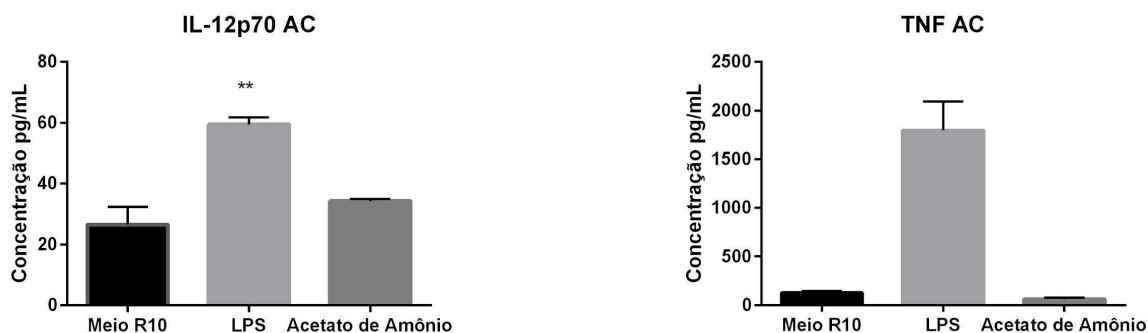
Fonte: Próprio autor, 2023.

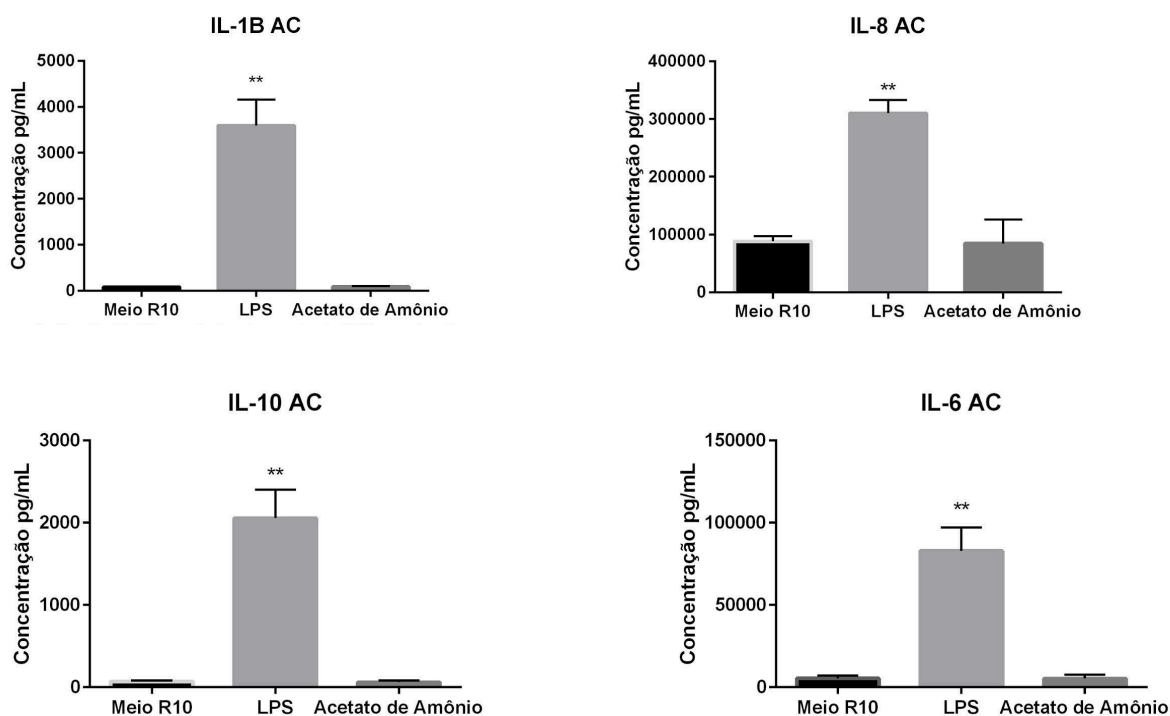
Legenda: Gráficos dos resultados de ensaio de CBA, mostrando as concentrações de IL-6, TNF, IL-10, IL-1 β e IL-8 em sobrenadante de cultura de PBMC estimulados com 5 μ g/mL de frações de veneno de *B. alternatus*.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Os valores de IL-12p70 foram desconsiderados por serem irrisórios.

Figura 5: Gráficos dos resultados de CBA de sobrenadantes estimulados com acetato de amônio.



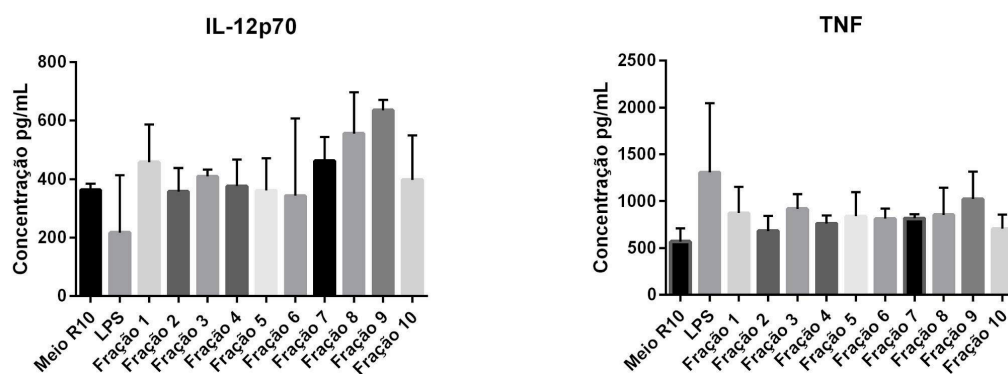


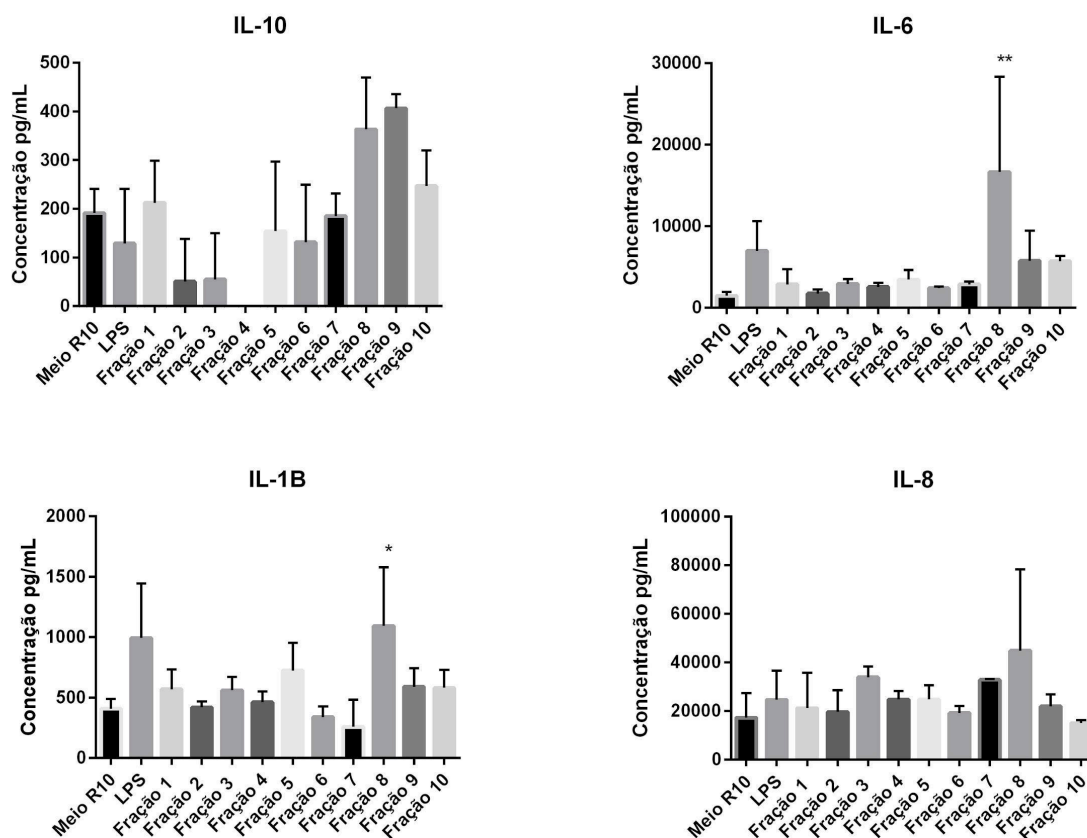
Fonte: Próprio autor, 2023.

Legenda: Gráficos dos resultados de ensaio de CBA, mostrando as concentrações de IL-12P70, IL-6, TNF, IL-10, IL-1 β e IL-8 em sobrenadante de cultura de PBMC estimulados com acetato de amônio.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Figura 6: Gráficos dos resultados de CBA de sobrenadantes estimulados com 10 μ g/mL de frações de veneno.





Fonte: Próprio autor, 2023.

Legenda: Gráficos dos resultados de ensaio de CBA, mostrando as concentrações de IL-12P70, IL-6, TNF, IL-10, IL-1 β e IL-8 em sobrenadante de cultura de PBMC estimulados com 10 μ g/mL de frações de veneno de *B. alternatus*.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

As citocinas inflamatórias são mediadores que levam respostas inflamatórias aos sítios de infecções, promovendo a cicatrização adequada de lesões. O TNF está entre os mediadores mais precoces na resposta inflamatória após uma lesão aguda. A IL-1 β é liberada principalmente por macrófagos e produz alterações metabólicas semelhantes ao TNF. A IL-6 tem como indutores o TNF e a IL-1, e induz a ativação de neutrófilos na inflamação. A IL-8 é um quimioatratante, com grande potencial de ativação de neutrófilos. A IL-12p70 promove a expressão de mediadores pró e anti inflamatórios, e sua produção induz células NK e a elaboração de IFN- γ . A IL-10 está envolvida na regulação das respostas inflamatórias, principalmente no controle negativo (LIN, 2000; CURFS, 1997; ELEY e BEATTY, 2009).

Nos resultados do ensaio de CBA, as amostras de sobrenadantes estimuladas com 5 μ g/mL de veneno mostraram resultados significativos na produção de IL-6, TNF, IL-10 e IL-1 β nas frações 8, 9 e 10. Nas amostras de

sobrenadantes estimulados com 10 µg/mL das toxinas, foram observados resultados significativos apenas para IL-6 e IL-1β na fração 8.

O acetato de amônio não induziu produção significativa das citocinas testadas, descartando a possibilidade de que o próprio tampão pudesse exercer algum efeito sobre as células testadas.

Os resultados obtidos coincidem com um estudo anterior que demonstra que macrófagos murinos em cultura, quando estimulados com veneno total de *B. alternatus*, testados em concentrações de 50, 5 e 0,5 µg/mL, produzem IL-1, IL-12, IL-6 e TNFα (Echeverría *et al*, 2018).

Nossos resultados também corroboram dados anteriores de nosso laboratório, utilizando veneno de *Bothrops jararacussu* em modelo de macrófagos peritoneais murinos (SILVA, 2023). O fracionamento do veneno foi realizado na mesma coluna de gel filtração, resultando também em uma fração de baixa massa com atividade pró-inflamatória, semelhantemente ao obtido no presente estudo.

Também feito no laboratório, um outro estudo isolou uma fosfolipase A2 (PLA2) do veneno de *Bothrops lanceolatus*, que é uma proteína de baixa massa de aproximadamente 15 kDa, e verificou o potencial inflamatório dessa molécula em sangue total humano, focando em produtos produzidos através de respostas do sistema complemento (GABRILI *et al*, 2023).

Em outro estudo feito em colaboração com o laboratório de Imunoquímica, testou-se um peptídeo de nome TsHpt, que é encontrado em veneno de *Tityus serrulatus*, sobre macrófagos murinos. Esse estímulo produziu valores significativos de IL-6 e TNF, na concentração de veneno de 100 µg/mL, concordando com o presente estudo que peptídeos induzem uma boa resposta inflamatória caracterizada pela produção de citocinas (DUZZI *et al*, 2021).

Uma revisão mostra que o veneno bruto de *Tityus* sp, quando utilizado para estimular macrófagos em cultura, produz grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, entre elas IL-1α, IL-1β e IL-10 (REIS *et al*, 2019).

Esses resultados indicam que os venenos animais, especialmente as frações de baixa massa molecular, podem ser boas fontes de moléculas na busca por novos adjuvantes imunológicos.

No presente estudo, nós nos baseamos no conceito de que uma molécula pró-inflamatória pode ter um bom potencial de melhorar a etapa de apresentação de antígeno e, conseqüentemente, de exercer um efeito adjuvante sobre a resposta

humoral. A partir desse conceito, nós obtivemos três frações de baixa massa molecular do veneno de *B. alternatus* que possuem atividade pró-inflamatória em culturas de PBMC, em baixa concentração, e que podem conter moléculas com potencial efeito adjuvante. Futuramente, novos estudos serão conduzidos para identificar as moléculas presentes nessas frações e testar seu possível efeito adjuvante *in vivo*.

5. CONCLUSÕES

Os estudos mostram que as frações denominadas 8, 9 e 10, compostas possivelmente de proteínas de baixa massa, na concentração de 5 µg/mL, estimulam as células mononucleares em cultura de maneira a produzir citocinas de perfil inflamatório, sem efeito citotóxico. Esses resultados podem evoluir para uma futura purificação dessas frações, de maneira que uma molécula seja encontrada, conhecida e testada para funções imunomoduladoras, tornando-se, possivelmente, uma molécula com potencial adjuvante para vacinas.

REFERÊNCIAS¹

- BERNARDES, C; *et al*; First report on BaltCRP, a cysteine-rich secretory protein (CRISP) from *Bothrops alternatus* venom: Effects on potassium channels and inflammatory processes. **International Journal of Biological Macromolecules**. vol. 140; pág. 556-567, Nov, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.108>. Acesso em: 10/05/2023.
- CARDOSO, JL; *et al*. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2ª edição. Editora Sarvier. 2009.
- CURFS, JH; *et al*. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**. vol. 10, nº4; pág. 742-780; Out, 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC172943/pdf/100742.pdf>. Acesso em: 13/12/2023.
- DENEGRI, M; *et al*. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA2 Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. **Toxicon**. vol. 56; pág. 64-74, Ago, 2010. Disponível em: doi:10.1016/j.toxicon.2010.02.031. Acesso em: 10/05/2023.
- DUZZI, B; *et al*. New Insights into the Hypotensins from *Tityus serrulatus* Venom: Pro-Inflammatory and Vasopeptidases Modulation Activities. **Toxins**. vol. 13; pág. 1-13, Nov, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins13120846>. Acesso em: 02/05/2023.
- ECHEVERRÍA, S; *et al*. Evaluation of pro-inflammatory events induced by *Bothrops alternatus* snake venom. **Chemico-Biological Interactions**. vol. 281; pág. 24-31, Fev, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.022>. Acesso em: 10/05/2023.
- ELEY, BS; BEATTY, DW. Chapter 8 - The basic immunology of tuberculosis. **Tuberculosis: A Comprehensive Clinical Reference**. pág. 75-86. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3988-4.00008-1>. Acesso em: 13/12/2023.
- GIUDICE, G; RAPPUOLI R; DIDERLAURENT, A. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. **Seminars in Immunology**. vol. 39; pág. 14-21, Out 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.05.001>. Acesso em: 09/05/2023.
- GABRILI JJM, Pidde G, Magnoli FC, Marques-Porto R, Villas-Boas IM, Squaiella-Baptistão CC, Silva-de-França F, Burgher F, Blomet J, Tambourgi DV. New Insights into Immunopathology Associated to *Bothrops lanceolatus* Snake Envenomation: Focus on PLA2 Toxin. **International Journal of Molecular Sciences**. 2023; 24(12):9931. <https://doi.org/10.3390/ijms24129931>.

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

LAERA D, HOGENESCH H, O'HAGAN DT. Aluminum Adjuvants—'Back to the Future.' **Pharmaceutics**. vol. 15, nº 1884, pág. 1-24, Jul, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071884>. Acesso em: 20/09/2023.

LIN, E; *et al.* Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**. vol. 127; nº2; pág. 117-126; Fev, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1067/msy.2000.101584>. Acesso em: 13/12/2023.

MALIK, A; *et al.* Novel application of trimethyl chitosan as an adjuvant in vaccine delivery. **International Journal of Nanomedicine**. Londres, vol.13, pág. 7959-7970, Nov, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/ijn.s165876>. Acesso em: 08/05/2023.

MAMEDE, C; *et al.* Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. **Toxicon**. vol. 117; pág. 37-45, Jul, 2016. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.03.006>. Acesso em: 09/05/2023.

MORRISSEY, JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**. vol. 117, nº 2, pág. 307-310, Nov, 1981. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90783-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90783-1). Acesso em: 13/12/2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de diagnósticos e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ª edição. Brasília; 2001. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/animais-peconhentos/aguas-vivas-e-caravelas/publicacoes/manual-de-diagnostico-e-tratamento-de-acidentes-por-animais-peconhentos.pdf/view>. Acesso em: 06/02/2024.

PLOTKIN, S. History of Vaccination. **PNAS**, Siena, vol.111, nº 34, pág. 12283–12287, Fev, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1400472111>. Acesso em: 08/05/2023.

QUEIROZ, G; *et al.* Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**. vol. 52; pág. 842-851, Dez, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.10.002>. Acesso em: 09/05/2023.

REIS,MB; *et al.* Scorpion envenomation and inflammation: Beyond neurotoxic effects. **Toxicon**. vol. 167; pág. 174-179; Set, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.06.219>. Acesso em: 13/12/2023.

SANTOS, VB; TAMBOURGI, DV; SQUAIELLA-BAPTISTÃO, CC. Cytotoxic effect of the crude venom of *Bothrops jararacussu* on mononuclear leukocytes from human peripheral blood. **Reunião Científica Anual do Instituto Butantan**; 2013.

SASAKI, E; *et al.* Establishment of a novel safety assessment method for vaccine adjuvant development. **Vaccine**. vol. 36; pág. 7112-7118, Nov 2018. Disponível: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.10.009>. Acesso em: 09/05/2023.

SHAH, R; HASSETT K; BRITO, L. Overview of Vaccine Adjuvants: Introduction, History, and Current Status. **Methods in Molecular Biology**, New York, vol. 1494; pág. 1-13; 2017. DOI 10.1007/978-1-4939-6445-1_1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27718182/>. Acesso em: 08/05/2023.

SILVA, Marina Ferreira. Ação imunomoduladora do veneno de Bothrops jararacussu e suas frações em modelo in vitro de macrófagos peritoneais murinos/ Marina Ferreira da Silva; orientadora Carla Cristina Squaiella Baptistão - São Paulo, 2023. 26p. : il.

SILVEIRA, F. F. Fauna Digital do Rio Grande do Sul, 2018. Bird and Mammal Evolution, Systematics and Ecology Lab - UFRGS. Disponível em: . <https://www.ufrgs.br/faunadigitalrs/5385-2/>. Acesso em: 09/05/2023.

TOM, J; *et al.* Applications of Immunomodulatory Immune Synergies to Adjuvant Discovery and Vaccine Development. **Trends in Biotechnology**. vol. 37, pág. 373 - 388, Abr, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.004>. Acesso em: 08/05/2023.

APÊNDICE

OUTRAS ATIVIDADES REALIZADAS NO PERÍODO

- Treinamentos de Implementação de BPL no sistema SE SUITE, do Instituto Butantan;
- Curso “ Introdução à Imunologia” ministrado pelo laboratório de Imunoquímica;
- Participação nos “Seminários do Butantan”, ocorridos às quartas-feiras no Museu Biológico;
- Apresentação de pôster na XXII Reunião Científica Anual do Instituto Butantan;
- Participação no simpósio “XII Semana Inovações Biológicas e Biotecnológicas Aplicadas à Saúde” realizado no ICB da USP.
- Participação em atividades do projeto da pesquisadora Giselle Pidge Marques Porto e da aluna Fernanda Vega Costenaro, como: expressão de proteína recombinante, Western Blotting, purificação de proteínas, sonicação de amostra e vivência em ambiente de classificação NB2.
- Apresentações de seminários diversos dentro do Instituto Butantan;
- Curso “Ética no uso de animais” oferecido pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan;