Marisa Langeani Bretones

Efeito da crotoxina na função de macrófagos de camundongos sépticos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Thais Martins de Lima

São Paulo

2020

Marisa Langeani Bretones

Efeito da crotoxina na função de macrófagos de camundongos sépticos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Thais Martins de Lima

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bretones, Marisa Langeani
Efeito da crotoxina na função de macrófagos de
camundongos sépticos / Marisa Langeani Bretones. --
São Paulo, 2020.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.
Orientadora: Thais Martins de Lima.

Descritores: 1.Sepse 2.Inflamação 3.Sistema
imunitário 4.Crotoxina 5.Lipoxinas 6.Citocinas
7.Camundongos endogâmicos BALB C

USP/FM/DBD-211/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho a meu avô, Heli Ribeiro Langeani.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à todos que estiveram presentes direta ou indiretamente durante todo este processo, em especial às pessoas que nunca desistiram de mim, abriram portas e permitiram que este trabalho fosse possível, mesmo com todos os percalços.

Dr^a Sandra Sampaio começo por você, já que o primeiro passo desta caminhada foi dado com seu apoio. Obrigada por ser uma profissional com extrema paixão pelo o que faz. Sem sombra de dúvidas, seu amor pela crotoxina é contagiante e serviu de guia em momentos de incerteza, motivando ainda mais o despertar da cientista dentro de mim.

À minha orientadora, Dr^a Thais Martins de Lima, agradeço por ter abraçado uma ideia completamente nova com tamanha dedicação e bom humor. Ter sido sua aluna durante esses anos foi uma honra, e eu só posso agradecer pela oportunidade e por tudo o que foi ensinado, até mesmo pelos puxões de orelha, já que sem eles eu jamais teria chegado até aqui. Como disse George Bernard Shaw, “A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”, então obrigada por estimular ainda mais essa curiosidade.

À Prof^a Suely Kubo Ariga por todo o conhecimento transmitido e por toda a paciência.

À banca, pelo tempo disponibilizado para leitura e avaliação do presente trabalho.

À minha família, aqueles que sempre estiveram comigo e aqueles que a vida permitiu que eu encontrasse pelo caminho. Em especial, meu avô, Heli Ribeiro Langeani à quem eu procuro me espelhar sempre: o céu não é o limite.

Aos meus queridos Chico e Zeca, sempre presentes tornando meus dias mais leves.

E finalmente, agradeço por cada dificuldade, que me tornou mais forte.

“Tudo o que você toca

Você muda.

Tudo o que você muda

Muda você.

A única verdade que persiste

É a mudança.”

Octavia E. Butler

“Tente ser um arco-íris na vida de alguém.”

Maia Angelou

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Delineamento experimental para realização da curva de mortalidade.

Figura 2: Curva de mortalidade.

Figura 3: Marcação de células sanguíneas.

Figura 4: Quantificação de mediadores plasmáticos 6 horas após a indução da sepse.

Figura 5: Quantificação de LXA₄ plasmática 6 horas após a indução da sepse.

Figura 6: Atividade fagocitária de macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos controle (CT) e sépticos (CLP), utilizando *E. coli* conjugadas com FITC e avaliadas por citometria de fluxo.

Figura 7: Produção de O₂ pelos macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos controle (CT) e sépticos (CLP), utilizando o fluoróforo DHE e avaliadas por citometria de fluxo.

Figura 8: Liberação de H₂O₂ pelos macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos controle (CT) e sépticos (CLP), utilizando a técnica de Amplex Red.

Figura 9: Produção de NO pelos macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos controle (CT) e sépticos (CLP), por citometria de fluxo.

Figura 10: Citocinas presentes no sobrenadante de células precursoras de medula, diferenciadas em macrófagos. IL-6 (A), TNF- α (B), IL-10 (C).

RESUMO

Bretones ML. *Efeito da crotoxina na função de macrófagos de camundongos sépticos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

A sepse é uma síndrome de alterações fisiológicas e bioquímicas induzidas por infecção que representa um grande problema de saúde pública mundial. Ela envolve a ativação precoce de respostas pró e anti-inflamatórias. A crotoxina (CTX), a principal toxina do veneno da cascavel sul-americana (*Crotalus durissus terrificus*), apresenta propriedades anti-inflamatórias conhecidas, como inibição da fagocitose por neutrófilos e macrófagos e da produção de citocinas por células dendríticas. Nosso objetivo foi avaliar se a administração de CTX seria capaz de reduzir a mortalidade por sepse através da modulação de parâmetros inflamatórios. Utilizamos camundongos Balb/c machos, nos quais induzimos a sepse por punção e ligadura cecal (CLP) utilizando punção dupla com agulha de calibre 18G. Os animais foram tratados com CTX (0,9 µg / animal, por via subcutânea) 1 hora após a CLP e sacrificados após 6 h. Utilizamos amostras de plasma para quantificar citocinas e eicosanóides circulantes. Os macrófagos diferenciados da medula óssea foram utilizados para avaliar o efeito da CTX em diferentes funções dos macrófagos, como: capacidade fagocítica, conteúdo intracelular de superóxido e óxido nítrico (NO), e as produções de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e citocinas. Nossos resultados mostram que a administração de CTX aumentou a taxa de sobrevivência dos animais de 45% para 70%. Não foi detectado efeito da CTX sobre a concentração de citocinas plasmáticas em animais saudáveis. Camundongos sépticos apresentaram menor concentração plasmática de IL-6 e TNF-α após o tratamento com CTX e maior concentração de LXA₄ e IL-1β. Nenhum efeito foi observado na concentração de IL-10 e IFN-γ. Macrófagos diferenciados da medula óssea de camundongos sépticos tratados com CTX fagocitaram menos *E. coli*, mas mantiveram a produção de NO e H₂O₂. Também observamos maior concentração de IL-6 no meio de cultura de células provenientes de camundongos sépticos, e a CTX induziu uma redução significativa. Nossos dados mostram que o efeito protetor da CTX na mortalidade por sepse envolve modulação das funções dos macrófagos e da produção de mediadores inflamatórios.

Descritores: Sepse; Inflamação; Sistema imunitário; Crotoxina; Lipoxinas; Citocinas; Camundongos endogâmicos BALB C.

ABSTRACT

Bretones ML. *Effect of crotoxin on macrophage' function in septic mice* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Sepsis is a syndrome of physiological and biochemical abnormalities induced by infection that represents a major public health concern. It involves the early activation of pro and anti-inflammatory responses. Crotoxin (CTX), the major toxin in the venom of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*), has known anti-inflammatory properties, such as inhibition of phagocytosis by neutrophils and macrophages and the production of cytokines by dendritic cells. Our objective was to assess whether CTX administration would be able to reduce sepsis mortality through the modulation of inflammatory parameters. We used male Balb/c mice, in which we induced sepsis by cecal ligation and puncture (CLP) using double puncture with 18G needle. Animals were treated with CTX (0.9 µg/animal, subcutaneously) 1 hour after CLP and euthanized after 6h. We used plasma samples to quantify circulating cytokines and eicosanoids. Differentiated bone marrow macrophages were used to evaluate the effect of CTX on different macrophages' functions, such as: the phagocytic capacity, intracellular content of superoxide and nitric oxide (NO), and the production of hydrogen peroxide (H₂O₂) and cytokines. Our results show that the administration of CTX increased the survival rate of the animals from 45% to 70%. No effect of CTX on plasma cytokine concentration was detected in healthy animals. Septic mice showed lower plasma concentration of IL-6 and TNF-α after CTX treatment and higher concentration of LXA₄ and IL-1β. No effect was observed on the concentration of IL-10 and IFN-γ. Differentiated bone marrow macrophages from septic mice treated with CTX phagocytosed less *E. coli*, but sustained NO and H₂O₂ production. We also observed higher concentration of IL-6 in cell culture medium from septic mice, and CTX induced a significant reduction. Our data show that the protective effect of CTX on sepsis mortality involves modulation of macrophage functions and the production of inflammatory mediators.

Descriptors: Sepsis; Inflammation; Immune system; Crotoxin; Lipoxins; Cytokines; Mice, inbred BALB C.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Macrófagos.....	13
1.2. Modulação da função de macrófagos pela crotoxina (CTX)	15
1.2.1. <i>Crotoxina</i>	15
1.2.2. <i>PLA₂ e eicosanóides</i>	16
1.3. Efeitos da CTX no sistema imune.....	18
1.4. Sepses.....	20
1.5. Macrófagos na sepsis	23
1.6. Justificativa.....	24
2. OBJETIVO	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Crotoxina.....	26
3.1.1 <i>Obtenção da Crotoxina (CTX)</i>	26
3.2 Animais	26
3.3 Ensaios <i>in vivo</i>	27
3.3.1 <i>Indução da Sepsis</i>	27
3.3.2 <i>Tratamento com a Crotoxina</i>	27
3.3.3 <i>Curva de mortalidade</i>	27
3.4 Ensaios <i>ex vivo</i>	28
3.4.1 <i>Caracterização sanguínea</i>	28
3.4.2 <i>Quantificação de mediadores inflamatórios plasmáticos</i>	29
3.4.3 <i>Obtenção de macrófagos murinos</i>	29
3.4.4 <i>Diferenciação das células de medula</i>	29
3.4.5 <i>Ensaio de fagocitose</i>	30
3.4.6 <i>Quantificação de EROs intracelular</i>	30
3.4.7 <i>Liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)</i>	30
3.4.8 <i>Concentração de óxido nítrico (NO) intracelular por citometria de fluxo</i>	31
3.4.9. <i>Quantificação de citocinas secretadas para o meio de cultura</i>	31
3.5 Análise Estatística	31

4. RESULTADOS	32
4.1. Curva de mortalidade	32
4.2. Caracterização sanguínea	33
4.3. Mediadores plasmáticos	34
4.4. Função de macrófagos de medula diferenciados.....	36
4.4.1. <i>Ensaio de fagocitose</i>	36
4.4.2. <i>Produção de superóxido (O_2)</i>	37
4.4.3. <i>Liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)</i>	38
4.4.4. <i>Produção de óxido nítrico (NO)</i>	39
4.4.5. <i>Quantificação de citocinas secretadas para o meio de cultura</i>	40
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49

1.INTRODUÇÃO

1.1. Macrófagos

Os monócitos são células fagocíticas mononucleares que se desenvolvem na medula óssea a partir dos mesmos progenitores mielóides que os neutrófilos. Os monócitos permanecem na medula óssea por menos de 24 horas antes de migrarem para a circulação periférica e serem recrutados a partir de estímulos imunológicos, pró-inflamatórios ou metabólicos para os tecidos e só então se estabelecem e se diferenciam em macrófagos teciduais (ABBA e LITCHMAN, 2005; CRUVINEL *et al.*, 2010; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

Os monócitos constituem aproximadamente 5-10% do total de células do sangue periférico de humanos e foram originalmente identificadas devido a sua alta expressão de CD14. Porém, estudos posteriores da expressão de diferentes marcadores antigênicos demonstraram que os monócitos são uma população celular heterogênea (ABBAS e LICHTMAN, 2005; BURKE *et al.*, 2002; GORDON e TAYLOR, 2005).

Os macrófagos, por sua vez, são células responsáveis pela fagocitose de partículas, sejam elas restos celulares ou microrganismos; pela manutenção da homeostase por meio da remoção de células senescentes; pela remodelação tecidual e reparação de lesões; pela secreção de mais de 100 substâncias de massas moleculares variadas (de óxido nítrico a fibronectina); pela indução de crescimento celular; produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; entre outros. (BURKE *et al.*, 2002; GORDON e TAYLOR, 2005; LASKIN e PENDINO, 1995).

A fagocitose é um processo que se inicia após a interação entre receptor e ligante. É disparada uma cascata intracelular que resulta na polimerização da actina presente no citoesqueleto dos fagócitos, permitindo a internalização de partículas, formando o fagossomo (ALLEN e ADEREM, 1996). Além da endocitose de partículas, os macrófagos são capazes de destruir e apresentar antígenos. O citoplasma dos macrófagos é rico em lisossomos, organelas ricas em enzimas hidrolíticas. Após a formação dos vacúolos, há incorporação dos lisossomos, formando o fagolisossomo. O antígeno então é destruído e suas partículas são apresentadas para o recrutamento e ativação de outras células imunes (ELHELU, 1983).

A destruição dos microrganismos também ocorre devido à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNS) pelos macrófagos. As EROS são subprodutos do metabolismo aeróbico e incluem os radicais: superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila ($OH^\cdot$). Elas apresentam propriedades químicas que conferem reatividade a diferentes alvos biológicos (como lipídios, proteínas, estruturas celulares e DNA) associando estes radicais a danos teciduais relacionados ao estresse oxidativo. Além do papel patológico, as EROS também funcionam como moléculas sinalizadoras que regulam processos biológicos e fisiológicos (CROSS *et al.*, 1987; FINKEL, 2011).

Em resposta ao reconhecimento de um patógeno ocorre a ativação da enzima NADPH oxidase (NOX2) pelos fagócitos, levando a uma rápida produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Este processo é conhecido como “*burst*” respiratório (em que os fagócitos aumentam seu consumo de oxigênio). O superóxido (O_2^-) promove um influxo de potássio (K^+) para compensar o influxo de carga negativa. O potássio intracelular promove liberação enzimática de uma matriz aniônica dentro do fagossomo, permitindo destruição enzimática do patógeno (PAIVA e BOZZA, 2014).

O H_2O_2 é gerado a partir do O_2^- produzido pela mitocôndria e NADPH oxidase. Dentro da célula, o O_2^- é convertido rapidamente pelas enzimas superóxido dismutase 1 e 2 em H_2O_2 (FRIDOVICH, 1997; ANDREVEV *et al.*, 2005; LOSCHEN *et al.*, 1975; MURPHY, 2009). O H_2O_2 é mais reativo a alvos celulares e é conhecido como um precursor para espécies reativas de oxigênio mais agressivas, como o radical hidroxil.

Com relação às espécies reativas de nitrogênio (ERNS) destaca-se o óxido nítrico (NO). O radical NO é produzido quando há interação de arginina e oxigênio, catalisado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), gerando citrulina e óxido nítrico. Além de interagir com a arginina, outra possível reação envolve NADPH, gerando $NADP^+$ e citrulina. O NO pode reagir com o O_2^- , produzido por fagócitos após estímulo inflamatório, e gerar peroxinitrito – um composto altamente reativo que é capaz de atacar o DNA diretamente (BARREIROS e DAVID, 2006).

A ativação de macrófagos é dependente do estímulo, visto que ocorre a ativação de diferentes cascatas de sinalização, levando a fenótipos distintos. Macrófagos estimulados por IFN- γ , LPS ou qualquer outro ligante de receptores do tipo *toll* (via de ativação clássica – M1) apresentarão alta atividade antimicrobica, uma vez que há

aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (GORDON e TAYLOR, 2005).

Já macrófagos que são estimulados por citocinas como IL-4 ou IL-13 (via de ativação alternativa – M2) serão induzidos a um fenótipo que promoverá reparo tecidual, diminuirá a inflamação e levará a um aumento na atividade endocítica, expressão de receptores de manose e crescimento celular (GORDON e TAYLOR, 2005).

Os macrófagos também podem sofrer desativação induzida pela presença de citocinas como IL-10, fator de transformação do crescimento β (TGF- β – *Transforming Growth Factor β*) ou pela ligação de receptores inibitórios. Esta via está relacionada com a produção de citocinas antiinflamatórias e expressão reduzida de MHC de classe II. Estas classificações foram observadas *in vitro*, porém ainda não se sabe se isto se aplica *in vivo* devido à dificuldade de controlar totalmente o microambiente e a ampla gama de fenótipos apresentados por macrófagos (GORDON e TAYLOR, 2005).

1.2. Modulação da função de macrófagos pela crotoxina (CTX)

1.2.1. Crotoxina

A ampla gama de funções apresentadas por macrófagos faz com que sejam importantes alvos para o tratamento de diversas doenças. Entre os diversos tipos de substâncias que podem modular a função dos macrófagos, está a crotoxina (CTX).

A CTX é uma das principais toxinas presentes no veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (VITAL-BRAZIL, 1972). Ela é a maior proteína presente no veneno, compondo cerca de 60% de seu peso seco, e foi isolada inicialmente por Slotta e Fraenkel-Conrat em 1938. Este trabalho serviu como marco histórico na toxinologia pois confirmou a natureza proteica das toxinas presentes no veneno de serpentes e estabeleceu os fundamentos para os subseqüentes isolamentos e caracterizações de toxinas presentes em venenos animais (SAMPAIO *et al.*, 2010; SLOTTA, 1938; SLOTTA e FRAENKEL-CONRAT, 1938). Seu peso molecular é de 24 a 26 kDa e apresenta atividades fosfolipásica, neurotóxica (bloqueio da transmissão neuromuscular) e miotóxica (FAURE, XU e SAUL, 2011; VITAL-BRAZIL, 1972).

Naquela época acreditava-se que a crotoxina atuava como uma única proteína homogênea, porém após diversos estudos realizados no período de 1950 a 1970, foi descrito que a crotoxina na verdade é uma toxina heterodimérica, formada pela associação não-covalente de duas subunidades: CA e CB (FAURE, XU e SAUL, 2011; MATSUBARA, 2009; SAMPAIO *et al.*, 2010).

A subunidade CA, conhecida como crotapotina, subunidade ácida ou crotoxina A, é uma proteína ácida, enzimaticamente inativa, não-tóxica composta por três cadeia polipeptídicas (α , β e γ), unidas por sete pontes dissulfeto, constituídas respectivamente de 40, 34 e 14 resíduos de aminoácidos. A crotapotina é gerada a partir do mesmo precursor fosfolipásico formador da subunidade CB, sendo denominada neste estágio de pro-CA (*PLA₂-like*). Diversos autores acreditam que o RNA mensageiro codificante para cada uma das subunidades da CTX seja resultante de um *splicing* alternativo, a partir de um único gene (BREITHAUPT *et al.*, 1974; BOUCHIER *et al.*, 1991; FAURE, XU e SAUL, 2011; MATSUBARA, 2009).

Apesar de não apresentar atividade tóxica, a crotapotina apresenta diversas funções importantes no complexo CTX, aumentando a potência letal da subunidade CB ao permitir que a toxina se ligue a receptores específicos na junção neuromuscular (proteína chaperona). Além disso, a crotapotina atua como um inibidor natural da atividade catalítica e anticoagulante da subunidade CB (FAURE, XU e SAUL, 2011; SAMPAIO *et al.*, 2010).

A subunidade CB, por sua vez, é formada por uma única cadeia polipeptídica, composta por 123 resíduos de aminoácidos, formando estruturas globulares associadas a sete pontes dissulfeto. Esta subunidade é uma β -neurotoxina que apresenta atividade fosfolipásica (*PLA₂*) e exerce ação letal, bloqueando a transmissão neuromuscular, inicialmente a níveis pré-sinápticos. Quando associada a CA, esta *PLA₂* apresenta atividade hidrolítica reduzida, porém as atividades neurotóxicas e miotóxicas são potencializadas (AIRD *et al.*, 1986; CHOUMET *et al.*, 1996; FAURE, XU e SAUL, 2011).

1.2.2. *PLA₂* e eicosanóides

A *PLA₂* pertence a uma superfamília de enzimas que catalisam a hidrólise de ácidos graxos. Estas enzimas agem nos fosfolipídeos presentes na membrana, fazendo

com que sejam liberados os ácidos araquidônicos da posição sn-2 dos mesmos. Este, por sua vez, sofre a ação de outras duas classes de enzimas, as Cicloxigenases (COX) ou as Lipoxigenases (LOX), levando a produção de eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, lipoxinas, maresinas e resolvinas). Os eicosanóides são mediadores inflamatórios capazes de exercer diferentes funções dependentes da ativação de receptores específicos. Estas moléculas imunomodulatórias estão implicados no controle de muitos processos fisiológicos, incluindo-se entre os mediadores e moduladores mais importantes da reação inflamatória (BUCZYNSKI *et al.*, 2009; DENNIS e NORRIS, 2015; RANG *et al.*, 2007).

As prostaglandinas desempenham importante papel pró-inflamatório, estão presentes principalmente no endotélio vascular e seus principais efeitos consistem na vasodilatação e inibição da agregação plaquetária. Tromboxanos se encontram predominantemente nas plaquetas e são substâncias vasoconstritoras, caracterizadas como importantes agregantes plaquetários. Leucotrienos são responsáveis pelo aumento na permeabilidade vascular, por gerar broncostricção e são importantes mediadores na resposta alérgica (DENNIS e NORRIS, 2015).

Dentre as classes de eicosanóides com propriedades antiinflamatórias, destacam-se ainda os derivados da família do Ômega 3, como ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido eicosapentaenóico (EPA). Estes precursores produzem compostos importantes para a resolução da inflamação, tais como as maresinas e as resolvinas (SAMUELSSON, 2012). As maresinas são responsáveis por limitar a infiltração de neutrófilos, estimular a capacidade fagocitária de macrófagos, reduzir a produção de fatores pró-inflamatórios, inibir a ativação de NF- κ B, estimulando a regeneração tecidual e controlando a dor (SERHAN, 2014). As resolvinas diminuem a infiltração de neutrófilos e suprimem a síntese de IL-1 β e TNF- α (SERHAN *et al.*, 2002; MARCHESELLI *et al.*, 2003).

A ação de lipoxigenases sobre o ácido araquidônico liberado pela PLA₂ gera uma outra classe de mediadores lipídicos, denominadas lipoxinas (LX). Seus principais receptores são receptores do tipo peptídeo formil 1 (FPRL1) e receptores (ALX) (ROMANO *et al.*, 2007). Suas atividades celulares mais conhecidas estão relacionadas ao processo de resolução da inflamação, como: inibição da produção de espécies reativas de oxigênio, diminuição da migração e infiltração de neutrófilos, recrutamento

de macrófagos (necessários no processo de resolução da inflamação e *wound healing*), redução de edema e sinais de dor (SERHAN, 2005; MADDOX e SERHAN, 1996).

1.3. Efeitos da CTX no sistema imune

Diversos estudos experimentais vêm demonstrando que o veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) ou substâncias isoladas a partir do veneno, são capazes de modular as respostas inflamatórias e imunológicas (SAMPAIO *et al.*, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2015; FARIAS *et al.*, 2017).

Cardoso e colaboradores (1997) evidenciam o papel supressor do VCdt e da CTX sobre a resposta imunológica humoral, demonstrando a redução nos níveis de anticorpos anti-HSA IgG1. Porém, apesar desse efeito supressor, os autores não observaram efeito sobre a resposta celular imune. Ainda, Cardoso *et al.* (2001) mostraram que a CTX, quando injetada no subcutâneo de camundongos, é capaz de diminuir o número de leucócitos circulantes 6-8 horas após o tratamento com CTX, atuando como um agente anti-inflamatório.

O papel da CTX na modulação da resposta celular durante a inflamação é bem descrito na literatura. Sampaio e colaboradores (2001) avaliaram o efeito do VCdt sobre o metabolismo de macrófagos, demonstrando um efeito dual na ação deste veneno. Por um lado, foi observada a inibição de parâmetros funcionais como espraçamento e fagocitose, enquanto houve estimulação do “*burst*” respiratório (geração de peróxido de hidrogênio - H_2O_2 e de óxido nítrico - NO), associado ao incremento da atividade das enzimas-chave do metabolismo de glicose e glutamina (hexoquinase, glicose-6-fosfato-desidrogenase, citrato sintase e glutaminase dependente de fosfato) e da oxidação destes metabólitos por estas células. Estes efeitos foram observados 2 horas após a administração subcutânea em ratos, e prolongam-se até 7 dias após uma única administração de veneno. A inibição da fagocitose e do espraçamento persistem por até 16 dias. Estes efeitos manifestam-se independentemente do estado de ativação do macrófago (residente, inflamatório ou ativado), entretanto as ações estimulatórias do VCdt são mais significativas em macrófagos residentes.

Posteriormente, o grupo de Sampaio realizou novos experimentos que demonstraram que a CTX, e sua subunidade fosfolipásica, são as responsáveis pela inibição do espraçamento. Esses efeitos se devem a modificações no citoesqueleto das

células, graças a inibição da fosforilação de tirosina-quinase e a expressão de proteínas GTPases RhoA e Rac, que impedem a captação de partículas na fagocitose (SAMPAIO *et al.*, 2005).

Dando continuidade a estes estudos, Sampaio e colaboradores (2006) observaram que os efeitos inibitórios da CTX sobre a fagocitose de macrófagos são modulados, pelo menos em parte, por mediadores gerados na via das lipoxigenases. Embora o tratamento com CTX aumente tanto a produção de PGE₂, LTB₄ e LXA₄ pelos macrófagos, somente a inibição da síntese de LXA₄ reverteu o efeito inibitório da CTX.

Em modelo tumoral desenvolvido no flanco de ratos, esses efeitos estimulatórios e prolongados da CTX sobre a função e metabolismo de macrófagos peritoneais são acompanhados de aumento da secreção de TNF- α e IL-1 β por essas células, e inibição significativa (88%) da progressão do tumor. Utilizando o modelo de tumor de pata em ratos foi observado que a CTX, quando administrada diariamente durante cinco dias, aumenta as concentrações plasmáticas de LXA₄ e 15-epi-LXA₄, levando à diminuição da formação da massa tumoral, principalmente por inibir a neovascularização. Estas ações são mediadas por receptores, ligantes de LXA₄/15-Epi-LXA₄ (BRIGATTE *et al.*, 2016). FPRL1

Também foi demonstrado aumento da liberação de H₂O₂ e produção de NO e TNF- α por macrófagos pré-tratados com CTX, estimulados com LPS e co-cultivados com neutrófilos inflamatórios. Estes macrófagos apresentaram produção aumentada de H₂O₂ e HOCl, bem como da atividade fungicida, evidenciando a importante ação moduladora da CTX na cooperação intercelular durante a resposta inflamatória-infecciosa (DE OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Ainda, em relação à resposta inflamatória infecciosa, o grupo de Farias e colaboradores demonstrou que a CTX induz polarização dos macrófagos para perfil M1 durante a infecção por *Leishmania amazonensis*, o que leva à eliminação de parasitas intracelulares e evidencia esta substância como um potente promissor agente leishmanicida (FARIAS *et al.* 2017).

Os dados descritos acima evidenciam que a CTX possui importante efeito imunomodulatório. Em vista disso, resolvemos estudar seu efeito na sepse, uma doença extremamente grave que envolve uma grande participação do sistema imune, especialmente dos macrófagos.

1.4. Sepses

Diversas doenças são consideradas um problema de saúde pública mundial e dentre as com maior taxa de mortalidade, destaca-se a sepses. A sepses atualmente é a maior responsável por mortes em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). Anualmente estima-se que ocorram 16 milhões de casos de sepses por ano, dos quais 5 milhões dos pacientes morrem (ADHIKARI *et al.*, 2010; TILLMAN *et al.*, 2018; RHEE *et al.*, 2019; LEVY *et al.*, 2012)

Um estudo realizado no Brasil por Machado e colaboradores (2017), estimou que dos 420 000 casos anuais de sepses, 55% dos pacientes morrem. Esses valores refletem a distribuição inadequada de recursos e a dificuldade de tratamento da doença, que inicialmente é silenciosa e apresenta rápida progressão.

A mortalidade difere de acordo com o quadro clínico à admissão, e a possível evolução do quadro de infecção a choque séptico e disfunção de múltiplos órgãos. Além disso, a sepses pode ser desencadeada por diferentes agentes etiológicos, assim como a idade dos pacientes e comorbidades associadas podem influenciar o desenvolvimento da doença (PEDRO *et al.*, 2015; RHEE *et al.*, 2019).

A palavra sepses deriva do grego *septikós* (σῆψις), que significa apodrecer, que causa putrefação. A sepses foi descrita em 2016, no terceiro consenso internacional da definição de sepses e choque séptico (*The Third International Consensus on the Definition for Sepsis and Septic Shock*) como uma disfunção orgânica potencialmente fatal, causada pela resposta desregulada a uma infecção (BERG e GERLACH, 2018; GYAWALI, *et al.*, 2019; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010; SINGER *et al.*, 2016).

Já o choque séptico, é definido como a evolução de um quadro de sepses associado a alterações celulares e metabólicas que conferem maior mortalidade a doença (SINGER *et al.*, 2016).

A sepses inicia-se com a infecção, onde ocorre a quebra da homeostase no paciente. Uma infecção é caracterizada por uma resposta inflamatória à presença de microorganismos como bactérias, fungos, entre outros, durante a invasão de um tecido estéril do hospedeiro. Em um primeiro momento, esta resposta é caracterizada pela presença rápida de neutrófilos no sítio inflamatório, seguido pela presença de monócitos (ZAVARIZ *et al.*, 2006).

As alterações metabólicas apresentadas pelo paciente séptico são decorrentes dos produtos liberados pelas bactérias ou pelas substâncias sintetizadas pelo organismo do hospedeiro na tentativa de restabelecer a homeostase. Muitos mediadores humorais são liberados na reação inflamatória, tais como citocinas, enzimas, metabólitos teciduais, entre outros. Essas substâncias podem ser utilizadas como marcadores do choque séptico, favorecendo um diagnóstico precoce e impedindo a progressão da doença. Os principais marcadores inflamatórios observados em quadros de sepse são: citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (fator de necrose tumoral) e interleucinas: IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (CHAUDHRY *et al.*, 2013; ZAVARIZ *et al.*, 2006).

Com relação às citocinas classicamente alteradas em quadros de sepse, destaca-se o TNF- α , um mediador pró-inflamatório precoce produzido por macrófagos e fibroblastos, que já se apresenta alterado 30 minutos após o início de uma infecção, apresentando um pico de produção em 1 hora (BOZZA *et al.*, 2007; SCHULTE *et al.*, 2013). Esse mediador é capaz de induzir a produção de diversos outros mediadores, tais como IL-1 β , IL-6 e IL-8 (BLACKWELL e CHRISTMAN, 1996). Normalmente altas concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-1 β e IL-6 estão associadas a um prognóstico negativo, com evolução para o quadro de choque séptico (ENDO *et al.*, 1992).

Outro mediador inflamatório importante na sepse, e que aparece de forma rápida no sítio inflamatório, é IL-1 β , um biomarcador pró-inflamatório que é sintetizado por fagócitos e leucócitos, capaz de mimetizar o efeito de TNF- α (DINARELLO, 1991). Normalmente IL-1 β não é encontrada no plasma de pacientes saudáveis e em quadros de sepse, como citado anteriormente, sua diminuição está relacionada a um prognóstico positivo da doença (ARNALICH *et al.*, 2002; ENDO *et al.*, 1992).

A IL-6 é uma citocina com efeito pró e anti-inflamatório com ativação tardia quando comparada a uma citocina aguda como o TNF- α , apresentando um pico em 4 horas (CHAUDRY *et al.*, 2013; KUHNS, ALVORD e GALLIN, 1995). Essa citocina é sintetizada por linfócitos T e monócitos e é responsável pela ativação de linfócitos, modulação da hematopoese, ativação da cascata de coagulação e indução da síntese de proteínas de fase aguda no fígado em resposta a inflamação (BORDEN e CHIN, 1994). O IL-6 plasmático é produzido em resposta a TNF- α e IL-1 β , e essa produção pode ser inibida com o tratamento com anticorpos anti-TNF em camundongos (SHALABY *et al.*, 1989). Um estudo realizado por Hack e colaboradores (1989), demonstrou que dentre 37 pacientes admitidos com sepse em unidades de terapia intensiva, 32

apresentaram concentrações elevadas de IL-6, o que demonstra uma correlação entre o aumento de IL-6 plasmática e a evolução do quadro sepse à morte. Essa teoria é suportada por outros grupos de estudo, como Remick e colaboradores (2005), Bozza e colaboradores (2007) e Theobaldo e colaboradores (2012). Todos estes os grupos observaram a produção elevada de IL-6, IL-8 e IL-10 associadas a um quadro de imunossupressão intenso, que geralmente resulta na morte do paciente

O IFN- γ é uma citocina com papel importante na resposta imune inata e adaptativa contra infecções bacterianas e virais. Ele é produzido por células T CD4 e T CD8 mediante a estimulação, assim como também é secretado por células NK (CHAUDRY *et al.*, 2013). Quadros inflamatórios apresentam altas concentrações de IFN- γ (SAWAI *et al.*, 1999). Durante a sepse, essa citocina se encontra especialmente alta na cavidade peritoneal, sendo encontrada em menores concentrações no plasma (ROMERO *et al.*, 2010). Neste estudo demonstrou-se que a neutralização de IFN- γ diminui a inflamação sistêmica durante a sepse, evidenciando sua correlação com a doença.

A sepse também induz a produção de mediadores anti-inflamatórios, tais como IL-10, principal citocina dessa classe de imunomoduladores. O IL-10 é produzido por monócitos, linfócitos T (Th2) e B. Suas principais características são: inibição da ativação de linfócitos Th1 e inibição da síntese de citocinas inflamatórias, tais como: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IFN- γ (OBERHOLZER *et al.*, 2002; OPAL e DEPALO, 1999). Possivelmente, assim como IL-6, a IL-10 seja capaz de limitar a resposta inflamatória sistêmica (CHAUDRY *et al.*, 2013).

O diagnóstico de pacientes com sepse pode ser realizado por meio dos sinais clínicos clássicos: análise do volume urinário (oligúria), medição do pH (acidose metabólica), alterações do hemograma (deformabilidade dos eritrócitos devido à acidose metabólica e hipotemia, leucocitose neutrofílica e distúrbios na coagulação) e pesquisa do foco infeccioso para que seja encontrado o agente microbiano e para que o tratamento adequado seja realizado, impedindo a progressão da doença (ZAVARIZ *et al.*, 2006).

A terapia empregada atualmente consiste na administração de antibióticos de amplo espectro, uma vez que estes são responsivos a uma ampla gama de bactérias e estas são as responsáveis, na maioria dos casos, por causar a infecção. Em quadros mais graves também são utilizados fármacos vasoconstritores, responsáveis pela manutenção

da homeostase da pressão arterial e, por sua vez, prevenindo a má oxigenação celular e tecidual, consequentemente evitando quadros de falência de órgãos (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2011).

1.5. Macrófagos na sepse

Diversos estudos demonstraram a importância de macrófagos na resolução da sepse. É descrita uma correlação entre a função insuficiente de monócitos com um prognóstico negativo para os pacientes, uma vez que a ação destas células é essencial para uma defesa antibacteriana eficiente (BOZZA *et al.*, 2007; KOVACH e STANDIFORD, 2012).

Docke e colaboradores (1997) demonstraram que pacientes sépticos apresentam redução na expressão de HLA-DR, um receptor presente em macrófagos e neutrófilos do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC-II), que mede a capacidade destas células em produzir citocinas pró-inflamatórias após a estimulação com LPS. Quando estes pacientes foram tratados com IFN- γ , houve reversão da disfunção monocitária, que resultou no aumento da sobrevivência dos pacientes. Além disso, também existe correlação entre altos níveis plasmáticos de IL-6 e IL-8 e maior progressão da doença, o que resulta na morte do paciente (BOZZA *et al.*, 2007).

Durante quadros infecciosos, sabe-se que há envolvimento de receptores do tipo *toll*. Anand e colaboradores (2007) investigaram o papel de receptores *toll* 4 (TLR4) na resposta intraperitoneal a LPS (também envolvido na resposta a bactérias Gram-negativas e endotoxinas), e observaram o seu envolvimento no aumento da fagocitose de macrófagos e *clearance* de patógenos.

Deng e colaboradores (2013) ressaltam que uma resposta deficiente ao LPS, contribui para um resultado adverso na sepse. Estes autores especulam que essa deficiência ocorra devido à inibição das funções do TLR4, como aumento na fagocitose bacteriana.

Na sepse, além de citocinas, os macrófagos passam a produzir mais espécies reativas de oxigênio, que estão envolvidas na ativação e regulação da resposta inata. De maneira sucinta, espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas em resposta ao reconhecimento antigênico. Diversos estudos correlacionam o estresse oxidativo com

um prognóstico negativo da doença (BARJA e HERRERO, 2000; HERNANDES *et al.*, 2014; ZHENG *et al.*, 2013).

Portanto, os estudos citados acima evidenciam que durante a sepse há uma desregulação na resposta imunológica do paciente, em parte devido à produção exacerbada de citocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Também há redução na fagocitose e no espriamento de macrófagos, piorando o prognóstico da doença. Estes estudos confirmam o papel fundamental dos macrófagos durante quadros infecciosos.

1.6. Justificativa

A sepse é uma doença orquestrada pelo sistema imune. Os macrófagos são células da imunidade inata envolvida na primeira linha de defesa do organismo contra infecções cuja ativação se encontra exacerbada durante essa doença. Existem diversas substâncias capazes de modular a atividade e as funções de macrófagos, dentre elas algumas toxinas de serpentes, como a CTX. Estudos mostram que macrófagos tratados com CTX apresentam alguns de seus efeitos inibidos, como espriamento e fagocitose, enquanto outros são estimulados, como a produção de espécies reativas de oxigênio e de lipoxinas.

Visto que a modulação do sistema imune pode ser eficaz no tratamento da sepse e que a atividade funcional e secretória dos macrófagos está relacionada ao desenvolvimento da doença, avaliamos os efeitos da CTX sobre a atividade de macrófagos de animais sépticos, a fim de melhorar o prognóstico da sepse.

2.OBJETIVO

Avaliar o efeito da crotoxina sobre a função de macrófagos obtidos de camundongos sépticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Crotoxina

3.1.1 Obtenção da Crotoxina (CTX)

Foi purificada, no Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, a partir de um único lote de veneno de *Crotalus durissus terrificus*, obtido de um pool liofilizado de vários exemplares da espécie. A purificação do complexo CTX, a partir do veneno bruto, foi realizada segundo o método descrito por Landucci *et al.*, (1994). O veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi aplicado em uma coluna contendo Sephadex G-75 equilibrada com tampão bicarbonato de amônio (0,1 M, pH 8.0). A eluição foi feita com o mesmo tampão e a fração com atividade fosfolipásica foi isolada, dialisada, e a quantificação proteica foi realizada pelo método de Bradford (1976). As frações contendo a CTX foram testadas quanto à homogeneidade por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (Laemmli, 1970) e a atividade de fosfolipase A2 foi analisada em substrato cromogênico. Amostras de CTX foram também analisadas quanto ao conteúdo de endotoxina (LPS) em ensaio imunoenzimático de Limulus amoebocyte lysate (LAL) (Cambrex/Lonza), realizado no Laboratório de Microbiologia do controle de qualidade da Divisão de Produção do Instituto Butantan. As alíquotas de CTX consideradas isentas de contaminantes foram estocadas a -20°C até o momento do uso. As frações foram diluídas em salina estéril 0,9%, (p/v), no momento da utilização.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c (machos, pesando entre 25 e 30g), fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo nº 6831). Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Reumatologia por um período de no mínimo dois dias antes de serem utilizados nos experimentos, com livre acesso a água e ração. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo *The Universities Federation for Animals Welfare* (UFAW).

3.3 Ensaios *in vivo*

3.3.1 Indução da Sepses

Foi realizada pelo método da ligadura e perfuração cecal (CLP), conforme descrito por SORIANO *et al.*, 2002. Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de cetamina (90 mg/kg/i.p.) e xilazina (10 mg/kg/i.p.). Sob condições assépticas, uma laparotomia mediana de 2 cm foi realizada para permitir a exposição do ceco. Este foi firmemente ligado com uma sutura de seda 3.0 na sua base, e a válvula íleo-cecal foi perfurada duas vezes com uma agulha de calibre 18G. O ceco foi cuidadosamente espremido para expulsar uma pequena quantidade de fezes a partir dos locais de perfuração e então foi devolvido para a cavidade peritoneal. A laparotomia foi fechada com suturas de seda 4.0. Os animais foram devolvidos às suas gaiolas com acesso livre a alimento e água.

3.3.2 Tratamento com a Crotoxina

Os animais foram tratados com CTX (0,9 µg/animal, em 100 µL de salina) por via subcutânea, 1 hora após a indução da sepse por método de CLP. A concentração de CTX testada se baseia em estudos anteriores (ALMEIDA *et al.*, 2015 e NUNES *et al.*, 2010). Os animais pertencentes ao grupo controle foram injetados com o mesmo volume de salina (NaCl 0,9%).

3.3.3 Curva de mortalidade

A fim de determinar se a CTX apresentava efeito sobre a mortalidade induzida pela sepse, foi realizada uma curva de mortalidade utilizando 30 animais, que foram observados a cada 12 horas, por 5 dias. Os camundongos foram divididos em dois grupos: CLP + Salina e CLP + CTX 0,9 (**Figura 1**). O tratamento foi realizado como descrito no item anterior. Os animais sobreviventes foram eutanaseados em câmara de CO₂ após 120 horas da indução da sepse.

Figura 1: Delineamento experimental para realização da curva de mortalidade. Cada grupo continha n=15 animais.

3.4 Ensaios *ex vivo*

Os animais utilizados nos experimentos posteriores foram eutanasiados 6 horas após a indução da sepse por overdose de anestésico (cetamina + xilazina).

3.4.1 Caracterização sanguínea

O sangue foi coletado pela aorta abdominal dos animais, em seguida foi centrifugado a 2500 rpm, durante 15 minutos a 4°C para a separação e armazenamento do plasma. As hemácias foram lisadas com um tampão composto por 155mM NH_4Cl , 12mM NaHCO_3 e 0,1mM EDTA e as amostras foram centrifugadas (2000 rpm, 5 minutos, 24°C), para a remoção do mesmo. Para caracterização das células por citometria de fluxo, foram utilizadas 5×10^5 células, que foram ressuspensas em um tampão de ligação (PBS + 1% albumina) contendo os anticorpos contra os seguintes antígenos: Ly6G (PE-583/26 nm), CD11b (PerCP-Cy5 - 661/19 nm), CD19 (PE-Cy7-785/70 nm) e CD3 (FITC-525/30 nm). As amostras foram incubadas na geladeira durante 30 minutos, e após lavagem com 400 μL de PBS, centrifugadas e ressuspensas em 200 μL de PBS. Em seguida, as amostras foram plaqueadas e analisadas em citômetro de fluxo Guava 8TH (Merck Millipore) utilizando o software InCyte.

3.4.2 Quantificação de mediadores inflamatórios plasmáticos

As concentrações plasmáticas de TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-1 β foram determinadas utilizando o kit comercial *MILLIPLEX[®] MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel* (#MCYTOMAG-70K, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram analisadas em um sistema MAGPIX[®] e os dados foram coletados pelo *software* Luminex xPONENT.

A concentração plasmática de LXA₄ foi determinada utilizando o kit colorimétrico comercial Neogen, conforme as instruções do fabricante (#407010, Neogen, Lexington, Kentucky, EUA).

3.4.3 Obtenção de macrófagos murinos

Para avaliar os efeitos da CTX e da sepse sobre a funcionalidade de macrófagos, utilizamos macrófagos diferenciados a partir de células precursoras de medula óssea dos animais.

As células precursoras de medula óssea dos camundongos foram obtidas por meio da dissecação e lavagem da cavidade medular de ambos os fêmures com 5 mL de meio de cultura RPMI 1640. Essa suspensão foi diluída em Azul de Tripán e a contagem total de células foi realizada em hemocítômetro de Neubauer. A porcentagem de viabilidade foi calculada pela incorporação ou não do corante Azul de Tripán.

3.4.4 Diferenciação das células de medula

A suspensão celular (1×10^6 células por mL) foi cultivada em meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB e 15% de meio condicionado de células L929. A diferenciação foi realizada por 7 dias, com troca por meio fresco no dia 3. Para os ensaios de função de macrófagos, soltamos as células das placas utilizando uma solução de lidocaína 5%. As placas foram previamente lavadas com 1 mL de PBS, em seguida foi adicionado 500 μ L de lidocaína. A solução foi neutralizada utilizando meio de cultura RPMI 1640. As células foram utilizadas nos experimentos descritos a seguir.

3.4.5 Ensaio de fagocitose

As células (1×10^5) foram centrifugadas (2000 rpm, 5 minutos, 4°C) e ressuspensas em 75 μ L de meio RPMI 1640 sem antibiótico + 25 μ L de uma solução contendo 1×10^6 *E. coli* marcada com FITC. As amostras foram incubadas sob agitação (500 rpm) a 37 °C durante 30 minutos. Após a incubação, as células foram centrifugadas (2000 rpm, 5 minutos, 24°C), ressuspensas em 200 μ L de PBS e analisadas em citômetro de fluxo Guava 8TH utilizando o software InCyte com o filtro 488-615 nm (Merck Millipore). Os dados obtidos foram analisados posteriormente no software Guavasoft 3.3.

3.4.6 Quantificação de EROs intracelular

As células (1×10^5) foram centrifugadas (2000 rpm, 5 minutos, 4°C). Em seguida foram ressuspensas em 200 μ L RPMI 1640 contendo dihidroetídio (DHE) (1 μ M) e incubadas a 37°C durante 30 minutos. O DHE entra facilmente nas células e é clivado por EROs, formando brometo de etídeo, que se liga ao DNA intercalando-se entre as bases nitrogenadas. A leitura foi realizada em um citômetro Guava 8TH (Merck Millipore) utilizando o filtro 583/26 nm. Os dados obtidos foram analisados posteriormente no software Guavasoft 3.3.

3.4.7 Liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A liberação de H_2O_2 foi determinada utilizando o reagente Amplex Red (kit AmplexRed /ThermoFisher). O Amplex Red reage com o H_2O_2 em proporção de 1:1 e gera um produto de oxidação vermelho fluorescente chamado resorufina. Foram utilizadas 5×10^5 células por poço. As células foram diferenciadas em macrófagos diretamente nas placas de 96 poços e adicionou-se o tampão de reação no momento da análise, conforme protocolo fornecido pelo fabricante. A placa foi incubada à 37°C por 1 hora, em seguida foi feita a leitura da absorbância por espectrofotometria (560 nm). Os resultados foram obtidos utilizando uma curva padrão de H_2O_2 , sendo expressos em nmols de H_2O_2 por 5×10^5 .

3.4.8 Quantificação de óxido nítrico (NO) intracelular por citometria de fluxo

As células (5×10^5) foram centrifugadas (2000 rpm, 5 minutos, 4°C) e ressuspensas em meio de cultura RPMI contendo 1 μ M de DAF-FM diacetato. O DAF é um reagente lipossolúvel capaz de quantificar baixas concentrações de NO. Quando dentro da célula, é deacetilado por esterases intracelulares e se torna DAF-FM, que reage com o NO na presença de oxigênio para formar um análogo fluoresceína-triazolo (DAF-FMT). As células foram incubadas no escuro, em temperatura ambiente, por 30 minutos. Em seguida as amostras foram lavadas duas vezes e ressuspensas em 200 μ L de PBS, para leitura da fluorescência do composto formado utilizando um citômetro de fluxo Guava 8HT com o filtro FL1 Green (525/30 nm) (Merck Millipore). Os dados obtidos foram analisados posteriormente no software guavasoft 3.3.

3.4.9. Quantificação de citocinas secretadas para o meio de cultura

Foram coletados 2 mL do sobrenadante de cultura de células de medula óssea diferenciadas em macrófagos. O sobrenadante foi armazenado a -80°C e utilizado para quantificar as concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 segundo as instruções do fabricante do kit comercial (R&D Systems).

3.5 Análise Estatística

Os valores foram expressos como média $\pm$ d.p.m (desvio padrão da média) e analisados estatisticamente por ANOVA e teste de Tukey-Kramer (GraphPad Prism 5). As diferenças foram consideradas significativas para o nível de $P < 0,05$ (5%).

4. RESULTADOS

4.1. Curva de mortalidade

Após a realização da CLP e tratamento com salina ou CTX, os animais foram observados por 5 dias. A sobrevivência dos animais do grupo controle foi de 40%, enquanto nos animais tratados com CTX, a sobrevivência foi de 70%.

Figura 2: Curva de mortalidade. Os animais foram submetidos à CLP e divididos em dois grupos: CLP + Salina (100 μ L de salina por via s.c) e CLP + CTX (0,9 μ g de CTX em 100 μ L de salina por via s.c). O tratamento foi realizado 1 hora após a cirurgia. Os animais foram observados a cada 12 horas, durante 5 dias (n=15 por grupo).

4.2. Caracterização sanguínea

Com relação a marcação sanguínea com Ly6G (**Figura 3A**), observamos um aumento significativo na porcentagem de neutrófilos dos grupos submetidos a CLP, quando comparados ao controle. Observamos também uma diminuição significativa linfócitos B marcados com CD19 (**Figura 3B**) nos grupos submetidos a CLP, com relação ao controle. Não observamos diferenças estatísticas entre os linfócitos T marcados com CD3 (**Figura 3C**), apenas uma tendência nos grupos CLP a se apresentarem elevados quando comparados aos seus respectivos controles. Com relação marcação com CD11b (**Figura 3D**), não observamos diferenças estatísticas entre os monócitos marcados. Porém, não detectamos efeito da CTX em nenhum dos grupos.

Figura 3: Caracterização de células sanguíneas. Análise fenotípica por citometria de fluxo de células sanguíneas coletadas de animais 6 horas após a indução da sepse. **A)** Marcação de neutrófilos com anticorpo anti-Ly6G. **B)** Marcação de linfócitos B com anticorpo anti-CD19 **C)** Marcação de linfócitos T com anticorpo anti-CD3. **D)** Marcação de monócitos com anticorpo

anti-CD11b. n=15-17, *p<0,05 quando comparado ao seu respectivo controle. CT: animais SHAM, CLP: animais submetidos a CLP, CTX: animais tratados com 0,9 µg de CTX por via s.c.

4.3. Mediadores plasmáticos

Ao avaliarmos o perfil plasmático de citocinas dos animais, podemos observar que houve diminuição na concentração de IFN- γ (**Figura 4A**) nos animais que foram submetidos à CLP e tratados com CTX, com relação ao seu respectivo grupo controle. Avaliando os animais sépticos tratados com CTX, observamos aumento na liberação de IL-1b (**Figura 4B**). Com relação a liberação de IL-10 (**Figura 4C**), a CLP induziu um aumento significativo no plasma dos animais tratados com salina, e a CTX parece ter revertido este efeito. Embora a CLP não tenha induzido alteração significativa na concentração plasmática de TNF- α (**Figura 4D**) no período avaliado, o tratamento com a CTX diminuiu a concentração da mesma em animais sépticos. A CLP induziu um aumento significativo de IL-6 (**Figura 4E**) plasmática e o mesmo foi inibido pelo tratamento com CTX.

Figura 4: Quantificação de citocinas plasmáticas 6 horas após a indução da sepse. IFN- γ (A), IL-1 β (B), IL-10 (C), TNF- α (D) e IL-6 (E). n=16-17, * p<0,05 quando comparado ao seu

respectivo controle. CT: animais SHAM, CLP: animais submetidos a CLP, CTX: animais tratados com 0,9 µg de CTX por via s.c.

A CTX foi capaz de induzir um aumento na concentração plasmática de LXA₄ (**Figura 5**) no grupo CLP, quando comparado aos demais grupos.

Figura 5: Quantificação de LXA₄ plasmática 6 horas após a indução da sepse. n=14-16

*p<0,05 quando comparado aos demais grupos. CT: animais SHAM, CLP: animais submetidos a CLP, CTX: animais tratados com 0,9 µg de CTX por via s.c.

4.4. Função de macrófagos diferenciados de medula

4.4.1. Ensaio de fagocitose

Utilizando as células diferenciadas de medula óssea de camundongos, avaliamos a atividade fagocitária dos macrófagos. Observamos que as células de camundongos sépticos, tratadas com CTX, apresentam menor atividade fagocitária quando comparadas a células de animais submetidos a CLP e tratados apenas com salina (controle).

Figura 6: Atividade fagocitária de macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos controle (CT) e sépticos (CLP), utilizando *E. coli* conjugadas com FITC e avaliadas por citometria de fluxo (n=12). *p<0,05 quando comparado aos demais grupos. CTX: animais tratados com 0,9 µg de CTX por via s.c.

4.4.2. Concentração intracelular de superóxido (O_2)

Utilizando células de medula óssea de camundongos diferenciadas em macrófagos, avaliamos a produção de O_2 . Nos macrófagos de camundongos sépticos tratados com salina, observamos diminuição na concentração intracelular de O_2 quando o comparamos ao seu respectivo controle. Macrófagos de animais sépticos tratados com CTX apresentaram valores similares ao seu grupo controle, sugerindo que a CTX mantém a capacidade de produção de O_2 destas células.

Figura 7: Concentração intracelular de O_2 nos macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos controle (CT) e sépticos (CLP), utilizando o fluoróforo DHE e avaliadas por citometria de fluxo (n=11-12). * $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo controle. CTX: animais tratados com 0,9 μ g de CTX por via s.c.

4.4.3. Liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Após a diferenciação das células de medula óssea dos camundongos em macrófagos, avaliamos a capacidade das mesmas de liberar H_2O_2 no meio de cultura. Observamos que as células provenientes de animais sépticos liberam mais H_2O_2 que seu respectivo controle, e a CTX reverte esse efeito da sepse.

Figura 8: Liberação de H_2O_2 pelos macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos controle (CT) e sépticos (CLP), utilizando a técnica de Amplex Red (n=12). * $p < 0,05$ quando comparado a todos os grupos. CTX: animais tratados com $0,9 \mu g$ de CTX por via s.c.

4.4.4. Produção de óxido nítrico (NO)

Os macrófagos diferenciados de animais CLP, tratados com salina, apresentaram uma menor concentração intracelular de NO. A CTX foi capaz de aumentar a produção de NO, quando comparada ao grupo controle (CLP SAL).

Figura 9: Produção de NO pelos macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos controle (CT) e sépticos (CLP), por citometria de fluxo (n=10). * $p < 0,05$ quando comparado a todos os grupos. CTX: animais tratados com $0,9 \mu\text{g}$ de CTX por via s.c.

4.4.5. Quantificação de citocinas secretadas para o meio de cultura

Com relação a liberação de citocinas no sobrenadante da cultura celular dos macrófagos diferenciados de medula óssea, observamos que células de animais submetidos a CLP e tratados com salina, apresentam maior liberação de IL-6 (**Figura 10A**). O tratamento com CTX inibe essa estimulação induzida pela CLP. Não detectamos diferenças estatísticas com relação a liberação de TNF- α (**Figura 10B**) e IL-10 (**Figura 10C**) em nenhum dos grupos.

Figura 10: Citocinas presentes no sobrenadante de células precursoras de medula, diferenciadas em macrófagos. IL-6 (A), TNF- α (B), IL-10 (C) (n=15-26). * p<0,05 quando comparado a todos os grupos. CTX: animais tratados com 0,9 μ g de CTX por via s.c.

5. DISCUSSÃO

Diversos estudos demonstram a importância de insumos animais como estratégia terapêutica (CUSHMAN e ONDETTI, 1991; SAMPAIO *et al.*, 2001). Dentre estes, destaca-se o tratamento com CTX, uma toxina animal conhecida por sua atividade anti-inflamatória e imunomodulatória.

Obtivemos dados que mostram que a CTX pode melhorar diversos aspectos da sepse. Nós observamos melhora da sobrevivência dos camundongos submetidos a CLP, com diminuição de TNF- α , INF- γ e IL-6 plasmáticas e aumento de IL-1 β . Além disso, houve aumento significativo na concentração plasmática de LXA₄. A função de macrófagos também foi modulada, com diminuição da atividade fagocitária e manutenção dos níveis basais de NO e H₂O₂. Com relação a liberação de citocinas pelos macrófagos, a CLP aumenta a produção de IL-6, enquanto o tratamento com a CTX reverte esse efeito.

Compreender os mecanismos desencadeados durante a sepse é de fundamental importância para que estratégias terapêuticas adequadas sejam implantadas. Para permitir uma análise sistemática destes mecanismos, diversos modelos experimentais têm sido utilizados. O método empregado para induzir a sepse em nosso estudo foi escolhido devido à semelhança da sepse induzida por CLP a uma peritonite. Outras técnicas, como injeção de bactérias ou LPS, possuem uma patogênese que varia dependendo da quantidade de estímulo, forma e local de administração. Administrar bactérias diretamente no animal gera uma cinética de resposta menos “completa” do que aquela induzida pela CLP. A sepse induzida por CLP gera uma infecção polimicrobiana, uma vez que há perfuração da parede intestinal, com liberação gradativa do conteúdo cólico, o que abrange uma cadeia de mecanismos da resposta imune inata (MÄNNEL, 2007; TOSCANO *et al.*, 2011).

Devido à variação no tempo de produção de diversos marcadores e a dificuldade em diagnosticar precocemente um paciente séptico, optamos por coletar o material biológico 6 horas após a indução da sepse, visando a proximidade de um quadro clínico de sepse.

O modelo de indução de sepse empregado é capaz de induzir resposta inflamatória semelhante a sepse. Esta é caracterizada pela presença rápida de neutrófilos no sítio inflamatório e de forma mais tardia, pela presença de integrantes da resposta imune adaptativa, como os linfócitos B (ABBA e LITCHMAN, 2005; CRUVINEL *et*

al., 2010; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010). Nossos resultados apresentaram um aumento significativo de neutrófilos circulantes nos animais submetidos a CLP e diminuição de linfócitos B, quando comparado ao grupo controle.

Com relação a diminuição de linfócitos B, um estudo realizado por Monserrat e colaboradores (2013) demonstrou que há depleção de linfócitos em quadros de sepse. Linfócitos B participam da resposta imune inata e adaptativa, por meio do reconhecimento de receptores do tipo *toll*. Essas células circulantes também apresentam expressão do antígeno de superfície CD95, integrante da família de fator de necrose tumoral (TNF), responsável por mediar a apoptose quando na presença de seu ligante CD95L, presente em linfócitos T (PETER *et al.*, 2015; RAWLINGS *et al.*, 2012). A depleção de linfócitos está relacionada a um pior prognóstico da doença e a maior taxa de mortalidade (MONSERRAT *et al.*, 2013).

Apesar de diversos estudos terem demonstrado efeitos da CTX na distribuição de leucócitos no sangue e linfa, com aumento de linfócitos T e B em linfonodos, nós não detectamos efeitos da mesma em nosso modelo de sepse experimental (CARDOSO *et al.*, 2001; ZAMBELLI *et al.*, 2008). Essa discrepância pode ser justificada pelo fato dos estudos anteriores com CTX terem sido realizados em animais saudáveis e nosso modelo ser consideravelmente mais agressivo, principalmente no momento em que as coletas foram realizadas.

Como citado anteriormente, a sepse é desencadeada com a ativação da resposta inata do sistema imune, que ocorre devido ao reconhecimento de epítomos bacterianos por receptores de reconhecimento padrão (RRP) presentes nas barreiras epiteliais (primeira linha de defesa do organismo) e leucócitos. Dependendo do receptor ativado, pode ocorrer a ativação de uma resposta que envolve a participação de NF- κ B (fator nuclear κ B), um fator de transcrição responsável pelo aumento da transcrição de genes que codificam proteínas como COX2, óxido nítrico sintase e citocinas, como TNF- α . Esta ativação gera a produção e secreção de eicosanoides, quimiocinas e óxido nítrico (NO) (AKIRA *et al.*, 2006; O'NEILL, 2011).

Acreditava-se que a sepse era caracterizada apenas pela presença de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-6 e IFN- γ . Porém, sabemos que a resposta pró-inflamatória ocorre juntamente com um mecanismo de compensação anti-inflamatório, caracterizado pela produção de IL-10, TGF- β e IL-4, que atuam visando o

equilíbrio imunológico. Esta dualidade inflamatória aumenta ainda mais a complexidade desta doença (COHEN, 2002; JUNGER *et al.*, 1996).

Nossos dados mostram que 6h após a CLP, os animais apresentavam diminuição nas concentrações de INF- γ , TNF- α e IL-6 e aumento de IL-1 β plasmáticos quando tratados com CTX.

Poucos estudos evidenciam o efeito da CTX sobre citocinas diretamente *in vivo*. Camundongos Balb/c submetidos a uma inflamação intestinal e tratados com CTX (0,035 mg/kg i.p) apresentam diminuição nas concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-1 β no tecido intestinal após 18 horas (ALMEIDA, *et al.*, 2015). Não há dados sobre a concentração plasmática de citocinas nesse estudo. No estudo de Cardoso e col., o tratamento de ratos *in vivo* com CTX (5 μ g/animal s.c) induziu o aumento de IL-10 e IL-6 plasmáticos, sem alteração na concentração de IFN- γ (CARDOSO *et al.*, 2001).

Apesar de nossos dados não estarem completamente de acordo com a literatura, observamos um potente efeito anti-inflamatório da CTX em um modelo *in vivo* de sepse, cuja relevância se mostra em sua capacidade de modular a concentração de citocinas plasmáticas, agindo de forma sistêmica e não somente *in situ*.

As concentrações plasmáticas de citocinas são o reflexo da ativação de diferentes tipos celulares durante uma resposta inflamatória. Dentre as células que compõem a resposta imune inata, destacam-se os macrófagos (CRUVINEL *et al.*, 2010). Por esse motivo, avaliamos o efeito da CTX na produção de citocinas por macrófagos diferenciados a partir de células precursoras da medula óssea (BMDM – *Bone Marrow Derived Macrophages*).

Embora o lavado peritoneal seja uma fonte comum para obtenção de macrófagos, a cavidade peritoneal não apresenta alta concentração de macrófagos residentes, contendo aproximadamente 35% destas células. A maioria das células presentes neste sítio são linfócitos (53% de linfócitos B e 5% de linfócitos T) (RAY *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2017). Outra dificuldade em utilizar macrófagos peritoneais é a alta concentração bacteriana oriunda do modelo de indução de sepse pela técnica de CLP, onde o conteúdo cólico é despejado na cavidade peritoneal, induzindo o quadro inflamatório.

Macrófagos isolados a partir da medula óssea de camundongos e diferenciados apresentam população celular exclusiva, uma vez que a diferenciação das células primárias é realizada em cultura celular com meio condicionado específico.

Nossos dados mostram que BMDM de animais sépticos secretam mais IL-6 quando comparados aos macrófagos de animais controle, indicando que nosso modelo de sepse é capaz de modificar a produção basal dessa citocina, provavelmente por alteração epigenética. O tratamento com a CTX foi capaz de reverter esse efeito da sepse, visto que houve diminuição da concentração de IL-6 no sobrenadante de macrófagos de animais tratados uma única vez.

Sabe-se que a CTX modula a produção de citocinas por macrófagos, mas a maioria dos estudos mostram esses efeitos *in vitro*. Macrófagos de ratos tratados com CTX (12.5 nM) apresentam menor produção de TNF- α (PIMENTA *et al.*, 2019). O estudo de Costa e colaboradores (2013) mostrou aumento na produção de IL-6 (12 e 24 horas) e diminuição na produção de IL-1 β e TNF- α (12 horas) por macrófagos de ratos tratados com CTX (0.3 μ g).

A CTX também modula a resposta de leucócitos a estímulos inflamatórios. Células dendríticas de camundongos C57BL/6 estimuladas com LPS e tratadas com CTX (250 ng/mL) apresentam maior liberação de IL-10 e expressão de TGF- β (FREITAS *et al.*, 2018). Farias e colaboradores (2017) observaram que macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c tratados com CTX (2.4 e 4.8 μ g/mL) e inoculados com *Leishmania amazonensis*, apresentam maior concentração de IL-6 e TNF- α .

Embora a maioria dos estudos tenham evidenciado efeitos da CTX sobre o perfil secretório de citocinas em experimentos *in vitro*, em geral os dados apontam um efeito anti-inflamatório, com diminuição de IL-1 β , TNF- α e IL-6 e aumento de IL-10. Nós não observamos alterações nas concentrações de TNF- α e IL-10 em nosso modelo.

Além de induzir alterações na concentração de citocinas, observamos que a CTX foi capaz de modular a concentração plasmática de LXA₄, um potente mediador lipídico da inflamação. Como citado anteriormente, as lipoxinas apresentam efeitos anti-inflamatórios como: controle do influxo de granulócitos e monócitos no sítio inflamatório, inibição da transmigração de neutrófilos e eosinófilos, estimulação da fagocitose de partículas apoptóticas; aumento na liberação de citocinas anti-inflamatórias, entre outros (GODSON *et al.*, 2000; SERHAN *et al.*, 1999; MADDOX e SERHAN, 1996).

O envolvimento das lipoxinas no efeito imunomodulador da CTX foi demonstrado por Sampaio e colaboradores (2006), que ao utilizarem um inibidor da

lipoxigenase concomitantemente ao tratamento de macrófagos com CTX, deixaram de observar a inibição da fagocitose pelo tratamento.

O envolvimento da LXA₄ nos efeitos da CTX também foi demonstrado em modelos *ex vivo*. Brigatte e colaboradores (2016) observaram que o tratamento de ratos com CTX (18 µg por rato) durante 5 dias foi capaz de induzir um aumento na concentração plasmática de LXA₄, reduzindo a progressão tumoral. Em um modelo de inflamação intestinal aguda, Almeida e colaboradores (2015) observaram que o tratamento de camundongos com CTX (0.035 mg/kg) foi capaz de reverter o quadro de inflamação, com aumento na produção de LXA₄.

Em estudos sobre sepse, outros estudos utilizaram as lipoxinas diretamente como tratamento e observaram alterações semelhantes. O grupo de Wu e colaboradores demonstrou em uma série de estudos em modelo murino de CLP que a administração de LXA₄ reduz a inflamação sistêmica, além de reduzir a concentração de bactérias circulantes no sangue devido ao aumento na capacidade fagocitária de macrófagos, aumentando assim a sobrevida dos animais (WALKER *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2013 e WU *et al.*, 2015). Dados semelhantes foram observados por Lin e colaboradores (2019), que ainda observaram diminuição na lesão hepática e pulmonar causada pela sepse devido a diminuição de IL-6 e TNF-α.

Esses estudos indicam que o aumento de LXA₄ que observamos na circulação dos animais sépticos tratados com CTX pode ser responsável pela melhora no quadro inflamatórios desses animais e na maior sobrevida dos mesmos.

Como citado anteriormente, os macrófagos são células muito importantes durante processos inflamatórios. Eles são capazes de reconhecer antígenos não próprios do organismo, produzir uma série de citocinas e quimiocinas, fagocitar partículas, destruí-las e apresentar antígenos (ABBA e LITCHMAN, 2005).

Para avaliar o efeito da CTX em macrófagos, nós utilizamos apenas uma dose de CTX por via s.c., e analisamos a função dos macrófagos diferenciados de medula que foi obtida 6 horas após a realização da CLP. Nós observamos que os macrófagos de camundongos sépticos tratados com CTX apresentam menor atividade fagocitária quando comparado a células de animais submetidos a CLP e tratados apenas com salina (controle).

A CTX é capaz de inibir a fagocitose dos macrófagos, como foi observado inicialmente por Sampaio e colaboradores (2003). Este efeito foi detectado em

macrófagos coletados do peritônio de ratos tratados com CTX e de ratos *naive*. Essa inibição não depende do tipo de receptor ativado, e está relacionada a capacidade da CTX em modular o citoesqueleto. De fato, Sampaio e colaboradores também demonstraram que a CTX induz rearranjo no citoesqueleto de actina de macrófagos em resposta a interação destas células com partículas opsonizadas de zymosan, acompanhado de uma diminuição nos níveis de tirosina fosforilada no citoplasma e ao redor dos fagossomos. Essa remodelação do citoesqueleto pela CTX pode ser responsável pela diminuição da fagocitose que observamos nos macrófagos dos animais sépticos tratados.

Além da fagocitose, o tratamento com a CTX também foi capaz de modular outras funções dos macrófagos, como a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Nós observamos que as células de animais sépticos apresentam menos O_2^- intracelular e liberam mais H_2O_2 que seu respectivo controle e a CTX é capaz de reverter esse efeito da CLP.

O excesso de EROS durante a sepse está relacionado a um prognóstico negativo. Em ratos sépticos, há um desequilíbrio entre a produção e o consumo de radicais livres, gerando estresse oxidativo (FORMAN et al., 2002; RHEE et al., 2000). Alterações na função mitocondrial podem aumentar a geração de O_2^- , que por sua vez corroboram para um prognóstico negativo, induzindo estresse oxidativo, falência de múltiplos órgãos e morte (BARJA e HERRERO, 2000; HERNANDES *et al.*, 2014; ZHENG *et al.*, 2013).

No entanto, a produção de espécies reativas é essencial para a destruição dos microorganismos desencadeadores da sepse. Um estudo realizado por GAO e colaboradores (2002) observou que camundongos sépticos com produção deficiente de O_2^- , apresentavam menor *clearence* de bactérias, levando ao aumento na produção de quimiocinas e a infiltração de leucócitos no tecido pulmonar.

Por sua vez, com relação às espécies reativas de nitrogênio, observamos que a concentração de NO intracelular é menor nos macrófagos dos animais sépticos e o tratamento com a CTX é capaz de reverter este efeito.

Na sepse, há estudos que apontam o NO como importante fator microbicida (De-Oliveira e colaboradores, 2018), enquanto outros mostram que o excesso desse mediador pode comprometer a migração de neutrófilos para os tecidos, e assim piorar o prognóstico da doença (Benjamin, Ferreira e Cunha, 2000).

Portanto, o efeito da CTX sobre a produção de espécies reativas pelos macrófagos pode ter efeito deletério por diminuir o combate aos microorganismos, ou positivo, por diminuir a destruição tecidual, e assim manter suas funções integras.

Embora estudos anteriores tenham demonstrado que macrófagos tratados com o veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* ou CTX apresentam maior produção de NO e H₂O₂ (Sampaio e colaboradores, 2001; Costa e colaboradores, 2013; Faiad e colaboradores, 2012), nosso estudo é o primeiro a mostrar que esses efeitos podem ser devidos a alterações epigenéticas, visto que foram observados em BMDM de animais tratados uma única vez com a CTX.

Em quadros de sepse, há excesso de estímulos inflamatórios, o que acarreta um descontrole na ativação de células imunes e na produção de mediadores. Os macrófagos fagocitam em excesso, produzindo uma resposta imunológica intensa que culmina na destruição do próprio hospedeiro.

Reduzir a capacidade dos macrófagos em fagocitar partículas não é um efeito desejado no início do quadro séptico, uma vez que compromete o combate à infecção. Porém, com a progressão da doença, torna-se interessante regular a fagocitose para que ela não se intensifique a ponto de haver excesso de EROs e ERNs, que podem gerar lesões teciduais, por exemplo.

Ainda é cedo para afirmar que a CTX funcionou como um agente terapêutico na sepse. Porém, é possível afirmar com base em nossos resultados que ela foi capaz de modular o sistema imune e reverter a níveis basais certos parâmetros que a sepse altera. A progressão nos estudos da CTX é de suma importância: trata-se de uma molécula que pode vir a ser importante na produção de um medicamento que controle o pico pró-inflamatório da sepse, uma vez que a CTX é capaz de induzir a síntese de LXA₄ e modular a inflamação, além de modular diversas funções de macrófagos, como produção de espécies reativas.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo nos permite concluir que a CTX apresenta efeito anti-inflamatório na sepse, modulando diversas funções dos macrófagos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5. ed. São Paulo: Elsevier, 2005.
- ADHIKARI, N. K., *et al.* Critical care and the global burden of critical illness in adults. **Lancet**.376(9749):1339-46, 2010.
- AIRD, S. D.; *et al.* A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 249, p. 296-300, 1986.
- AKIRA, S., UEMATSU S., TAKEUCHI O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**, [s.l.], v. 124, n. 4, p.783-801, fev. 2006.
- ALLEN, L.-A. H., & ADEREM, A.. Mechanisms of phagocytosis. **Current Opinion in Immunology**, 8(1), 36–4, 1996.
- ALMEIDA, C., S., *et al.* “Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* is able to down-modulate the acute intestinal inflammation in mice.” **PloS one** vol. 10,4 e0121427. 8 Apr. 2015.
- ANAND, R. J., *et al.* Toll-like receptor 4 plays a role in macrophage phagocytosis during peritoneal sepsis. **Journal Of Pediatric Surgery**, [s.l.], v. 42, n. 6, p.927-933, jun. 2007.
- ANDREYEV, A. Y., KUSHNAREVA, Y. E., & STARKOV, A. A.. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Biochemistry (Moscow)**, 70(2), 200–214, 2005.
- ARNALICH, F., *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and mortality in patients with severe sepsis. **Clinical & Experimental Immunology**, 127(2), 331–336, 2002.
- BARJA, G; A HERRERO,. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. **Faseb J**, p.312-318, fev. 2000.
- BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M., & DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, 29(1), 113–123, 2006.
- BENJAMIM, C. F., FERREIRA, S. H., & CUNHA, F. D. Q. Role of Nitric Oxide in the Failure of Neutrophil Migration in Sepsis. **The Journal of Infectious Diseases**, 182(1), 214–223, 2000.

- BERG, D.; GERLACH, H. Recent Advances in Understanding and Managing Sepsis. *F1000Research*, v. 7, p. 1570, 28 set. 2018.
- BLACKWELL, T. S.; CHRISTMAN, J. W. Sepsis and Cytokines: Current Status. *British Journal of Anaesthesia*, v. 77, n. 1, p. 110–117, jul. 1996.
- BORDEN, E. C., CHIN, P. Interleukin-6: a cytokine with potential diagnostic and therapeutic roles. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. 123: 824–829, 1994.
- BOUCHIER, C.; *et al.* Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase A₂-like precursor. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1008, p. 401-408, 1991.
- BOZZA, F., A., *et al.* Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. **Critical Care**, p. 1-8. abr. 2007.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.
- BREITHAUPT, H.; RÜBSAMEN, K.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. Biochemical analysis of crotoxin and the basic *Crotalus* phospholipase. **Eur. J. Biochem.**, v. 49, p. 333-345, 1974.
- BRIGATTE, P., *et al.* Walker 256 Tumor Growth Suppression by Crotoxin Involves Formyl Peptide Receptors and Lipoxin A₄. **Mediators of inflammation**, 2016.
- BUCZYNSKI, M. W., DURLAO D. S., DENNIS E. A. Thematic Review Series: Proteomics An integrated omics analysis of eicosanoid biology. **Journal of lipid research**. 50:1015–1038, 2009.
- BURKE, B., LEWIS, C. E. **The Macrophage**. 2. ed. New York: Oxford, 2002.
- CARDOSO, D. F.; *et al.* Role of crotoxin, a phospholipase A₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. **Mediat. Inflamm.**, v. 10, p. 125-133, 2001.
- CARDOSO, D. F.; MOTA, I. Effect of Crotalus Venom on the Humoral and Cellular Immune Response. **Toxicon**, v. 35, n. 4, p. 607–612, abr. 1997.
- CHAUDHRY, H., *et al.* Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. **In Vivo**, p.669-684, dez. 2013.

- CHOUMET, V., *et al.* Structure and function relationship of crotoxin, a heterodimeric neurotoxic phospholipase A2 from the venom of a South-American rattlesnake. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 391, p. 197-202, 1996.
- COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, [s.l.], v. 420, n. 6917, p.885-891, 19 dez. 2002.
- COSTA, E. S. *et al.* Involvement of Formyl Peptide Receptors in the Stimulatory Effect of Crotoxin on Macrophages Co-Cultivated with Tumour Cells. **Toxicon**, v. 74, p. 167–178, nov. 2013.
- COSTA, E. S., *et al.* Involvement of formyl peptide receptors in the stimulatory effect of crotoxin on macrophages co-cultivated with tumour cells. **Toxicon**, 74, 167–178, 2013.
- CROSS, C. E., *et al.* Oxygen radicals and human disease. **Intern Med.**107(4):526-45, 1987.
- CRUVINEL, W. M., *et al.* Sistema Imunitário - Parte 1: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Goiás, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.
- CRUVINEL, W. M., *et al.* Sistema Imunitário - Parte 1: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Goiás, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.
- CUSHMAN, D. W., ONDETTI, M. A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension**, v. 17, n. 4, p. 589-592, 1991.
- DENG, M. *et al.* Lipopolysaccharide Clearance, Bacterial Clearance, and Systemic Inflammatory Responses Are Regulated by Cell Type-Specific Functions of TLR4 during Sepsis. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 190, n. 10, p.5152-5160, 5 abr. 2013.
- DENNIS, E. A., & NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, 15(8), 511–523, 2015.
- DE-OLIVEIRA, R. B, B, *et al.* Crotoxin-Treated Macrophages Stimulate ROS Production and Killing Activity in Co-Cultured Neutrophils. **Preprints**, 2018.
- DINARELLO, C.A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. **Blood**. 77: 1627–1652, 1991.
- DOCKE, W. D., *et al.* Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. **Nat Med**, p.678-681, jun. 1997.

- ELHELU, M. A. The role of macrophages in immunology. **Journal of the National Medical Association** vol. 75,3: 314-7, 1983.
- ENDO, S., *et al.* Two types of septic shock classified by the plasma level of cytokines and endotoxin. **Circulatory Shock**. 38L 264–274, 1992.
- FAIAD, O. J. Efeito da crotoxina sobre função e o metabolismo de glicose e glutamina de macrófagos durante a progressão tumoral. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- FARIAS, L. H. S., *et al.* Crotoxin stimulates an M1 activation profile in murine macrophages during *Leishmania amazonensis* infection. **Parasitology**, 144(11), 1458–1467, 2017.
- FAURE, G.; XU, H.; SAUL, F. A. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this heterodimeric β -neurotoxin. **J. Mol. Biol.**, Paris, v. 412, p. 176-191, 2011.
- FINKEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species. **J Cell Biol**. 194(1):7-15, 2011.
- FORMAN, H. J. & TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. **Am J Respir Crit Care Med** 166: S4-S8, 2002.
- 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** vol. 2018 7873257. 3 Jun. 2018.
- FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters. **J Biol Chem.**; 272(30):18515-7, 1997.
- GAO, X. *et al.* Role of NADPH Oxidase in the Mechanism of Lung Neutrophil Sequestration and Microvessel Injury Induced by Gram-Negative Sepsis: Studies in p47phox^{-/-} and gp91phox^{-/-} Mice. **The Journal of Immunology**, 168(8), 3974–3982, 2002.
- GODSON, C., *et al.* Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. **J Immunol** 164:1663–1667, 2000.
- GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and Macrophage Heterogeneity. **Nature Reviews**, Oxford, v. 5, p. 953-964, 2005.
- GYAWALI, B. *et al.* Sepsis: The Evolution in Definition, Pathophysiology, and Management. **SAGE Open Medicine**, v. 7, p. 205031211983504, jan. 2019.

- HACK, C. E., *et al.* Increased plasma level of interleukin-6 in sepsis. **Blood**; 74: 1704–1710, 1989.
- HERNANDES, M S *et al.* The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis. **Journal Of Neuroinflammation**, p.1-12, jan. 2014.
- MONSERRAT, J., *et al.* “Early alterations of B cells in patients with septic shock,” **Critical Care**, vol. 17, no. 3, article R105, 2013.
- JUNGER *et al.* Immunosuppression after Endotoxin Shock: The Result of Multiple Anti-inflammatory Factors. **Journal Of Trauma And Acute Care Surgery**, p.702-709, maio 1996.
- KOVACH, Melissa A.; STANDIFORD, Theodore J.. The function of neutrophils in sepsis. **Infectious Diseases**, p. 321-327. jun. 2012.
- KUHNS, D. B., ALVORD, W. G., GALLIN J.I. Increased circulating cytokines, cytokine antagonists, and E-selectin after intravenous administration of endotoxin in humans. **Journal of Infectious Diseases**. 171: 145–152, 1995.
- LAEMMLI, U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature** 227, 680–685, 1970.
- LANDUCCI, E. C. T. *et al.* Crotoxin Induces Aggregation of Human Washed Platelets. **Toxicon**, v. 32, n. 2, p. 217–226, fev. 1994.
- LASKIN, D. L; PENDINO, K. J. Macrophages and Inflammatory Mediators in Tissue Injury. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, New Jersey, v. 35, p. 655-677, 1995.
- LEVY, M. M., *et al.* Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, 12(12), 919–924, 2012.
- LIN, X. Y., *et al.* [Protective effect of early intervention with lipoxin A4 on septic mice]; 21(6):601-606. **Chinese journal of contemporary pediatrics**, 2019.
- LOSCHEN, G., *et al.* Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. **FEBS Letters**, 42(1), 68–72, 1974.
- MACHADO, F. R., *et al.* The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, 17(11), 1180–1189, 2017.
- MADDOX, J. F., SERHAN, C.N. Lipoxin A₄ and B₄ are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction. **J Exp Med** 183:137–146, 1996.

- MANNEL, D. Advances in sepsis research derived from animal models. **International Journal Of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 297, n. 5, p.393-400, 10 set. 2007.
- MARCHESELLI V. L., *et al.* Novel docosanoids inhibit brain ischemiareperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. **J Biol Chem.** 278:43807-43817, 2003.
- MATSUBARA, M. H. **Efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, da crotoxina e de suas subunidades fosfolipase A₂ e crotapotina em monocamadas de células endoteliais de cultura.** 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway.** 7. Ed. São Paulo: Artmed, 2010.
- MURPHY, M. P. “How mitochondria produce reactive oxygen species.” **The Biochemical journal** vol. 417,1: 1-13, 2009.
- 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, p. 1100–1106, 2010.
- OBERHOLZER, C. *et al.* Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndrome and its potential as an anti-inflammatory drug, **Crit. Care Med.** 30(Suppl. 1) S58–S63, 2002.
- O'NEILL, Luke a. j.. A critical role for citrate metabolism in LPS signalling. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 438, n. 3, p.1-2, 15 set. 2011.
- OPAL, S. M.; DEPALO, V. A. Anti-Inflammatory Cytokines. **Chest**, v. 117, n. 4, p. 1162–1172, abr. 2000.
- PAIVA, CN.; BOZZA, MT.. Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens? **Antioxidants & Redox Signaling**, [s.l.], v. 20, n. 6, p.1000-1037, 20 fev. 2014.
- PEDRO, Taís da Costa São; MORCILLO, André Moreno; BARACAT, Emílio Carlos Elias. Etiology and prognostic factors of sepsis among children and adolescents admitted to the intensive care unit. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.240-246, 2015.
- PIMENTA, L. A., *et al.* Crotoxin promotes macrophage reprogramming towards an antiangiogenic phenotype. **Scientific Reports**, 9(1), 2019.
- RANG, H. P. *et al.* **Farmacologia.** 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

- RAWLINGS, D. J., *et al.* “Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors,” **Nature Reviews Immunology**, vol. 12, no. 4, pp. 282–294, 2012.
- RAY, A., *et al.* Isolation of Mouse Peritoneal Cavity Cells. **J. Vis. Exp.** (35), e1488, doi:10.3791/1488, 2010.
- REMICK, D.G. *et al.* Role of interleukin-6 in mortality from and physiologic response to sepsis. **Infect. Immun.**, 73, pp. 2751-2757, 2005.
- RHEE, S. G., *et al.* Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. **Sci STKE** October 10, 2000.
- ROMANO, M., *et al.* Lipoxin Receptors. **The Scientific World JOURNAL**, 7, 1393–1412, 2007.
- ROMERO, C. R., *et al.* The role of interferon- γ in the pathogenesis of acute intra-abdominal sepsis. **Journal of leukocyte biology**, 88(4), 725–735, 2010.
- SAMPAIO, S. C., *et al.* Crotalus durissus terrificus snake venom regulates macrophage metabolism and function. **J. Leukoc. Biol.**, v. 70, p. 551-558, 2001.
- SAMPAIO, S. C., *et al.* Crotoxin: Novel activities for a classic β -neurotoxin. **Toxicon** 55: 1045-1060, 2010.
- SAMPAIO, S. C.; *et al.* Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. **Toxicon**, v. 47, p. 313-321, 2006.
- SAMPAIO, S., *et al.* Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of Crotalus durissus terrificus snake venom on macrophage function. **Toxicon**, 41(7), 899–907, 2003.
- SAMPAIO, S.c. *et al.* Inhibitory effect of phospholipase A2 isolated from Crotalus durissus terrificus venom on macrophage function. **Toxicon**, [s.l.], v. 45, n. 5, p.671-676, abr. 2005.
- SAMUELSSON, B. Role of Basic Science in the Development of New Medicines: Examples from the Eicosanoid Field. **Journal of Biological Chemistry**, 287(13), 2012.
- SAWAI, N., *et al.* “Role of gamma interferon in Helicobacter pylori-induced gastric inflammatory responses in a mouse model.” **Infection and immunity** vol. 67,1: 279-85, 1999.
- SERHAN, C. N. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 73(3-4), 141–162, 2005.

- SERHAN, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**. 510(7503):92–101, 2014.
- SERHAN, C. N., *et al.* Lipoxin and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin cellular interactions anti-inflammatory lipid mediators. **Clin Chem Lab Med**. 37:299–309, 1999.
- SERHAN, C. N., *et al.* Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter pro-inflammation signals. **J. Exp. Med.**, 196, p. 1025, 2002.
- SHALABY, M. R., *et al.* Endotoxin, tumor necrosis factor- α and interleukin 1 induce interleukin 6 production in vivo. **Clinical Immunology and Immunopathology**, 53(3), 488–498, 1989.
- SINGERr, M., *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, 315(8), 801, 2016.
- SIQUEIRA-BATISTA, Rodrigo *et al.* Sepse: atualidades e perspectivas. **Rev Bras Ter Intensiva**, Viçosa, v. 23, n. 2, p.207-216, 2011.
- SLOTTA, K. H., FRAENKEL-CONRAT, H. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. 4-Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. Mem. Inst. Butantan, 12: 505-12, 1938.
- SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. Two active proteins from rattlesnake venoms. **Nature**, v.142, p. 213, 1938.
- SORIANO, F G *et al.* Resistance to acute septic peritonitis in poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice. **Shock**, p.286-292, abr. 2002.
- THEOBALDO, Mc *et al.* Hypertonic saline solution reduces the inflammatory response in endotoxemic rats. **Clinics**, [s.l.], v. 67, n. 12, p.1463-1468, 17 dez. 2012.
- TILLMANN B, *et al.* Epidemiology and outcomes. **Crit Care Clin**. 34(1):15-27, 2018.
- TOSCANO, Miguel G.; GANEA, Doina; GAMERO, Ana M.. Cecal Ligation Puncture Procedure. **Journal Of Visualized Experiments**, [s.l.], n. 51, p.1-5, 7 maio 2011.
- VITAL-BRAZIL, O. Neurotoxins from South American rattlesnake. **J. Formosan. Med. Assoc.**, v.71, p. 394-396, 1972.
- VITAL-BRAZIL, O. Neurotoxins from South American rattlesnake. **J. Formosan. Med. Assoc.**, v.71, p. 394-396, 1972.
- WALKER, J., DICHTER, E, LACORTE, G. Lipoxin A₄ increases survival by decreasing systemic inflammation and bacterial load in sepsis. **Shock**, 36, pp. 410-416, 2011.

- WU, B., *et al.* Effects of Lipoxin A4 on antimicrobial actions of neutrophils in sepsis. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, 94, 55–64, 2015.
- WU, B., *et al.* Lipoxin A4 promotes more complete inflammation resolution in sepsis compared to stable lipoxin A4 analog. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, 89(1), 47–53, 2013.
- ZAMBELLI, V.O., *et al.* Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. **Toxicon** 51, 1357– 1367, 2008.
- ZAVARIZ, Silvia M. R. *et al.* Marcadores laboratoriais do choque séptico. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 16, n. 1, p.29-37, 2006.
- ZHAO, Y., *et al.* Comparison of the characteristics of macrophages derived from murine spleen, peritoneal cavity, and bone marrow. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, 18(12), 1055–1063, 2017.
- ZHENG, Yijie *et al.* Suppression of PTRF Alleviates the Polymicrobial Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture in Mice. **The Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 208, n. 11, p.1803-1812, 1 ago. 2013.