

**TALLITA ÁUREA DOS SANTOS SILVA**

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CROTOXINA ISOLADA DO  
VENENO DE *Crotalus durissus terrificus* SOBRE A  
ATIVÇÃO DE LINFÓCITOS B E RESPOSTA IMUNE  
HUMORAL”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Dra. Eliana Faquim de Lima Mauro

São Paulo  
2020

## RESUMO

SILVA, T, A. **Avaliação do efeito da crotoxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a ativação de linfócitos B e resposta imune humoral.** 2020. 111 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2020.

Moléculas de origem animal com atividade imunomoduladora têm sido alvo de inúmeros estudos devido seu potencial terapêutico. O envenenamento pela cascavel *Crotalus durissus terrificus* apresenta como características a baixa resposta inflamatória local, porém ações sistêmicas. Somado a isso, este veneno induz baixa produção de anticorpos contra seus componentes, assim como contra um antígeno heterólogo. A crotoxina (CTX) é o componente majoritário deste veneno e, dentre suas atividades biológicas está a ação imunomoduladora. Nós temos estudado o efeito modulador da CTX sobre a imunidade adaptativa. Com relação à imunidade humoral, em estudo anterior foi verificado que a administração da CTX antes ou após a imunização de camundongos com a albumina humana (SAH) na presença de adjuvantes distintos resulta na inibição da produção de anticorpos anti-SAH. Considerando que os linfócitos B são responsáveis pela produção dos anticorpos antígeno-específicos e pela memória imunológica humoral, neste projeto estudamos o efeito da CTX sobre a produção de anticorpos anti-ovalbumina (OVA) e sobre os linfócitos B *in vivo*, assim como a ativação dessa população celular *in vitro*. Para isso, avaliamos a produção de anticorpos anti-OVA em diferentes períodos após a imunização dos camundongos com OVA adsorvida em Alum e que receberam ou não a CTX e ainda, as populações de linfócitos B presentes nos linfonodos drenantes do sítio de imunização desses animais. Além disso, estudamos o efeito direto da CTX sobre a ativação e proliferação das células B incubadas com estímulos mitogênicos *in vitro*. Os resultados permitiram verificar que a administração da CTX resultou em menor produção de anticorpos IgM, IgG1 e IgG2a anti-OVA em relação ao obtido nos animais apenas imunizados com a OVA, além disso verificamos menor porcentagem das populações de células B. Os resultados obtidos sugerem também que a CTX inibe a população de células CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> nos animais imunizados com OVA. Por outro lado, verificamos que a produção de anticorpos anti-OVA em

animais imunizados 90 dias antes e que receberam ou não a CTX foi semelhante. Em experimentos *in vitro*, verificamos que a CTX não induz morte dos linfócitos B, no entanto, foi capaz de inibir a proliferação de células B incubadas com LPS na presença ou não de anti-CD40 ou ainda, incubadas com anticorpos anti-IgM e anti-CD40. Observamos também que a CTX inibiu a expressão das moléculas CD80 e CD86 nos linfócitos B incubados com LPS e anti-CD40. Além disso, verificamos que a CTX potencializou a expressão de IL-10 em células CD19<sup>+</sup> incubadas com LPS *in vitro*. Portanto, o conjunto de resultados obtidos demonstra que a CTX é capaz de atuar diretamente sobre os linfócitos B interferindo na sua ativação, proliferação e produção de anticorpos frente a um estímulo heterólogo como a OVA ou mitogênico.

**Palavras-chave:** *Crotalus durissus terrificus*, crotoxina, produção de anticorpos, Linfócitos B, Imunomodulação.

## ABSTRACT

SILVA, T, A. **Effect of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on B lymphocytes activation and humoral response.** 2020. 111 p. Master thesis (Immunology) Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2020.

Molecules of animal origin that present immunomodulatory activity have been the focus of several scientific studies due to their therapeutic potential. The envenoming by the *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.terrificus*) rattlesnake is characterized by low local inflammatory reaction in addition to the systemic effects. In addition, it was shown that, distinct from others snake venoms, the *C.d.terrificus* venom induces low antibodies production against its components, as well as against an unrelated antigen. The crotoxin (CTX) is the main component of this venom and, among its biological activities, it is included the immunomodulatory action. We have been studied the modulatory effect of CTX on adaptive immunity. Concerning about the humoral immunity, we previously showed that the CTX administration before or after the mice immunization with human serum albumin (HSA) in the presence of distinct adjuvants results in inhibition of anti-HSA antibody production. Considering that the B lymphocytes are responsible by antigen-specific antibody production and also humoral immunological memory, in this project we studied the effect of CTX on the antibody production induced by ovalbumin (OVA) as well as on B lymphocytes activation *in vivo* and *in vitro*. For this, we evaluated the production of anti-OVA antibodies in different periods after the immunization of mice with OVA adsorbed in Alum and that received or not the CTX as well as the B cell populations present in the draining lymph nodes of the immunization site of these mice. Furthermore, we studied the direct effect of CTX on B cells activation and proliferation induced by mitogenic stimulus *in vitro*. The results showed that the administration of CTX resulted in lower production of IgM, IgG1 and IgG2a anti-OVA antibodies compared to those obtained in mice only immunized with OVA accompanied by lower percentage of all B cell populations evaluated. The data also suggest that CTX inhibits the CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> cell population in mice immunized with OVA. On the other hand, similar amounts of anti-OVA antibody production in mice immunized 90 days before and that received or not CTX. In *in vitro* experiments, we observed that CTX does not induce death of B lymphocytes, as well as the proliferation of these cells. In addition, we found that CTX was able to inhibit the proliferation of B cells incubated with LPS in the presence of anti-CD40 mAb or incubated with anti-IgM and anti-CD40 mAbs. We also observed that the CTX inhibited the expression of CD80 and CD86 molecules in B lymphocytes incubated with LPS and anti-CD40. In addition, we found that CTX potentiated IL-10 expression in CD19<sup>+</sup> cells incubated with LPS *in vitro*. Therefore, our results demonstrate that

the CTX is able to act directly on B lymphocytes interfering in their activation, proliferation and production of antibodies induced by a heterologous antigen and also mitogenic stimulation.

**Key-words:** *Crotalus durissus terrificus*, crotoxin, antibody production, B lymphocytes, Immunomodulation.

## 1. INTRODUÇÃO

Existem em torno de 3.000 espécies de serpentes e cerca de 410 são consideradas peçonhentas. Envenenamentos por serpentes representam importante problema de saúde pública nos países tropicais, devido a sua alta incidência, gravidade e sequelas (RIBEIRO et al., 1998; PINHO et al., 2000).

No Brasil estão catalogadas 256 espécies de serpentes, das quais 69 são peçonhentas (FEITOSA et al., 1997; PINHO et al., 2000). Dentre as famílias de serpentes encontradas no território brasileiro, a *Viperidae* se destaca por representar o grupo com maior relevância para a saúde pública, visto que é responsável pela grande maioria dos acidentes ofídicos e gravidade relatada (CARDOSO et al., 2003).

De acordo com dados do Sinan, no ano de 2019, cerca de 85,2 % dos acidentes ofídicos relatados foram causados por serpentes do gênero *Bothrops* e 10,7 % pelo gênero *Crotalus*. Os acidentes por serpentes do gênero *Crotalus* se destacam pelo significativo índice de letalidade (cerca de 1,3 %) na ausência de tratamento apropriado.

As serpentes do gênero *Crotalus* são predominantemente encontradas em regiões rochosas, áridas e de vegetação baixa (CARDOSO et al., 2003). Estas serpentes são identificadas pelo guizo ou chocalho encontrado na extremidade caudal e são representadas no Brasil por uma única espécie *Crotalus durissus*, que pode ser subdividida em seis subespécies de acordo com sua coloração e distribuição geográfica (SANTORO et al., 1998; PINHO et al., 2000; CARDOSO et al., 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Dentre elas, podemos citar *C.d.cascavella*, *C.d.collineatus* e a *C.d.terrificus* como sendo as mais prevalentes (SANTORO et al., 1998).

Das subespécies de *Crotalus* a mais estudada é *C.d.terrificus*, por apresentar o veneno com maior toxicidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

O quadro clínico causado pelo envenenamento por serpentes *C.d.terrificus*, apresenta ação neurotóxica caracterizada pelo aparecimento de fácies miastênica, onde se observa ptose palpebral, flacidez da musculatura facial, paralisia dos nervos cranianos e diplopia (ROSENFELD,

1971). Em virtude da atividade neurotóxica, é também observada insuficiência respiratória (ROSENFELD, 1971; AMARAL, 1991). Além disso, devido a ações miotóxica e coagulante do veneno, observa-se o quadro de rabdomiólise generalizada e incoagulabilidade sanguínea (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985, 1987; MAGALHÃES et al., 1986; JORGE e RIBEIRO, 1992; SANTORO et al., 1999). Em casos moderados ou graves, observam-se hipotensão, falência renal aguda e desordens hemostáticas (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985, 1987 e 2003; SANO-MARTINS et al., 2001; HERNANDEZ CRUZ et al., 2008).

Apesar destes efeitos sistêmicos marcantes, o envenenamento por *C.d. terrificus* não provoca reações locais graves, ou seja, sinais inflamatórios como edema e dor no local da picada (ROSENFELD, 1971; SOUSA-E-SILVA et al., 1996).

### **1.1. Componentes do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus***

O veneno da serpente *C.d. terrificus* é uma mistura complexa de diversas toxinas (crotamina, crotoxina, giroxina, convulxina) enzimas (5-nucleotidase, fosfodiesterase, trombina, Lamino-oxidase) e peptídeos que são responsáveis pela fisiopatologia observada no envenenamento (BERCOVICI et al., 1987; SAMPAIO et al., 2010; CALVETE et al., 2010; FUSCO et al., 2015).

A convulxina é uma glicoproteína de 72 kDa que representa cerca de 5% do veneno total (BERCOVICI et al., 1987), é tóxica quando injetada via intravenosa e provoca efeitos como ativação e agregação plaquetária (PRADO-FRANSCESCHI; VITAL BRASIL, 1981; VARGAFTIG et al., 1983).

A crotamina é uma miotoxina polipeptídica com massa molecular de 4,8 kDa, que representa aproximadamente 17% do veneno total (LAURE et al., 1975), atua na membrana das fibras musculares, onde altera sua permeabilidade ao sódio produzindo espasmos musculares (MOURA-GONÇALVEZ; VIEIRA, 1950; AZEVEDO MARQUES et al., 1985).

Outro componente do veneno, a giroxina (BARRIO, 1961), é uma glicoproteína com peso molecular de 35 kDa (ALEXANDER et al., 1988), esta toxina é uma enzima trombina-símile e apresenta atividades amidásica, esterásica e fibrinogenolítica (BARRIO, 1961). Em camundongos provoca

síndrome convulsiva, caracterizada pelo movimento giratório ao longo do eixo longitudinal da cauda, característico de ação neurotóxica (ALEXANDER et al., 1988).

A crotoxina (CTX) exerce ação neurotóxica, apresentando efeito pré-sináptico onde inibi a liberação de acetilcolina resultando no bloqueio da transmissão neuromuscular (FAURE; BOM, 1988), o que ocasiona uma paralisia dos músculos faciais, ptose palpebral, visão turva e progressiva paralisia respiratória e muscular. Além disso, evidências sugerem que a CTX também apresenta ação nefrotóxica e cardiotoxica (SALVINI et al., 2001; MELO et al., 2004; AMORA et al., 2006; HERNANDEZ et al., 2008).

### 1.1.1 Crotoxina

Os venenos de serpentes compreendem uma mistura de moléculas biologicamente ativas, nos quais as fosfolipases (PLA<sub>2</sub>) são um de seus componentes mais abundantes (GELBRIM et al., 2009).

Dentre as toxinas presentes no veneno de serpentes *C. d. terrificus* destaca-se a CTX que representa a fração majoritária, ou seja, cerca de 60% da composição e, é responsável pela toxicidade do veneno (SLOTTA; FRAENKEL-CONRAT, 1938; VITAL BRAZIL et al., 1972; STOCKER, 1990).

Esta toxina, com massa molecular de aproximadamente 24 kDa é um heterodímero formado por duas subunidades associadas de forma não covalente, sendo uma ácida chamada Crotopotina (CA) desprovida de ação tóxica e uma subunidade básica (CB) que apresenta atividade de PLA<sub>2</sub> (SLOTTA; FRANKEL CONRAT, 1938; FRANKEL CONRAT et al., 1971; AZEVEDO-MARQUES et al., 1985; SAMPAIO et al., 2010). Ambas as cadeias CA e CB são importantes para atividade da CTX, uma vez que a CA tem função de chaperona conduzindo CB para o alvo celular (BON et al., 1979; FRAURE E BOM, 1988). No caso de terminações nervosas, sabe-se que a CTX circula como um complexo, até reconhecer seu sítio específico na membrana alvo, e exerce seu efeito por meio da associação de CB ao seu receptor, o que leva a dissociação do complexo, enquanto CA permanece em solução (CHANG et al., 1981; RADVANYL et al., 1989).



A subunidade CA apresenta massa molecular de 8,9 kDa, formada por três cadeias polipeptídicas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) unidas por pontes dissulfeto (AIRD et al., 1986; PEREAÑEZ *et al.*, 2012) geradas pela quebra proteolítica do precursor de CA, deste precursor foram isoladas quatro isoformas classificadas como CA1, CA2, CA3 e CA4. A subunidade CA, impede que CB se ligue em sítios inespecíficos, sugerindo que, quando a CTX atinge a membrana alvo, forma-se um complexo ternário transitório entre o receptor e as subunidades da CTX (DOLEY, KINI, 2009).

A subunidade CB é uma enzima PLA<sub>2</sub> e apresenta em torno de 14 kDa, constituída por uma cadeia polipeptídica simples de 122 aminoácidos ligados por sete pontes dissulfeto (AIRD et al., 1986). CB possui maior atividade enzimática que o complexo CTX, porém com menor toxicidade, uma vez que são necessárias maiores doses de CB para bloquear a transmissão neuromuscular, se comparada a CTX ou veneno crotálico (CHOUMET *et al.*, 1996).

As PLA<sub>2</sub> (também conhecidas por fosfatidil – acil – hidrolases) são enzimas presente em altas concentrações nos venenos de serpentes, abelhas, vespas e no suco pancreático de mamíferos (HARRIS, 1991). Nos venenos de serpentes apresentam amplo espectro de atividades biológicas, dentre elas, ação neurotóxica, cardiotoxica, edematogênica, anticoagulante, hemolítica e miotóxica (KINI; EVANS, 1989; MONTECUCCO et al., 2008). A toxicidade das PLA<sub>2</sub> está relacionada com sua ligação a receptores específicos na superfície de células alvo, descritos como do tipo M (muscular) e N (neuronal). Os do tipo N estão presentes em grande número em membranas do cérebro de ratos e são constituídos por, ao menos, dois sítios de ligação de alta afinidade (RIZZO et al., 2000). Estes receptores apresentam alta afinidade por uma variedade de PLA<sub>2</sub> neurotóxicas, incluindo a CTX. O que sugere que os receptores do tipo N sejam cruciais para o efeito neurotóxico (LAMBEAU; LAZDUNSKI, 1999).

O mecanismo pelo qual a PLA<sub>2</sub> leva a lesão celular é uma consequência de alterações na membrana plasmática que promove um grande aumento da concentração de CA<sup>2+</sup> citosólico de forma que ative mecanismos intracelulares que levam a degradação e conseqüentemente morte celular (MONTECUCCO et al., 2008; SAMPAIO *et al.*, 2010).

## 1.2. Sistema imune e veneno crotálico

Além das atividades biológicas clássicas, foi observado que este veneno induz baixa produção de anticorpos quando comparado a outros venenos ofídicos (ROLIM-ROSA, 1980 e 1981; SOERENSEN, 1990). Outros trabalhos mostraram que o veneno promove inibição da produção de anticorpos IgG contra um antígeno não-relacionado como a ovalbumina (OVA) ou albumina humana (SAH) indicando um potencial efeito sobre o sistema imune (CARDOSO e MOTA, 1997). Somado a isso, neste mesmo trabalho foi verificado que a CTX, e não suas subunidades isoladas, exerce esse efeito imunossupressor.

Rangel-Santos e Mota (2000) relataram que o efeito supressor do veneno e da CTX sobre a produção de anticorpos contra seus próprios antígenos ou anti-SAH é mantido mesmo após o aquecimento do veneno à 50° C e da CTX entre 50- 75° C. Em outro trabalho, Rangel-Santos e colaboradores (2004) mostraram ainda, que o veneno total e a CTX foram também efetivos em inibir a resposta proliferativa esplenócitos estimulados *in vitro* com concanavalina A (ConA), assim como a produção de algumas citocinas. Esses autores mostraram também, que a transferência de linfócitos T e B purificados de camundongos injetados com o veneno ou a CTX para camundongos imunizados com SAH resultou em diminuição da produção de IgG1 anti-SAH.

Sousa e Silva (1996) evidenciaram um efeito anti-inflamatório do veneno de *C.d.terrificus* sobre macrófagos residentes ou previamente ativados. Os autores mostraram que macrófagos incubados com o veneno tiveram algumas funções diminuídas como atividade fagocítica e espraiamento. Sampaio e colaboradores (2003 e 2005) observaram que este efeito do veneno de *C.d.terrificus* sobre as funções de macrófagos é mediado pela CTX, bem como sua subunidade CB. Em outro trabalho, foi observado que o veneno total e a CTX são capazes de induzir rearranjo do citoesqueleto de macrófagos peritoneais de ratos, sendo este efeito associado com a diminuição da atividade de proteínas envolvidas nas vias de sinalização intracelular relacionadas com as funções de fagocitose e espraiamento (SAMPAIO et al., 2006).

Modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a CTX também apresenta ação anti-tumoral (RUDD et al., 1994). Assim, foi mostrado que o efeito da CTX sobre o crescimento do tumor está relacionado à sua ação sobre os macrófagos que são cruciais no microambiente tumoral (COSTA et al., 2013).

De Araújo Pimenta e colaboradores (2019) mostraram que a CTX promove a reprogramação de macrófagos em direção a um fenótipo antiangiogênico, visto que tanto macrófagos tratados com CTX, como seus sobrenadantes inibiram a proliferação, adesão, velocidade e número de células endoteliais migradas e conseqüentemente, a formação de tubos capilares. Os autores verificaram também diminuição nos níveis de VEGF e TNF- $\alpha$  nos sobrenadantes de macrófagos tratados.

Zambelli e colaboradores (2008) evidenciaram que a CTX induz diminuição significativa do número de linfócitos na circulação sanguínea e linfática por meio da retenção dos linfócitos T e B nos linfonodos de ratos. Além disso, foi demonstrado efeito inibitório da CTX sobre a resposta inflamatória e sobre as funções de neutrófilos (NUNES et al., 2010; LIMA et al., 2012).

Em 2003, Garcia e colaboradores demonstraram que a crotapotina (CA) é capaz em inibir a proliferação de esplenócitos murinos estimulados com ConA, além de induzir nas culturas o aumento da síntese de PGE<sub>2</sub>.

Portanto, vários modelos experimentais mostram que a CTX exerce uma variedade de ações que incluem: imunomoduladora, anti-inflamatória, anti-tumoral, analgésica e atividade antimicrobiana (SAMPAIO et al., 2010; COSTA et al., 2013; DA SILVA et al., 2013; BRIGATTE et al., 2016; (SARTIM et al., 2018). Isto posto, essa molécula é um alvo para os estudos de suas atividades biológicas e ainda, sobre o sistema imune.

A elucidação dos mecanismos de ação de moléculas imunomoduladoras tem sido alvo de inúmeros estudos, visto que podem contribuir para novas abordagens terapêuticas para diversas desordens imunológicas. Neste sentido, o objetivo do nosso grupo de pesquisa tem sido avaliar o efeito modulador da CTX sobre alguns parâmetros da imunidade inata e indução da imunidade adaptativa. Neste contexto, observamos que a CTX é capaz de modular a atividade funcional das células dendríticas (DCs) que são essenciais para a

ativação dos linfócitos T e que esse efeito é dependente de receptores peptídeo-formil (FPRs) (FREITAS *et al.*, 2018).

Em outro trabalho desenvolvido pelo nosso grupo demonstramos que a CTX é capaz de inibir a resposta inflamatória aguda intestinal induzida pela instilação intrarretal de ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). Esta ação foi mediada pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, células Th17, e linfócitos inatos do tipo 3 (ILC3). Além disso, verificamos que a CTX induziu nos animais aumento da secreção de IL-10 e TGF- $\beta$ , produção de PGE<sub>2</sub> e LXA<sub>4</sub> e células Treguladoras (Tregs) (ALMEIDA *et al.*, 2015).

Em nossos estudos sobre o efeito da CTX na resposta imune induzida por um antígeno não-relacionado verificamos que a administração desta toxina horas após a imunização dos camundongos com SAH associada ao Alum ou adjuvante completo de Freund (ACF) resulta na inibição da síntese de anticorpos anti-SAH e da proliferação de linfócitos T incubados *in vitro* com SAH ou ConA. Por outro lado, constatamos que a intensidade da supressão induzida pela CTX variou de acordo com o adjuvante utilizado na imunização. Outros resultados mostram que a supressão da resposta de anticorpos anti-SAH exercida pela CTX não é mediada pela indução de morte das células linfoides por necrose ou apoptose (FAVORETTO *et al.*, 2011). No entanto, o mecanismo de ação da CTX sobre a imunidade humoral ainda não está elucidado. Assim sendo, pretendemos avaliar a ação da CTX sobre a ativação e diferenciação dos linfócitos B e consequente produção de anticorpos e assim, ampliar os conhecimentos sobre os mecanismos de ação de moléculas moduladoras do sistema imune.

### **1.3. Resposta imunológica**

O sistema imune responde a diversos agentes patogênicos por meio de mecanismos dependentes da imunidade inata e adaptativa, sendo a resposta inflamatória a primeira barreira de defesa e a promotora da imunidade adquirida (BOOM *et al.*, 1987; STREET *et al.*, 1999). Portanto, o estado de ativação das células inatas e presença de fatores solúveis como citocinas e mediadores lipídicos podem determinar a ativação e diferenciação dos

linfócitos T e dos linfócitos B produtores de anticorpos antígeno-específicos (ROMAGNANI, 1992).

DCs, como células da imunidade inata, estão diretamente envolvidas na apresentação dos agentes/produtos patogênicos para os linfócitos T induzindo sua ativação e diferenciação em célula efetora com perfil Th1, Th2, Th17 ou Tregs (STEINMAN & NUSSENZWEIG, 2002; KAIKO et al., 2008). O sinal inicial para ativação de células T CD4<sup>+</sup> é proveniente da interação entre o receptor de antígeno associado ao complexo CD3 (TCR/CD3) expressos na membrana celular, e o peptídeo antigênico apresentado pela molécula do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II) na superfície das células apresentadoras de antígeno (*antigen presenting cells*, APCs). Além do reconhecimento do antígeno, outras moléculas expressas pelas APCs fornecem o 2<sup>o</sup> sinal necessário para a ativação dos linfócitos T (SCHWARTZ et al., 1990; JUNE et al., 1994; CROFT, 2003). Assim sendo, a interação entre a molécula CD28 expressa no linfócito T e seus ligantes CD80/CD86 nas APCs provê esse sinal coestimulador para a proliferação e diferenciação celular (THOMPSON et al., 1989; DING e SHEVACH, 1994; LANZAVECCHIA, 2001).

A interação entre a molécula CD40 expressa pelas APCs e seu ligante CD40 (CD40L-CD154) na membrana de linfócitos T também exerce papel importante na ativação tanto do linfócito T como na APC (DIEHL et al., 2000). A ligação entre CD40-CD40L nas DCs estimula a expressão de outras moléculas envolvidas com a apresentação dos antígenos para os linfócitos T favorecendo desta maneira, a ativação destes linfócitos (O`SULLIVAN et al., 2003).

Como já mencionado, várias são as células imunes capazes de apresentar os antígenos para os linfócitos T, entretanto as DCs são as principais iniciadoras da resposta adaptativa, uma vez que estão localizadas nas portas de entrada dos antígenos e são eficientes na captura, processamento e apresentação dos peptídeos associados às moléculas do MHC, expressão de moléculas coestimuladoras e migração para os tecidos linfoides secundários (ITANO-JENKINS, 2003). Estas células são altamente especializadas no reconhecimento de microrganismos por receptores de membrana que interagem com padrões moleculares presentes em patógenos (PAMPs) via diferentes receptores, como por exemplo os do tipo *Toll* (*Toll like receptors*- TLRs) que, ligados seletivamente, geram sinais intracelulares de

ativação e maturação celular (STEINMAN & NUSSENZWEIG, 2002; KAIKO et al., 2008).

Patógenos como bactérias e protozoários promovem a ativação e maturação das DCs, bem como a secreção de citocinas, como a IL-12 por essas células que, no conjunto, resultam na diferenciação dos linfócitos para o subtipo Th1. Por outro lado, antígenos de helmintos ou alérgenos parecem ser reconhecidos pelas DCs em contexto pouco inflamatório e, quando na presença de IL-4, direcionam os linfócitos para o subtipo Th2 (MACDONALD et al., 2002). Outros trabalhos descrevem que alguns patógenos ou seus produtos exercem efeito inibitório sobre as DCs mantendo-as imaturas e/ou tolerogênicas (DUGAST-VANHOVE, 2009). Além da ação direta dos patógenos sobre as DCs, citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*- $\beta$ ) podem induzir DCs imaturas a se tornarem tolerogênicas e assim induzem a diferenciação dos linfócitos Tregs. Macrófagos e linfócitos B também expressam moléculas de classe II do MHC e são capazes de ativar os linfócitos TCD4<sup>+</sup> (CATRON et al., 2004). Uma vez ativados pelas APCs, os linfócitos T migram para a região de contato com os linfócitos B e participam da ativação e sua diferenciação em células secretoras de anticorpos ou memória (BARRINGTON, 2002).

Os linfócitos B são amplamente conhecidos por serem responsáveis pela resposta imune humoral. Porém, outras funções têm sido atribuídas a estas células como: apresentação de antígenos, produção de citocinas inflamatórias e ainda, funções regulatórias exercidas pelas células B reguladoras (Breg), as quais modulam de forma negativa a resposta celular. Nesse contexto, trabalhos têm mostrado que as Bregs desempenham um papel inibitório na polarização de linfócitos T CD4<sup>+</sup> para os perfis Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub>, suprimem linfócitos T CD8<sup>+</sup> e APCs, via inibição da apresentação antigênica. Esse potencial regulador das Bregs ocorre primariamente por meio da produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- $\beta$ . Além de funções supressoras, as Bregs também são capazes de induzir células T regs alterando o balanço T<sub>reg</sub>/Th<sub>17</sub> (LEBIEN E TEDDER, 2008; YANABA et al., 2009; MAURI, 2010; BOUAZIZ et al., 2010; WATA et al., 2011; YOSHIZAKI et al., 2012; MAURI E BOSMA, 2012; YANG et al., 2013; KALAMPOKIS et al., 2013; ROSSER E MAURI, 2015).

Em conjunto, os trabalhos citados mostram que em situações onde se observa indução de tolerância, geração de células  $T_{\text{Regs}}$  ou supressão da resposta de linfócitos T, a ativação e a diferenciação dos linfócitos B podem ser comprometidas e conseqüentemente a produção dos anticorpos antígeno-específicos (LIM et al., 2005). Além disso, há evidências de que além da interação com os linfócitos T, macrófagos e DCs provêm sinais de sobrevivência para os linfócitos B secretores de anticorpos e, portanto, qualquer interferência/modulação da atividade dessas células pode comprometer a resposta humoral (ZHU et al., 2010; CERUTTI et al., 2012).

#### **1.4. Ontogenia de linfócitos B**

A resposta imune humoral é mediada por anticorpos específicos contra diferentes agentes patogênicos produzidos por linfócitos B previamente ativados. Através dos receptores Fc (FcR), os anticorpos podem ativar macrófagos, promover a fagocitose e apresentação antigênica e mediar a citotoxicidade (JEFFERIS E LUND, 2002; JEFERRIS, 2005).

As células B imaturas à medida que se tornam independentes dos fatores estromais vão sendo exportadas da medula óssea e terminam seu processo de maturação no baço, onde adquirem em sua membrana a expressão de IgD (NUTT et al., 2015). Estas células são chamadas de células B transitórias, pois representam um estágio intermediário de desenvolvimento (BANCHEREAU E ROUSSET, 1992; ALLMAN et al., 2004). As células B maduras podem ser categorizadas em células B1 situadas na cavidade pleural, peritônio e em mucosas e células B2 que são subdivididas em linfócitos B da zona marginal (ZM) do baço e linfócitos B foliculares (FO), os quais encontram-se nos folículos linfoides de linfonodos e baço. A localização das populações de linfócitos B ZM e B1 permite uma rápida resposta a patógenos circulantes, enquanto que os linfócitos B FO que compõe o subtipo majoritário respondem predominantemente a antígenos proteicos (AMLOT et al., 1985; TIMENS et al., 1989; SPENCER et al., 1998; ALLMAN E PILLAI, 2008; SAMITAS et al., 2010; CERUTTI, 2013).

Os estágios de maturação dos linfócitos B podem ser distinguidos por um padrão específico de genes de imunoglobulinas e outras proteínas de

membrana que servem como marcadores fenotípicos expressos ao longo de todo o processo de desenvolvimento das células B. As células progenitoras dessa linhagem são chamadas de pró-B e derivam diretamente de células-tronco hematopoiética pluripotentes. As células pró-B não expressam imunoglobulinas (Ig) em sua membrana, porém, podem ser distinguidas de outras células imaturas pela expressão de moléculas de superfície restritas à linhagem B, como CD19. Durante esse estágio de desenvolvimento ocorrem os processos de rearranjos dos segmentos gênicos da cadeia pesada das imunoglobulinas que resulta na expressão de uma cadeia pesada chamada  $\mu$ , que passa a caracterizar a próxima linhagem, as células pré-B. No estágio pré-B, as células expressam um receptor formado pela associação da cadeia pesada de imunoglobulinas com proteínas substitutas de cadeia leve, homólogas entre si, e proteínas de transdução de sinais ( $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$ ), este receptor é denominado de pré-BCR. O pré-BCR emite sinais de sobrevivência e proliferação, além de ser responsável por inibir o rearranjo adicional das cadeias pesada e leves (ZHANG, 2004; CLARK et al., 2014; PETKAU E TURNER, 2019). Com a formação completa de uma molécula de IgM, essa imunoglobulina também passa a ser expressa na membrana celular e esta linhagem, então, passa a ser chamada de célula B imatura. A partir desta etapa os linfócitos B imaturos migram para o baço, a fim de terminar seu processo de maturação (RETH, 1992; MEFFRE, 2000; HARDY, 2001; MELCHERS, 2015; PETKAU E TURNER, 2019)

### **1.5 Ativação de linfócitos B**

A ativação T-dependente dos linfócitos B é iniciada pelo encontro com seu antígeno específico no tecido linfoide e, para que isso ocorra, vários sistemas existem no linfonodo ou baço que aumentam a possibilidade de interação do antígeno com o receptor de antígeno (*B Cell Receptor-BCR*) (CARRASCO; BATISTA, 2006; DEPOIL, 2008; NUTT et al., 2015; RADBRUCH et al., 2006; KOMETANI E KUROSAKI, 2015). Duas populações celulares estão envolvidas nesse processo: macrófagos e as DCs. Essas células expressam receptores que mantêm os antígenos disponíveis no tecido linfoide para interação com os linfócitos B virgens. Após a interação cognata entre o

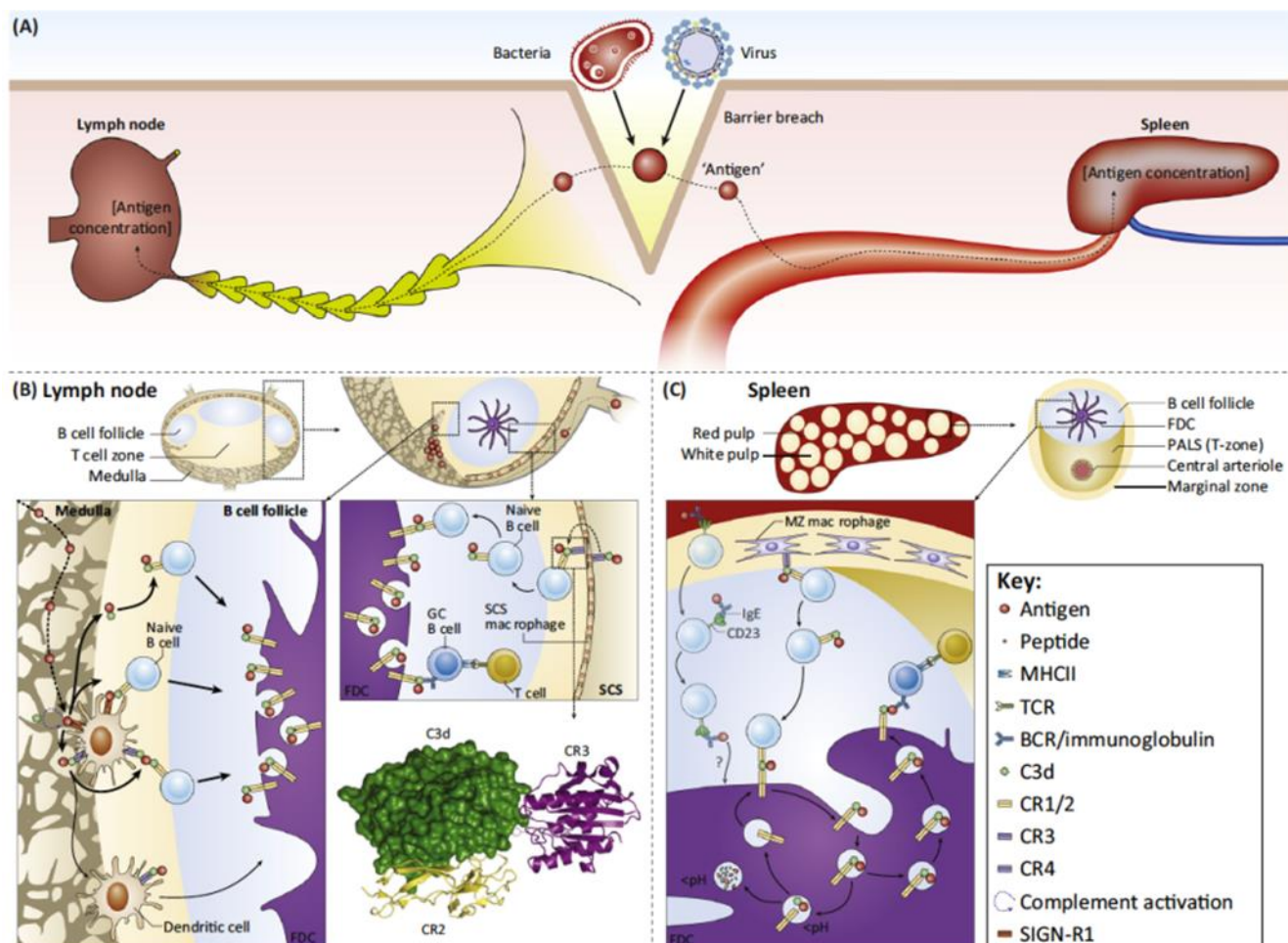


antígeno e o BCR, o linfócito B ativado via mecanismo dependente de LFA-1 e CCR7 migra para região de interação com o linfócito T auxiliar previamente ativado. Neste local, a célula B expressando o complexo peptídeo-MHC classe II e moléculas coestimuladoras interage com o linfócito T auxiliar ativado diferenciado em linfócito T<sub>FH</sub> (folicular), assim denominado por ser a principal célula T auxiliar presente nos folículos e tem papel fundamental na formação do centro germinativo, este linfócito expressa altos níveis de CXCR5 e ICOS. (CROTTY et al., 2011; SHULMAN et al., 2014). Desta interação celular, o sinal adicional para a ativação/diferenciação do linfócito B é fornecido pela ligação entre o CD40 expresso nessa célula e o ligante de CD40 (CD40L) expresso pelo linfócito T auxiliar. O CD40 é componente da superfamília do receptor de TNF, expresso constitutivamente nas células B. Quando CD40L expresso no linfócito T auxiliar previamente ativado pelos antígenos e costimuladores se liga ao CD40 expresso no linfócito B, induz a alteração conformacional dos trímeros de CD40 pré-formados, resultando no recrutamento de proteínas citosólicas denominadas fatores associados ao receptor de TNF (TRAF), que quando recrutados para CD40 iniciam cascatas de sinalização, sendo a maioria mediada por enzimas, conduzindo à ativação de fatores de transcrição, como o NFκB e AP-1, que, em conjunto, induzem a proliferação dos linfócitos B e consequente aumento da produção de imunoglobulinas. A ativação de fatores de transcrição induzidas pela sinalização da via CD40 é essencial para síntese de AID (desaminase induzida pela ativação) enzima responsável pela troca de isótipo e hipermutação somática (ARMITAGE et al., 1992; KAWABE et al., 1994; BIRAM et al., 2019; KARNELL, et al., 2019; LAI et al., 2019). Portanto, após à interação entre os linfócitos T e B, estas células B podem migrar para o GC (do inglês *Germinal Center*-GC) ou se diferenciar em plasmócitos extrafoliculares secretores de anticorpos de baixa afinidade. No GC estas células sofrem o processo de hipermutação somática e, em contato com os antígenos expressos pelas DCs foliculares (FDCs) sofrem o processo de maturação de afinidade, ou seja, podem morrer por apoptose ou se diferenciar em células secretoras de anticorpos de alta-afinidade ao antígeno ou células B de memória, estas capazes de proliferarem rapidamente e se diferenciarem em plasmócitos após reencontro com o antígeno cognato (NUTT et al., 2015; RADBRUCH et al., 2006; MACLENNAN, 1994; RAJEWSKY, 1996; ITANO e

JENKINS, 2003; HEESTERS et al., 2016; YUSEFF et al., 2013; KOMETANI E KUROSAKI, 2015) (**Figura 1**).

Trabalhos recentes sugerem ainda, que a presença de fatores ativadores de linfócitos B secretados pelas DCs como BAFF (*B-cell-activating fator*) e APRIL (*proliferation-inducing ligand*) podem prover o sinal necessário para a completa ativação dos linfócitos B (HAXHINASTO; BISHOP, 2004; SMULSKI E EIBEL, 2018). Por outro lado, a ativação de linfócitos B na ausência da sinalização via BCR ou contato com linfócitos T pode ocorrer por diversos mecanismos, podendo envolver diferentes receptores denominados PRRs (*Pattern-recognition receptors*). Dentre os PRRs encontra-se a classe mais bem caracterizada, composta por vários membros de TLRs (*Toll-like receptors*) (TAKEDA E AKIRA, 2005; IWASAKI E MEDZHITOV, 2004; BRYANT et al., 2009; GAY et al., 2014). Destacando-se o TLR4, primeiro membro da família a ser isolado e, associado a MD-2 (fator mielóide de diferenciação-2) e CD14, reconhece uma grande variedade de PAMPs, (*Pathogen-associated molecular pattern*) como o lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa de bactérias gram-negativas (SHIMAZU et al., 1999). Essa endotoxina além de ser um potente ativador da resposta imune inata pode promover ativação policlonal de linfócitos B e é facilmente reconhecida por esse receptor. A sinalização do TLR4 através de moléculas adaptadoras como a proteína de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e a proteína adaptadora contendo o domínio TIR indutora de interferon-beta (TRIF) promove a ativação do Fator Nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) (ANDREAKOS et al., 2004; KAWAI E AKIRA, 2010; SOUVANNAVONG et al., 2007; SAKAI et al., 2017). A família de proteínas da via NF- $\kappa$ B consiste em cinco subunidades: p65 (RelA), cRel, RelB, p50 (NF- $\kappa$ B) e p52 (NF- $\kappa$ B) que interagem para formar dímeros com funções regulatórias distintas de genes (GERONDAKIS et al., 2014; TROIB e AZAB, 2015). No estado basal, os dímeros do NF- $\kappa$ B estão unidos a proteínas inibitórias, I $\kappa$ B as quais o mantem no citoplasma (SALLES et al., 2014; LIU et al., 2017). O NF- $\kappa$ B regula a expressão gênica de imunoglobulinas em linfócitos B e promove o aumento da transcrição de várias citocinas pró-inflamatórias, dentre elas: TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$  e a IL-23 (TAN et al., 2007; KWILASZ et al., 2015). Também tem função essencial no desenvolvimento, ativação e proliferação de linfócitos B e T

(SAIJO et al., 2003; GERONDAKIS E SIEBENLIST, 2010; GERONDAKIS et al., 2014).



**Figura 1** – Padrões de drenagem de antígenos, transporte e anatomia de órgãos linfoides secundários. **(A)** Bactérias, vírus, fungos ou outros antígenos geralmente atravessam uma barreira. Esta drenagem pode ocorrer com ou sem o envolvimento de outras células imunes. Eles podem entrar na corrente sanguínea ou nos ductos coletores do sistema linfático. Os antígenos são transportados para o linfonodo. **(B)** Transporte de antígeno nos linfonodos. Células dendríticas foliculares (FDCs) encontradas nos folículos de células B. Antígenos são drenados sinus subcapsular (SSMS) ou medula. (esquema central) São opsonizados entram nos linfonodos por transporte passivo nos vasos linfáticos aferentes no sítio da injeção. O antígeno não se ligou ao receptor 3 do complemento (CR3, CD11b) macrófagos sinusais subcapsular (SSMs). As DCs e os macrófagos da medula ligam-se aos antígenos e alguns podem ativar o complemento. Entretanto são múltiplas vias possíveis: 1. Antígeno opsonizado pode ser liberado e ligar-se a células B através do CR2, o qual transporta o antígeno na FDC. 2. As DCs podem transferir o antígeno opsonizado pela célula B/CR2, a qual transportará o antígeno para FDC. 3. As DCs também podem transportar o antígeno opsonizado para a FDCs e transferi-lo para a FDCs via CR1/CR2. A FDC incorpora o antígeno dentro de um compartimento endossomal não degradativo. (esquema central, lado direito) SSMs liga-se ao antígeno opsonizado na SCS via CR3, o qual é expresso na sua superfície apical, sua carga é transferida da superfície vaso lateral da célula onde é entregue as células B CR2<sup>+</sup> naive. O painel acima apresenta a célula B transportando o complexo antígeno-imune para a FDC, o qual é internalizado via CR2 de maneira dependente de actina. O antígeno é transportado da vesícula, este ciclo ocorre periodicamente na superfície da FDC, onde é exposto a receptores das células B que saíram do centro germinativo. Quando as células B encontram as células T-

auxiliares são ativadas e diferenciadas em células B de memória ou células produtoras de anticorpos. O painel inferior mostra a posição de C3d na estrutura cristalina do CR2-C3d-CR3 complexo, iluminação diferentes locais de ligação em C3d. **(C)**. Transporte do antígeno no baço. Na anatomia do baço a polpa branca consiste a zona de células T, células B e uma zona marginal. FDCs são encontradas no centro dos folículos da células B e a arteríola central é encontrada no PALS. Na zona marginal os macrófagos ligam-se ao antígeno e as células B *naive*, transportam esse antígeno para a FDC, e também ocorre apresentação de antígeno nas células B cognadas. Assim como no linfonodo, a FDC degrada o antígeno e apresenta para as células B do centro germinal (Adaptado de Heesters, et al., Trends in Immunology, 2016).

Em vista do exposto e considerando o efeito modulador da CTX sobre vários parâmetros da resposta imune e ainda, que não está claro o mecanismo de ação desta molécula sobre a imunidade humoral é evidente a relevância de avaliar a ação da CTX sobre a ativação e diferenciação dos linfócitos B e consequente produção de anticorpos e assim, ampliar os conhecimentos sobre os mecanismos de ação de moléculas moduladoras do sistema imune.

## **8. CONCLUSÃO**

Em conjunto, os dados obtidos no presente estudo demonstram que a CTX exerce efeito direto sobre os linfócitos B modulando sua ativação, proliferação e consequente produção de anticorpos específicos. Estes resultados corroboram com estudos anteriores do nosso grupo mostrando o potencial imunomodulador abrangente da CTX e contribuem para melhor entendimento dos mecanismos de ação de moléculas imunomoduladoras, e futuramente para novas abordagens terapêuticas.

## REFERÊNCIAS

AHMAD-NEJAD, P.; HACKER, H.; RUTZ, M.; BAUER, S.; VABULAS, R. M.; WAGNER, H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. **Eur J Immunol**, v. 32, n. 7, p. 1958-1968, 2002.

AHN, S.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Role of B cells in common variable immune deficiency. **Expert review of clinical immunology**, v. 5, n. 5, p. 557-564, 2009.

AIRD, S. D.; KAISER, I. I.; LEWIS, R. V.; KRUGGEL, W. G. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 249, n. 2, p. 296-300, 1986.

ALLMAN, D.; PILLAI, S. Peripheral B cell subsets. **Current opinion in immunology**, v. 20, n.2, p. 149-157, 2008.

ALLMAN, D.; SRIVASTAVA, B.; LINDSLEY, R. C. Alternative routes to maturity: branch points and pathways for generating follicular and marginal zone B cells. **Immunological reviews**, v. 197, n. 1, p. 147-160, 2004.

ALEXANDER, G.; GRATHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; SCHWARTZMAN, R. J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, v. 26, n. 10, p. 953-960, 1988.

AMARAL, C F S.; MAGALHÃES, R. A.; REZENDE, N. A. Comprometimento respiratório secundário e acidente (*Crotalus durissus*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v33, n.4, p251-255, 1991.

AMORA, D.N., SOUSA, T.M., MARTINS, A.M., BARBOSA, P.S., MAGALHÃES, M.R., TOYAMA, M.H., FONTELES, M.C., DE MENEZES, D.B., MONTEIRO, H.S. Effects of *Crotalus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 260-264, 2006.

ARMITAGE, R. J.; FANSLAW, W. C.; STROCKBINE, L.; SATO, T. A., CLIFFORD, K. N.; MACDUFF, B. M.; CLARK, E. A. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. **Nature**, v. 357(6373), P.80-82, 1992.

ANDREAKOS, E. SACRE, M.; SMITH, C.; LUNDBERG, A., KIRIAKIDIS, S.; STONEHOUSE, T.; MONACO, C.; FELDMANN, M.; FOXWSELL, M. B. Distinct pathways of LPS-induced NF- $\kappa$ B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. **Blood**, v. 103, n. 6, p. 2229-2237, 2004.

ALEXANDER, G.; GROTHSEN, J.; ZEPEDA, H. E SCHWARTZMAN, R. J. Gyroxin, atoxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, v. 26, n.10, p. 953-960, 1988.

ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H. D. Interleukin-10 therapy—review of a new approach. **Pharmacological reviews**, v. 55, n. 2, p. 241-269, 2003.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; COIMBRA, T. M.; HERING, S. E.; ROSSI, M; A.; LAURE, C. J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, v. 23, p. 631-636, 1985.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Evidence that *Crotalus durissus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. **Toxicon**, v. 25, n. 11, p. 1163- 1168, 1987.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. ACIDENTE CROTÁLICO. IN: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; 118 HADDA, J. R.; V. (Ed). Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier / Fapesp, 2003, p. 91- 104.

BAESSLER, A.; HALE, J. Recurrent Tonsillitis Tfh Cells Acquire a Killer Identity. **Trends in Immunology**, 2019.

BANCHEREAU, J.; ROUSSET, F. Human B lymphocytes: phenotype, proliferation, and differentiation. In Advances in immunology. **Academic Press**. V. 52, p. 125-262, 1992.

BARRIO, A. Giroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta. Physiol. Lat. Am.**, v. 11, p. 224- 230, 1961.

BASAVARAJAPPA, S. C.; RAMAKRISHNAN, P. Regulation of B-cell function by NF-kappaB c-Rel in health and disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1-16, 2020.

BERCOVICI, D.; CHUDZINSKI, A. M.; DIAS, W. O.; ESTEVES, M. I.; HIRAICHI, E.; OISHI, N. Y.; PICARELLI, Z. P.; ROCHA, M. C.; UEDA, C. M. P. M.; YAMANOUYE, N.; RAW, I. A systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mem. Inst. Butantan**, v. 49, n. 3, p. 69- 78, 1987.

BIRAM, A., DAVIDZON; N.; SHULMAN, Z. T cell interactions with B cells during germinal center formation, a three-step model. **Immunological reviews**, v. 288, n. 1, p. 37-48, 2019.

BOUAZIZ, J. D.; CALBO, S.; MAHO-VAILLANT, M.; SAUSSINE, A.; BAGOT, M.; BENSUSSAN, A.; MUSETTE, P. 10 produced by activated human B cells regulates CD4+ T-cell activation in vitro. **European journal of immunology**, v. 40, n. 10, p. 2686-2691, 2010.

BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem.** v. 7, n. 72, p.248-254, 1976.

BREITFELD, D.; OHL, L.; KREMMER, E.; ELLWART, J.; SALLUSTO, F.; LIPP, M.; FORSTER, R. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 11, p. 1545-1552, 2000.

BREITHAUPT, H. Enzymatic characteristics of *Crotalus* phospholipase A2 and the crotoxin complex. **Toxicon**, v. 14, p. 221-233, 1976.

BRYANT, C. E., SPRING, D. R., GANGLOFF, M. & GAY, N. J. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. **Nat. Rev. Microbiol.** v.8, p. 8–14, 2009.

CALVETE, J. J.; CID, P. DE LA TORRE, P.; FLORES-DIAZ, M.; DOS SANTOS, M. C, et al. Snake venomomics of the central american rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 528–544, 2010.

CARDOSO, DF; MOTA, I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. **Toxicon**, v. 35, n. 4, p. 607-612, 1997.

CASTRO, F. R.; FARIAS, A. S.; PROENÇA, P.; DE LA HOZ, C.; LANGONE, F.; OLIVEIRA, E. C.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; SANTOS, L. M. The effects of treatment with crotopotin on the evolution of experimental autoimmune neuritis induced in Lewis rats. **Toxicon**, v. 49, n. 3, p. 299-305, 2007.

CARDOSO, D. F.; RANGEL-SANTOS, A.; DOS-SANTOS. E. C.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C.; MOTA, I. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon**, v. 43 p. 801-10.2003.

CARDOSO, J. L. C. et al. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 6, p. 338-338, 2003.

CARTER, R. H.; MYERS, Riley. Germinal center structure and function: lessons from CD19. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2008. p. 43-48.

CERUTTI, A.; COLS, M., PUGA, I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 2, p. 118-132, 2013.

CHANG, C.; SU, M. J.; A study of the interaction of crotopotin with crotoxin phospholipase A2, notexin and other presynaptic neurotoxins. **Br. J. Pharmacol.**, v. 73, n. 2, p. 495- 503, 1981.



CHEN Y.; VALLEE, S, WU, J.; VU, D.; Sondek J, Ghosh G. Inhibition of NF-kappaB activity by IkkappaBbeta in association with kappaB-Ras. **Mol Cell Biol.** 24(7):3048-3056, 2004

CHIPPAUX, J. P. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. **Biologie aujourd'hui**, v. 204, n. 1, p. 87-91, 2010.

CHOUMET, V.; LAFAYE, P.; MAZIE', J.C.; BON, C. A monoclonal antibody directed against the non-toxic subunit of a dimeric phospholipase A2 neurotoxin, crotoxin, neutralizes its toxicity. **Biol. Chem.**, v. 379, n. 7, p. 899-906, 1998.

CHUNG, J. B. et al. CD23 defines two distinct subsets of immature B cells which differ in their responses to T cell help signals. **International immunology**, v. 14, n. 2, p. 157-166, 2002.

CLARK, M. R.; MANDAL, M.; OCHIAI, K.; SING, H. Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. **Nature reviews Immunology**, v. 14, n. 2, p. 69-80, 2014.

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. ISSN 1879-3150.

COUTINHO, A.; MÖLLER, G. Immune Activation of B Cells: Evidence for 'One Nonspecific Triggering Signal'Not Delivered by the Ig Receptors. **Scandinavian journal of immunology**, v. 3, n. 2, p. 133-146, 1974.

CROTTY, S. Follicular helper CD4 T cells (Tfh). **Annual review of immunology**, n. 29, p. 621-663, 2011.

CRUZ, L; S. et al. Snakebite envenomation and death in the developing world. **Ethnicity & disease**, v. 19, n. 1, p. 42, 2009.

DAIEN, C.; GAILHAC, S.; MURA, T.; AUDO, R.; COMBE, B.; HAHNE, M. Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease activity. **Arthritis Rheumatol.** V. 66, n. 8, p. 2037-2046, 2014.

DA GRAÇA SALOMÃO, M.; DE OLIVEIRA LUNA, K. P.; MACHADO, C. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos e a distribuição de soros: estado de arte e a situação mundial. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, p. 523-529, 2018.

DAI, Y. C.; ZHONG, J.; XU, J. F. Regulatory B cells in infectious disease (Review). **Mol. Med. reports**, v. 16, n. 1, p. 3-10, 2017.

DE ARAÚJO PIMENTA, L.; DE ALMEIDA, M.; BRETONES, M. L.; CIRILLO, M. C.; CURI, R.; SAMPAIO, S. C. Crotoxin promotes macrophage reprogramming

towards an antiangiogenic phenotype. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.

DERRUDER, E.; CADERA, E. J.; VAHL, J. C.; WANG, J.; FOX, C. J.; ZHA, S.; RAJEWSKY, K. Development of immunoglobulin  $\lambda$ -chain–positive B cells, but not editing of immunoglobulin  $\kappa$ -chain, depends on NF- $\kappa$ B signals. **Nature immunology**, v. 10, n. 6, p. 647, 2009.

DE SOUZA ALMEIDA, Caroline et al. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* is able to down-modulate the acute intestinal inflammation in mice. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0121427, 2015.

DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein Complexes in Snake Venom. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 66, n. 17, p. 2851- 2871, 2009.

BROWNE, E. P. Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors. **Immunology**, v. 136, n. 4, p. 370–379, 2012.

EBERT, Lisa M. et al. B cells alter the phenotype and function of follicular-homing CXCR5+ T cells. **European journal of immunology**, v. 34, n. 12, p. 3562-3571, 2004.

FAIRFAX, K. A. et al. Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2008. p. 49-58.

FAVORETTO, B.; RICARDI, R.; SILVA, S.; JACYSYN, J.; FERNANDES, I.; TAKEHARA, H.; FAQUIM-MAURO, E. Immunomodulatoru effects of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice immunised with human serum albumin. **Toxicon**, V 57, P. 600-607, 2011.

FAURE, G., BON, C. Crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. **Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 730- 738, 1988.

FAURE, G.; BON, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 25, p. 229–234, 1987.

FAURE, G.; BON, C. Crotoxin, a Phospholipase A2 Neurotoxin from the South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: Purification of Several Isoforms and Comparison of Their Molecular Structure and of Their Biological Activities. **Biochemistry**, v. 27, p. 730–738, 1988.

FAURE, G.; CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; CAMOIN, L.; GUILLAUME, J. L.; MONEGIER, B.; VUILHORGNE, M.; BOM, C. The origin f the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Eur. J. Biochem.** V. 223, p. 161-164.

FAURE, G; SAUL, F. Crystallographic characterization of functional sites of crotoxin and ammodytoxin, potente  $\beta$ -neurotoxins from Viperidae venom. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 531-538, 2012.

FEITOSA, R. F. G.; MELO.; I. M. L. A.; MONTEIRO, H. S. A. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no estado do Ceará-Brasil. Ver. Soc. Bras. Med. Trop., v. 30, n. 4, p. 295-301, 1997.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Ass. Méd. Bras.**, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

FRAENKEL-CONRAT, R.; HENDON, A. Biological roles of two componentes of crotoxina. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, V.68, P. 1560-1563, 1971.

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

GARCIA, F. et al. Crotopotin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE2 synthesis. **Toxicon**, v. 42, n. 4, p. 433-7, 2003.

GAY, N. J.; SYMMONS, M. F.; GANGLOFF, M.; & BRYANT, C. E. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 8, p. 546-558, 2014.

GELBRIM, L. C.; MARCUSSI, S.; MENALDO, D. L.; DE MENEZES, C. S.; NOMIZO, A.; HAMAGUCHU, A.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and synthetic peptide derived from its C-terminal region. **Biologicals**, v. 37, n. 4, p. 222-229, 2009.

GERONDAKIS, S.; SIEBENLIST, U. Roles of the NF- $\kappa$ B pathway in lymphocyte development and function. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 5, p. a000182, 2010.

GERONDAKIS, S.; FULFORD, T. S.; MESSINA, N.; GRUMONT, R. J. NF-kappaB control of T cell development. **Nat Immunol**, v. 15, n. 1, p. 15-25, 2014.

GUTIÉRREZ, J. et al. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: a journey of discovery and understanding. **Toxins**, v. 8, n. 4, p. 93, 2016.

HARA, H.; IZASA, E.; NAKAYA, M.; YOSHIDA. L-CBM signaling in lymphocyte development and function. **Journal of blood medicine**, v. 1, 93, 2010.

HARDY, R. R.; HAYAKAWA, K. B cell development pathways. **Annual review of immunology**, v. 19, n. 1, p. 595-621, 2001.

HARMS PRITCHARD, G.; PEPPER, M. Memory B cell heterogeneity: remembrance of things past. **Journal of leukocyte biology**, v. 103, n. 2, p. 269-274, 2018.

HARRIS, L. K.; FRANSON, R. C. [1-14C] oleate- labeled autoclaved yeast: a membranous substrate for measuring phospholipase A2 activity in vitro. **Anal. Biochem**, v. 193, n. 2, p. 191- 196, 1991.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF family cytokines. In: *Seminars in immunology*. **Academic Press**, 2014. p. 253-266.

HEESTERS, B. A.; CHATTERJEE, P.; KIM, Y. A.; GONZALEZ, S. F.; KULIGOWSKI, M. P.; KIRCHHAUSEN, T.; CARROLL, M. C. Endocytosis and recycling of immune complexes by follicular dendritic cells enhances B cell antigen binding and activation. **Immunity**, v. 38, n. 6, p. 1164-1175, 2013.

HERNANDEZ CRUZ, S.; GARCIA-JIMENEZ, R.; ZUCATELLI MENDONÇA.; PETRICEVICH. Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Release in Mice Injected with *Crotalus durissus terrificus* Venom. **Mediators Inflamm.**, 2008.

HOCHRAINER, K.; RACCHUIMI, G.; ANRATHER, J. Site-specific phosphorylation of the p65 protein subunit mediates selective gene expression by differential NF- $\kappa$ B and RNA polymerase II promoter recruitment. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 1, p. 285–293, 2013.

JEFFERIS, R; LUND, J. Interaction sites on human IgG-Fc for Fc $\gamma$ R: current models. **Immunology letters**, v. 82, n. 1-2, p. 57-65, 2002.

JEFFERIS, Royston. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. **Biotechnology progress**, v. 21, n. 1, p. 11-16, 2005.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel Sul-Americana (*Crotalus durissus*) **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v34, n.4, p.354-374, 1992.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nature immunology**, v. 5, n. 10, p. 987, 2004.

IWATA, Y.; MATSUSHITA, T., HORIKAWA, M.; DILILLO, D. J.; YANABA, K.; VENTURI, G. M.; SZABOLCS, P. M.; BERNSTEIN, H.; MAGRO, C. M.; WILLIAMS, A. D., HALL, R. P. S. T. CLAIR, E. W.; TEDDER, T. F. Characterization of a rare IL-10–competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 117, n. 2, p. 530-541, 2011.

KALAMPOKIS, I.; YOSHIZAKI, A.; TEDDER, T. F. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. **Arthritis research & therapy**, v. 15, n. 1, p. S1, 2013.

KALLIES, A.; HASBOLD, J; TARLINTON, D. M.; DIETRICH W.; CORCORAN, L. M.; HODGKIN, P. D.; NUTT, S. L. Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 8, p. 967-977, 2004.

KARNELL, J. L.; RIEDER, S. A.; ETTINGER, R.; KOLBECK, R. Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond. **Advanced drug delivery reviews**, n. 141, p. 92-103, 2019.

KAWABE, T., NAKA, T. YOSHIDA, K., TANAKA, T., FUJIWARA, H., SUEMATSU, S.; KIKUTANI, H. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. **Immunity**, v. 1, n. 3, p. 167-178, 1994.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature immunology**, v. 11, n.5, p. 373, 2010.

KRAUS, M.; ALIMZHANOV, M. B.; RAJEWSKY, N.; RAJEWSKY, K. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Ig $\alpha$ / $\beta$  heterodimer. **Cell**, v. 117(6), p. 787-800, 2004.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. **Toxicon**, v. 27, n. 6, p. 613- 635, 1989.

KOMETANI, K.; KUROSAKI, T. Differentiation and maintenance of long-lived plasma cells. **Current opinion in immunology**, v, 33, p. 64-69, 2018.

KRIEG, A. M. YI, A .K.; MATSON, S.; WALDSCHMIDT, T. J.; BISHOP, G. A.; TEASDALE, R.; KORETZKY, G.A. KLINMAN, D. M. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. **Nature**, v. 374, n. 6522, p. 546, 1995.

KUROSAKI, T.; SHINOHARA, H.; BABA, Y. B cell signaling and fate decision. **Annual review of immunology**, v. 28, p. 21-55, 2009.

KUROSAKI, T. B-lymphocyte biology. **Immunological reviews**, v. 237, n. 1, p. 5-9, 2010.

KWILASZ, A. J.; GRACE, P. M.; SERBEDZIJA, P.; MAIER, S. F. WATKINS, L. R. The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. **Neuropharmacology**, n. 96, p. 55-69, 2015.

LAI, J. H.; LUO, S. F.; HO, L. J. Targeting the CD40-CD154 signaling pathway for treatment of autoimmune arthritis. **Cells**, v. 8. n. 8, p. 927, 2019.

LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M. Receptors for a growing Family of secreted phospholipases A2. **Trends Pharmacol. Sci** 20, 162-170, 1999.

LAMBEAU, G.; ANCIAN, P.; BARHANIN, J.; LAZDUNSKI, M. Cloning and expression. Of menbrane receptor for secretory phospholipase A2. **J. Biol. Chem.** 269, p. 1575-1578, 1994.

LEBIEN, T. W.; TEDDER, T. F. B lymphocytes: how they develop and function. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1570-1580, 2008.

LI, Z. W.; OMORI, S. A.; LABUDA, T.; KARIN, M.; RICKERT, R. C. IKK $\beta$  is required for peripheral B cell survival and proliferation. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 9, p. 4630-4637, 2003.

LIN, M.; LIN J.; WANG.; Y, BONHEYR, N.; KAWAI, T.; WANG, Z., HAN, X. Lipopolysaccharide Attenuates CD40 Ligand-Induced Regulatory B10 Cell Expansion and IL-10 Production in Mouse Splenocytes. **Open J Immunol.** v. 5, n.1, p. 1-8, 2015.

LIU, T.; ZHANG, L.; JOO, D.; SUN, S. C. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 2, n.1, p. 1-9, 2017.

MAGALHÃES, R. A.; RIBEIRO, M. M. F.; REZENDE, N. A.; AMARAL, C. F. S. Rabdomiólise secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*) **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v28, n.4, p228-233, 1986.

MAURI, C.; BOSMA, A. Immune regulatory function of B cells. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 221-241, 2012.

MAURI, Claudia. Regulation of immunity and autoimmunity by B cells. **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 6, p. 761-767, 2010.

MEFFRE, E.; CASELLAS, R.; NUSSENZWEIG, M. C. Antibody regulation of B cell development. **Nature immunology**, v. 1, n. 5, p. 379-385, 2000.

MELCHERS, Fritz. Checkpoints that control B cell development. **The Journal of clinical investigation**, v. 125, n. 6, p. 2203-2210, 2015.

MELO, P.A., BURNS, C.F., BLANKEMEYER, J.T., OWNBY, C.L. Membrane depolarization is the initial action of crotoxin on isolated murine skeletal muscle. **Toxicon**, v. 43, n.2, p.111- 119, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Acidentes Ofídicos. Brasília, 2007. Disponível em: <[http://www.saude.rs.gov.br/upload/1402342405\\_Guia%20de%20vigil%C3%A2ncia%20epidemiologica\\_7ed\\_anipe%C3%A7\\_.pdf](http://www.saude.rs.gov.br/upload/1402342405_Guia%20de%20vigil%C3%A2ncia%20epidemiologica_7ed_anipe%C3%A7_.pdf)>

MONTECUCCO, C.; GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: commom aspects of their mechanisms of action. **Cell. Moll Life Sci.**, v. 65, n. 18, p. 2897- 2912, 2008.

MOURA- GONÇALVES, J.; VIEIRA, L. G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. **Acad. Bras. Ciênc.**, v. 22, p. 141-146, 1950.

NOMURA, J.; INUI, S.; YAMASAKI, T.; KATAOKA, S.; MAEDA, K.; NAKANISHI, K.; SAKAGUCHI, N. Anti-CD40 monoclonal antibody induces the proliferation of murine B cells as a B-cell mitogen through a distinct pathway from receptors for antigens or lipopolysaccharide. **Immunology letters**, v. 45, n. 3, p. 195-203, 1995.

NUNES, F. P. B. **Caracterização do efeito anti-inflamatório da crotoxina sobre a migração celular pela carragenina**. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Geral) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

NUTT, S. L.; HODGKIN, P. D.; TARLINTON, D. M.; CORCORAN, L. M. The generation of antibody-secreting plasma cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 3, p. 160, 2015.

PARRA, A. C. et al. ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS DURANTE A IMUNIZAÇÃO E APÓS A SANGRIA E PLASMAFERESE EM EQUINOS DE PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE ANTICROTÁLICO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1225-1230, 2009.

PEREAÑEZ, J. A.; GOMEZ, I. D.; PATIÑO, A. C. Relationship between the structure and the enzymatic activity of crotoxin complex and its phospholipase A2 subunit: An in silico approach. **J Mol Graph Model.**, n. 35, p. 36- 42, 2012.

PETKAU, G.; TURNER, M. Signalling circuits that direct early B-cell development. **Biochemical Journal**, v. 476, n. 5, p. 769-778, 2019.

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

RADBRUCH, A.; MUEHLINGHAUS, G.; LUGER E. O.; INAMINE, A.; SMITH, K. G.; DORNER, T.; HIEPE, F. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 741-750, 2006.

RADVANYI, F.; SALIOU, B.; LAMBEZAT, M. P.; BON, C. Binding of crotoxin , a presynaptic phospholipase A2 neurotoxin to negatively charged phospholipid vesicles. **J. Neurochem**, v. 53, n. 4, p. 1252- 1260, 1989

RANGEL-SANTOS, A., LIMA, C., LOPES-FERREIRA, M., CARDOSO, D. F. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, 44. 609-616, 2004.

RAW, I. Developing Countries Can Innovate and Produce Vaccines: The Case of Butantan in Brazil. In: **Vaccines**. IntechOpen, 2019.

RIBEIRO LA, ALBUQUERQUE MJ, DE CAMPOS VA, KATZ G, TAKAOKA NY, LEBRAO ML & JORGE MT. Deaths caused by venomous snakes in the State of São Paulo: evaluation of 43 cases from 1988 to 1993. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 44: 312-318, 1998.

RETH, Michael. Antigen receptors on B lymphocytes. **Annual review of immunology**, v. 10, n. 1, p. 97-121, 1992.

RIZZO, M. T.; NGUYEN, E.; ALDO-BENSON, M.; LAMBEAU, G. Secreted phospholipase A(2) induces vascular endothelial cell migration. **Blood**, v. 96, p.3809-3815, 2000.

RONET, C.; HAUYON-LA TORRE, T. Y.; REVAZ-BRETON, M.; MASTELIC, B.; TACCHINI-COTTIER, F.; LOUIS, J. LAUNOIS, P. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. **J Immunol**. v. 184, n. 2, p. 886-894, 2010.

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

ROSSER, Elizabeth C.; MAURI, Claudia. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. **Immunity**, v. 42, n. 4, p. 607-612, 2015.

RUDD, C. J. et. Al. in vitro comparison of cytotoxic effects of crotoxin against three human, tumors and a normal human epidermal keratinocyte cell line. **Invest New Drugs**, v. 12, n.3 3, p. 183-4, 1994.

SAIJO, K.; SCHMEDT, C.; SU, I. H.; KARASUYAMA, H.; LOWEL, C. A.; RETH, M.; TARAKHOYSHY, A. Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF- $\kappa$ B activation during B cell development. **Nature immunology**, v. 4, n. 3, p. 274-279, 2003.

SAKAI, J., et al. Lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B nuclear translocation is primarily dependent on MyD88, but TNF $\alpha$  expression requires TRIF and MyD88. **Scientific reports**, v. , n. 1, p. 1-9, 2017.

SALLES, A.; ROMANO, A.; FREUDENTHAL, R. Synaptic NF-kappa B pathway in neuronal plasticity and memory. **J Physiol Paris**, 2014.

SALVINI, T. F.; AMARAL, A. C.; MIYABARA, E. H.; TURRI, J. A.; DANIELLA, P. M.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. **Toxicon**, v. 39, n. 8, p. 1141- 1149, 2001.

SAMITAS, K.; LOTVALL, J.; BOSSIOS, A.B Cells: From early development to regulating allergic diseases. **Arch. Immunol Ther. Exp**, n. 58, p169-181, 2010.

SAMPAIO, S. C.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; BRIGATTE, P.; LANDGRAF, R.G.; DOS SANTOS, E. C.; CURI, R.; CURY, Y. Lipoxygenase-derived eicosanoids



are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. **Toxicon**. v. 47, n. 3, p. 313-321, 2006.

SAMPAIO, S. C.; BRIGATTE, P.; SOUSA-E-SILVA, M. C.; DOS-SANTOS, E. C., RANGEL-SANTOS, A. C., CURI, R.; CURY, Y. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. **Toxicon**. v. 41, n. 7, p. 899-907, 2003.

SAMPAIO, S. C.; HYSLOP, S.; FONTES, M. R.; PRADO-FRANCESCHI, J., ZAMBELLI, V. O.; MAGRO, A. J.; BRIGATTE, P.; GUTIERREZ, V. P.; CURY, Y. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon**. v. 55, p. 1045-1060, 2010.

SANO- MARTINS, I. S.; TOMY, S. C.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B.; CASTRO, S. C. B.; SOLSA E SILVA, M. C. C.; AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; KAMIGUTI, A. S.; WARREL, D. A.; THEAKSTON, R. D. G. Coagulopathy following lethal and nonlethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. **Q. J Med**, v. 94, n. 10, p. 551- 559, 2001.

SANTORO, M. L.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; CARDOSO, D. F.; SAIKI, M. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1998.

SANTORO, M. L.; SILVA, M. C. SOUSA. E.; GONÇALVES, L. R. C.; SANTOS, S. M. A.; FERREIRA, I. L. L.; SAIKI, M.; PERES, C. A.; SANO-MARTINS, I. S. Comparison of the biological activities or three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus cascavella*, *Crotalus durissus collilineatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology**, v. 122, n. C, p. 61-73, 1999.

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

SASAKI, Y.; IWAI, K. Roles of the NF- $\kappa$ B pathway in B-lymphocyte biology. In: *B Cell Receptor Signaling*. **Springer**,. p. 177-209, 2015.

SCHAERLI, P. et al. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 11, p. 1553-1562, 2000.

SHULMAN, Z., GITLIN, A. D., WEINSTEIN, J. S.; LAINEZ, B.; ESPLUGUES, E., FLAVELL, R. A.; NUSSENZWEI, M. C. Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. **Science**, 345(6200), p. 1058-1062, 2014.

SMULSKI, C. R.; EIBEL, H. BAFF and BAFF-receptor in B cell selection and survival. *Frontiers in immunology*, 9: 2285, 2018.

SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. **Memórias Instituto Butantan**, v12, p. 505-512, 1938.

SOUSA- E- SILVA, M. C. C.; GONÇALVES, L. R. C.; MARIANO, M. The venom of South American rattlesnakes inhibits macrophage functions and is endowed with anti- inflammatory properties. **Mediators Inflamm.**, v. 5, n. 1, p. 18- 23, 1996.

SOUVANNAVONG, V.; SAIDJI, N.; CHABY, R. Lipopolysaccharide from *Salmonella enterica* activates NF- $\kappa$ B through both classical and alternative pathways in primary B lymphocytes. **Infection and immunity**, v. 75, n. 10, p. 4998-5003, 2007.

STANIC, Barbara et al. IL-10–overexpressing B cells regulate innate and adaptive immune responses. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 3, p. 771-780. Ed.8, 2015.

SUDOWE, S.; ARPS, V.; VOGEL, T.; KOLSCH, E. **Scand J Immunol.** v. 51, n. 5, p. 461-71. 2000.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual review of immunology**, v. 21, n. 1, p. 335-376, 2003.

TROIB, A., AZAB, A.N. Effects of psychotropic drugs on Nuclear Factor kappa B. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.** n.. 19, p. 1198–1208, 2015.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A.; HAJJAR, A.M.; STEVENS, A.; WILSON, C.B.; BASSETTI, M.; ADEREM, A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. **Nature**, v. 401, n. 6755, p. 811- 815, 1999.

VARGAFTIG, B. B.; JOSEPH, D.; WAL, F.; MARLAS, G.; CHINARD, M.; CHEVACEN, I. G. Convulxin induced activation of intact and of thrombin degranulated rabbit platelets: specific crossed desensitization with collagen. **Eur. J Pharmacol.**, v. 92, n. 1- 2, p. 57- 68, 1983.

VERMEULEN, L.; DE WILDE, G.; NOTEBAERT, S.; BERGHE, W. V.; HAEGEMAN, G. Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor- $\kappa$ B p65 subunit. **Biochemical pharmacology**, v. 64(5-6), p. 963-970, 2002.

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

YANABA K, BOUAZIZ J, D.; HAAS K, M.; POE J, C.; FUJIMOTO M.; TEDDER T, F. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls

T cell-dependent inflammatory responses. **Immunity**, v. 28, n. 5, p. 639-650, 2008.

YANABA, Koichi et al. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 12, p. 7459-7472, 2009.

YANG, Min et al. Regulatory B cells in autoimmune diseases. **Cellular & molecular immunology**, v. 10, n. 2, p. 122-132, 2013.

YOSHIZAKI, Ayumi et al. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. **Nature**, v. 491, n. 7423, p. 264-268, 2012.

YUSEFF, M. I., PIEROBON, P., REVERSAT, A., LENNON-DUMÉNIL, A. M. How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 7, p. 475-486, 2013.

ZAMBELLI, V.O., SAMPAIO, S.C., SUDO-HAYASHI, L.S., GRECO, K., BRITTO, L.R., ALVES, A.S., ZYCHAR, B.C., GONCALVES, L.R.C., SPADACCI-MORENA, D.D., OTTON, R., DELLA-CASA, M.S., CURI, R., CURY, Y. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: involvement of adhesion molecules and lipoxygenase derived mediators. **Toxicon**, v. 51, n.8, p. 1357- 1367, 2008.

ZHANG, M.; SRIVASTAVA, G.; LU, L.. The pre-B cell receptor and its function during B cell development. **Cell Mol Immunol**, v. 1.n. 2, p. 89-94, 2004.

ZHANG, Y.; HE, X.; YU, F.; XIANG, Z.; LI, J.; THORPE, K. L.; YU, Z. Characteristic and functional analysis of toll-like receptors (TLRs) in the lophotrocozoan, *Crassostrea gigas*, reveals ancient origin of TLR-mediated innate immunity. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e76464, 2013.

WARNATZ, K.; SCHLESIER, M. Flow cytometry phenotyping of common variable immunodeficiency. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 74, n. 5, p. 261-271, 2008.

HUI WEN, F.; MONTEIRO, W. M.; MOURA DA SILVA, A. M.; TAMBOURGI, D. V.; MENDONÇA DA SILVA, I.; SAMPAIO, V. S.; DOS SANTOS, M. C.; SACHETT, J.; FERREIRA, L. C.; KALIL, J.; LACERDA, M. Snakebites and scorpion stings in the Brazilian Amazon: identifying research priorities for a largely neglected problem. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 5, p. e0003701, 2015.

WORTIS, H. H., TEUTSCH, M., HIGER, M., ZHENG, J., & PARKER, D. C. B-cell activation by crosslinking of surface IgM or ligation of CD40 involves alternative signal pathways and results in different B-cell phenotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 8, p. 3348-3352, 1995.