

FABIANO ROBERTO DE CASTRO

**EFEITO DA CROTAPOTINA NA EVOLUÇÃO CLÍNICA DA
NEURITE EXPERIMENTAL AUTO-IMUNE**

CAMPINAS

2006

FABIANO ROBERTO DE CASTRO

**EFEITO DA CROTAPOTINA NA EVOLUÇÃO CLÍNICA DA
NEURITE EXPERIMENTAL AUTOIMUNE (EAN)**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do título de Mestre em
Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas.*

ORIENTADORA : PROFA. DRA. LEONILDA M. B. SANTOS

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C279e Castro, Fabiano Roberto de
Efeito da crotapotina na evolução clínica da neurite experimental auto-imune / Fabiano Roberto de Castro. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Leonilda Maria Barbosa dos Santos
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Crotalus. 2. Neurite. 3. Síndrome de Guillain-Barré. 4. Doenças Auto-imunes. 5. Crotoxina. 6. Doenças do Sistema Nervoso Periférico. I. Santos, Leonilda Maria Barbosa dos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Effect of crotapotin on clinical evolution of Experimental Autoimmune Neuritis

Keywords: • Crotalus

- Neuritis
- Guillain-Barre Syndrome
- Autoimmune Diseases
- Crotoxin
- Peripheral Nervous System Diseases

Área de concentração : Ciências Básicas

Titulação: Mestrado em Clínica Médica

Banca examinadora: Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Prof Dr Fábio Trindade Maranhão Costa

Profa. Dra. Elaine Conceição de Oliveira

Data da defesa: 21-03-2006

Banca Examinadora da Defesa de tese de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Leonilda M. Barbosa dos Santos

Membros:

1. Prof. Dr. Fábio Trindade Maranhão Costa
 2. Prof^ª. Dr^ª. Elaine Conceição de Oliveira
 3. Prof^ª. Dr^ª. Dagmar Stach Machado
 4. Prof^ª. Dr^ª. Iracilda Zeppone Carlos
-

**Curso de Pós -Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 21/03/2006

Trabalho realizado com o apoio recebido da
FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE
SÃO PAULO - FAPESP

À **Deus** por me dar a honra de desvendar um pequenino pedaço de sua criação.

Aos meus Pais **Francisco** e **Rosinha**, os maiores exemplos de garra e perseverança que tive na vida, sempre me dando amor e apoio em tudo. À eles dedico essa tese e todas as minhas conquistas.

À minha madrinha **Brígida**, e ao meu padrinho **José Antônio**, in memoriam, sempre presentes em minha vida..

Ao meu avô **Alvino**, in memoriam, tenho certeza de que ele ficaria muito feliz por essa realização.

Aos meus amigos **Alessandro**, **Java** e **Bruno** pelo incentivo, apoio e por todas as alegrias que vivemos juntos nesses últimos anos.

À **Júlia**, por estar ao meu lado sempre, por ser acima de tudo minha grande amiga e incentivadora, e à sua família linda, por todo o carinho recebido.

À minha orientadora **Prof^a Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos**, pela liberdade que tive nesses anos de trabalho em seu laboratório, pela sua disponibilidade, apoio e incentivo. Pela pessoa amável e amiga que é, além de profissional impecável. Foi um grande prazer ser orientado por tão maravilhosa pessoa.

Ao **Prof^o Dr^o Francesco Langone**, que co-orientou esta tese, colocando seu laboratório à minha inteira disposição, e à sua aluna **Cristiane**, que me ajudou muito nessa realização. Aos meus colegas de trabalho do laboratório de neuroimunologia, **Elaine**, **Patrícia**, **Gislaine**, **Camila** e **Pedro** por toda a ajuda recebida.

Ao **Prof^o Dr^o Sérgio Marangoni** e ao **Prof^o Dr^o Marcos Toyama** do Laboratório de Química de Proteínas da UNICAMP (LAQUIP), por purificar e fornecer a fração do veneno.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, especialmente à **Lúcia, Welson, José Raimundo, Dirce e Marcos**.

E por fim, à todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que essa tese fosse realizada, meus agradecimentos.

A aventura da vida é aprender

A natureza da vida é mudar

O objetivo da vida é crescer

O segredo da vida é ousar

O desafio da vida é superar

A alegria da vida é amar

Willian Arthur

	PÁG.
RESUMO	<i>x</i>
ABSTRACT	<i>xii</i>
INTRODUÇÃO	14
OBJETIVOS	23
MATERIAIS E MÉTODOS	25
RESULTADOS	30
DISCUSSÃO	44
CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXO	58
Effect of treatment with crotopotin on clinical evolution of Experimental Autoimmune Neuritis.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula Apresentadora de Antígeno
Ca	Crotapotina
CB	Componente Básico
Cdt	Crótalus durissus terrificus
CTX	Crotoxina
EAE	Encefalomielite Experimental Auto-imune
EAN	Neurite Experimental Auto-imune
IP	Intraperitoneal
MHC	Complexo Principal de Hitocompatibilidade
NK	Natural Killer
OLP	Órgão Linfóide Primário
OLS	Órgão Linfóide Secundário
PBS	Tampão Salino Fosfato
PDPC	Polineuropatia Desmielinizante Periférica Crônica
PLA2	Fosfolipase A2
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SNP	Sistema Nervoso Periférico

RESUMO



A Síndrome de Guillain-Barré (SGB) é uma doença desmielinizante do sistema nervoso periférico (SNP). Baseado principalmente nas similaridades clínicas e histopatológicas a Neurite Experimental Auto-imune (EAN) tem sido extensivamente usada como modelo de estudo da SGB. A EAN é uma doença auto-imune, que pode ser experimentalmente induzida em ratos geneticamente suscetíveis através da imunização com os componentes da mielina de nervos periféricos tais como os peptídeos P0 e P2, ou ainda por transferência adotiva de linfócitos T CD4⁺ do tipo Th1.

Diferentes tentativas de tratamentos para a SGB têm sido estudadas, dentre elas pode-se citar a plasmaferese, o uso de anticorpos monoclonais, administração de corticóides e a imunossupressão global através da administração de interferon β .

A utilização de venenos totais de serpentes, ou frações deles, já demonstrou bons resultados na tentativa de tratamento de alguns modelos de doenças auto-imunes como a diabetes auto-imune insulino dependente, lúpus e encefalomielite experimental auto-imune (EAE).

No presente trabalho foi estudado o efeito de uma fração do veneno da cascavel sul americana *Crotalus durissus terrificus* (Cdt), a crotapotina, no modelo de EAN. São apresentadas evidências de que tanto a administração intraperitoneal (IP) como a oral de crotapotina reduz significativamente a gravidade da EAN induzida em ratos Lewis, associada a um significativo declínio na resposta proliferativa das células T neuritogênicas, assim como diminuição de infiltrados de células mononucleares no nervo ciático dos animais.

ABSTRACT



Biomedical research in which venom components are being investigated for their potential as novel therapeutic agents has emerged as an interesting option. Crota­potin which is a fraction of the venom of the rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, has been described as an anti­inflammatory that acts on the innate arm of the immune response. Here we have demonstrated that intraperitoneal (IP), as well as oral administration of crota­potin significantly reduces the severity of experimental autoimmune neuritis (EAN), an experimental model for Guillain-Barré Syndrome. The reduction of the severity of the disease is associated with a reduction in the mononuclear cells infiltrating in the sciatic nerve and a significant decrease in the lymphocyte proliferative response to neuritogenic peptide.

INTRODUÇÃO

Durante a evolução dos organismos superiores, certamente um dos maiores desafios por eles enfrentados foi a convivência com microorganismos patogênicos; esse fato com certeza representou uma grande pressão evolutiva que norteou o desenvolvimento do sistema imunológico que conhecemos hoje.

Seria muito simplista dizer que a função do sistema imune é a defesa contra organismos patogênicos; essa é apenas uma de suas funções. Sabe-se já há algum tempo que o sistema imune exerce outros papéis imprescindíveis na manutenção da homeostase dos organismos, funções como a vigilância contra o aparecimento de células tumorais, o controle da auto-imunidade, a remoção de células senescentes e uma importante interação neuroendócrina.

Juntamente com as moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), o sistema imune possui um repertório muito vasto de receptores para antígeno, expressos tanto em linfócitos T (TCR) como nos linfócitos B (BCR), essa característica confere ao sistema imune a habilidade de reconhecer praticamente todo e qualquer agente invasor.

Didaticamente podemos dividir as interações do sistema imune em dois grupos principais: a resposta imune inata e a resposta imune adquirida. Entende-se por resposta imune inata, o conjunto de elementos em condição de responder a antígenos de maneiras não específica, ou seja, uma resposta a padrões moleculares, sem que os receptores com regiões variáveis (TCR e BCR) estejam envolvidos. Desta resposta participam as proteínas do sistema complemento, as células matadoras naturais, ou *natural killer* (NK), e as células do sistema fagocítico-mononuclear. Podemos entender por imunidade adquirida, a atuação de um grande conjunto de elementos que permite uma resposta imune específica a um determinado antígeno, utilizando-se agora linfócitos T e B portadores de receptores com regiões variáveis, capazes de reconhecer e montar uma resposta complexa, muitas vezes envolvendo a produção de anticorpos e a ativação de células efetoras e com função regulatórias (JANEWAY et al., 2002).

As células B são capazes de reconhecer uma grande variedade de antígenos, desde peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, polissacarídeos até pequenos produtos químicos, essa propriedade não é compartilhada pelas células T que reconhecem

apenas peptídeos dispostos em uma seqüência primária de aminoácidos. Além disso, o reconhecimento do antígeno pelas células T CD4⁺ ou *helper* ou pelas TCD8⁺ ou *citotóxicas* se dá apenas quando o mesmo está unido a uma molécula do complexo MHC do próprio indivíduo, expressa na superfície da célula apresentadora de antígeno (APC) (MCDEVITT, 2000).

As APCs (macrófagos, células dendríticas ou linfócitos B) convertem antígenos protéicos em peptídeos acoplando-os às moléculas de MHC, mecanismo conhecido por processamento do antígeno. O complexo formado migra para a superfície celular onde poderá ser reconhecido por linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺, dependendo do alelo de MHC ao qual o peptídeo está acoplado, esse é o primeiro sinal indispensável para a ativação de linfócitos T. O segundo sinal é dado pela ligação de moléculas co-estimulatórias presentes tanto nos linfócitos, como nas APCs. As moléculas mais conhecidas são CD28 e CD152 (CTLA4) expressas nos linfócitos, que se ligam às moléculas CD80 e C86 presentes nas APCs (LENSCHOW et al., 1996). A inibição da expressão dessas moléculas suprime a resposta dos linfócitos T, mecanismo conhecido como anergia (SCHWARTZ et al., 2003).

A participação dos produtos celulares solúveis é fundamental na seqüência de eventos que vão culminar com a ativação linfocitária. As células TCD4⁺ secretam alguns tipos de citocinas que as diferenciam em subpopulações celulares do tipo Th1 ou Th2. Os linfócitos T CD4⁺, do tipo Th1, secretam citocinas como IL-2, IFN γ e TNF α que irão mediar as reações de hipersensibilidade tardia e induzir a síntese preferencial de alguns isotipos de imunoglobulinas. Já os linfócitos T CD4⁺ do tipo Th2 secretam citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e estão associadas com a produção de imunoglobulinas dos tipos IgG1 e IgE (MOSSMAN et al., 1986).

Múltiplos fatores tais como o tipo de APC, a dose do antígeno, a presença de moléculas co-estimulatórias e as citocinas presentes no microambiente vão influenciar a diferenciação do subtipo Th1 ou Th2. Há evidências de que se IL-12 e IFN γ estiverem presentes no microambiente onde a resposta imune está acontecendo haverá uma diferenciação para o subtipo Th1, enquanto que a IL-4 é essencial para a diferenciação do subtipo Th2 (ROMAGNANI et al., 2000).

De forma bastante simplificada, podemos dizer que os mecanismos descritos anteriormente garantem o funcionamento eficiente do sistema imunológico contra as diferentes agressões causadas por virtualmente qualquer tipo de agente infeccioso.

Devido à imensa diversidade do repertório celular do sistema imune, é esperado que dentre as células deste existam algumas capazes de responder aos antígenos próprios. Erlich, no início do século XX, introduziu o termo *autoimunidade* ao descrever que os potentes mecanismos efetores utilizados na defesa do hospedeiro podiam causar grave lesão tecidual, se voltados contra ele, essa auto-agressão ficou conhecida como *horror autotoxicus*. Essas agressões, no entanto, somente são observadas em condições patológicas, quando ocorrem falhas nos mecanismos da tolerância imunológica.

A Tolerância Imunológica pode ser entendida como a ausência de resposta específica para um determinado antígeno. A tolerância aos auto-antígenos é conseguida ativamente através de vários mecanismos que controlam o repertório de linfócitos maduros do sistema imune. Durante a maturação, que ocorre no timo para linfócitos T e na medula óssea para linfócitos B, os linfócitos passam tanto pela seleção positiva quanto pela seleção negativa, processos que garantem que as células imunocompetentes que saem dos órgãos linfóides primários (OLP) e migram para os órgãos linfóides secundários (OLS) sejam capazes de reconhecer o MHC próprio e ao mesmo tempo não apresentem forte afinidade para antígenos próprios, essa é a chamada tolerância central (SAKAGUCHI, 2004).

A tolerância central, no entanto, não impede que algumas células que deixam os OLPs e vão popular os OLSs atuem como auto-reativas (MORAHAN, 1992). Dessa forma, há algum tempo é aceita a idéia de que existe, em um organismo saudável, considerável quantidade de células auto-reativas e auto-anticorpos circulantes, desses, apenas uma pequena parcela está associada a uma resposta imune patológica. Concluimos então, que a resposta auto-imune pode ser fisiológica e na maioria das vezes não causa danos ao organismo (SALVETTI et al., 1996). Explicações teóricas têm sido propostas para justificar a presença de células auto-reativas responsáveis por essa auto-imunidade “natural” ou “benigna” (COHEN e YOUNG, 1991; VARELA e COUTINHO, 1991; GROSSMAN e PAUL, 1992; COHEN et al., 1992). O que não está claro ainda é como e quando uma resposta imune potencialmente benigna evolui para uma doença auto-imune. Sabe-se que

fatores genéticos e ambientais influenciam grandemente os complexos mecanismos que controlam a tolerância aos antígenos próprios.

A participação de agentes infecciosos na gênese de doenças auto-imunes tem sido reconhecida por muitos autores, e esta associação está estabelecida com protozoários, bactérias e vírus. Um bom modelo para elucidar tal associação pode ser a participação de bactérias no desenvolvimento da febre-reumática, onde se observa uma resposta imune contra proteínas cardíacas e antígenos do *Streptococcus* β -Hemolítico (GUILHERME et al., 1995), outro exemplo pode ser a associação da infecção pelo vírus Cocksackie com o desenvolvimento da Diabetes Mellitus insulino-dependente (ATKINSON et al., 1994; SCHLOOT et. al., 1997). Há relatos de que a exposição de indivíduos a vírus como o da raiva, sarampo e o coronavírus, durante a adolescência, pode predispor indivíduos ao desenvolvimento da doença desmielinizante Esclerose Múltipla (EM) (EWING e BERNARD, 1998).

O mimetismo molecular poderia explicar a reatividade cruzada entre o epítipo de um microorganismo infectante e um epítipo homólogo ao de uma estrutura própria do hospedeiro, a ocorrência de mimetismo molecular entre determinados epítopos virais e epítopos da proteína básica da mielina já foi demonstrada (WUCHERPFENNIG e STROMINGER, 1995).

Outra possível explicação para o desenvolvimento de doenças auto-imunes é a teoria do espalhamento (spreading) de epítopos. A estimulação de células T específicas para um determinado constituinte celular ou extra-celular é capaz de promover a produção de auto-anticorpos antígeno específico, mas durante o processo inflamatório também pode ocorrer a produção de auto-anticorpos contra outras estruturas próprias do hospedeiro aumentando assim o número de epítopos auto-reativos. (ZHU et al., 2001; GANDHI et al., 2006 ; DEEG et al., 2006)

No presente trabalho é nosso objetivo estudar o modelo de desmielinização periférica a Neurite experimental auto-imune (EAN). As neuropatias inflamatórias desmielinizantes do sistema nervoso periférico, como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e a Polineuropatia Desmielinizante Periférica Crônica (PDPC) resultam de resposta imune

inadequada, dirigida contra os componentes dos nervos periféricos, que levam a interrupção do impulso sensorial ou autônomo, resultando em paralisia transitória (HOPKINS, 1998). A SGB é de etiologia desconhecida, mas infecções precedentes, causadas por vários vírus como: Echo respiratório sincicial, Herpes Zoster e simples, citomegalovírus, os causadores da mononucleose, parotidite, varicela, varíola, hepatite ou ainda micobactérias e bactérias gram negativas têm sido descritas (HARTUNG et al., 1992 ; HOPKINS, 1998). O exame microscópico dos nervos de portadores da SGB revela a infiltração por células mononucleares e a desmielinização segmentar. O infiltrado se faz às custas de linfócitos e macrófagos. A inflamação está distribuída nos nervos periféricos, cranianos, raízes dorsais e ventrais, assim como nos gânglios e nas cadeias simpáticas do sistema nervoso autônomo. Nas lesões mais severas ocorre a destruição axonal; nas lesões crônicas observa-se a proliferação das células de Schwann ao longo dos axônios desnudados, como indicativo de possível remielinização (FUJIOKA, et al., 2000). No entanto, há evidências de que as células de Schwann, que são as células formadoras da mielina no sistema nervoso periférico, expressem as moléculas de MHC de classe II, podendo apresentar o antígeno e produzir IFN γ prolongando a reação desmielinizante (LILJE e ARMANTI, 1997).

As evidências relatadas, somadas à frequência com que essas síndromes desmielinizantes surgem depois de infecções ou da administração de algumas vacinas mostram que a participação do sistema imunológico é inquestionável na doença humana. Muito do conhecimento sobre os mecanismos imunológicos envolvidos nas reações auto-ímmunes na SGB se deve aos estudos que vêm sendo desenvolvidos no modelo experimental, a EAN.

Similaridades clínicas e histopatológicas entre a EAN e a SGB fazem esse modelo ser excelente no estudo dessa doença desmielinizante aguda que acomete o homem. A EAN é uma doença inflamatória de caráter desmielinizante do sistema nervoso periférico (SNP), que pode ser induzida em animais geneticamente suscetíveis pela imunização de componentes da mielina periférica ou através de transferência adotiva de linfócitos T sensibilizados a esses antígenos (SHIN et al., 1989; WAKSMAN e ADAMS, 1955; LISAK e BEHAN 1975). Entre outros antígenos, a mielina periférica é composta por duas proteínas básicas denominadas P0 e P2. Ambas são bem conservadas, apresentando

homologia entre humanos e bovinos. A fração P2 da mielina periférica foi descrita como indutora de neurite periférica e posteriormente, epítopos com efeito neuritogênico, como o peptídeo da fração P2, foram identificados (ABRAMSKY e LONDON, 1975; WHITAKER,1982).

A EAN desenvolvida no rato Lewis é monofásica, ou seja, aproximadamente 10 dias após imunização com peptídeo neuritogênico, o animal desenvolve a doença que atinge o grau máximo entre os dias 16 e 19, com redução gradativa até os dias 22-26, recuperando-se completamente e não voltando a apresentar períodos de exacerbação. O estudo dos mecanismos imunológicos que levam à resolução da doença é extremamente relevante, uma vez que esse modelo simula um surto da doença humana. No modelo da Encefalomielite experimental auto-imune (EAE), uma doença desmielinizante do Sistema Nervoso Central que é considerada uma doença análoga a EAN (ZHU, et al.,1997), o período de recuperação tem sido estudado, e alguns mecanismos já estão sendo entendidos. Há evidências de que a apoptose de linfócitos T encefalitogênicos na EAE e neuritogênicos na EAN poderia explicar a fase de recuperação da doença. Na EAE tem sido demonstrado também que o aparecimento de linfócitos TCD4⁺ com ações supressoras, que contribuiriam para o controle dos clones de linfócitos auto-reativos e conseqüentemente a resolução da doença (SWANBORG, 2001).

Várias são as tentativas de tratamento para a SGB, na literatura médica encontramos desde plasmáfereze até o uso de anticorpos monoclonais, corticóides ou ainda a imunomodulação alcançada através da administração de interferons (CHAUDHURI, 2006; LAVRINIC et al., 2006).

Também para modelo animal (EAN) várias tentativas de tratamento são encontradas na literatura, dentre elas podemos citar: a administração de IL-10 (BAI et al., 1997), a depleção do complemento (VRIESENDORP et al., 1998), a administração de mielina periférica ou mesmo componentes desta, entre outros (GAUPP et al., 1997).

A utilização de venenos totais ou suas frações na tentativa de tratamento de doenças humanas está sendo bastante explorada atualmente. Venenos de serpentes possuem uma elevada diversidade de componentes, cujas propriedades farmacológicas e fisiológicas

têm sido amplamente estudadas. A importância de tais estudos está no uso, bem sucedido, de algumas proteínas ou mesmo peptídeos sintéticos derivados de peçonhas na clínica médica. Um bom exemplo pode ser tirado do uso de um produto sintético homólogo a uma fração do veneno da *Bothrops jararaca* no tratamento da hipertensão arterial (RUILOPE et al., 1988; QIU et al., 1992). Este medicamento, um inibidor de angiotensina-convertase comercialmente conhecido como Captopril têm dado resultados animadores até mesmo em testes com modelos auto-ímmunes experimentais (GODSEL et al., 2003; TARKOWSKI et al., 1990 e CONSTANTINESCU et al., 1995).

Desde o início do século XX há propostas referentes à utilização de venenos ofídicos como agentes anti-tumorais. Recentemente, estudos mostraram que a administração do veneno total da serpente *Bothrops jararaca* reduzia, possivelmente através da inibição da síntese de IL-6, o crescimento de um tumor ascítico induzido em murinos, conhecido como tumor de Erlich. Neste mesmo modelo foi observado o aumento da sobrevivência dos camundongos após o tratamento com o veneno total de serpentes de outro gênero (DA SILVA et al., 2002; ABU-SINNA et al., 2003). Tais resultados podem confirmar o potencial terapêutico do conteúdo total, ou mesmo de alguns componentes derivados de veneno ofídico, no entanto, ainda não estão elucidados os mecanismos imunológicos relacionados a esses fenômenos.

O veneno da serpente sul americana *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) é uma mistura de muitas diferentes proteínas, incluindo a crototoxina (CTX), que é o seu principal componente neurotóxico. A molécula de CTX é composta de duas subunidades, um componente básico (CB) Asp49-PLA₂ (PI~8,2), altamente tóxico reconhecido como uma fosfolipase A₂ (PLA₂) e um componente ácido, não tóxico, denominado crotapotina (Ca) (BERGMAN e FRAENKEL-CONRAT 1938 ; SLOTTA e PREMOSIGH, 1951).

Embora descrita como farmacológica e enzimaticamente inativa (GOPALAKRISHNAN et al, 1984), a crotapotina exerce o papel de proteína que impede a ligação do CB aos sítios de baixa afinidade, desta forma, favorecendo que este alcance seu alvo, a junção neuromuscular (BON, 1982). A relação entre a alta toxicidade de venenos crotálicos e a presença de PLA₂ nos mesmos já é conhecida, no entanto, apesar da capacidade da Ca de potencializar a toxicidade do CB, quando a mesma é dissociada do complexo CTX, inibe a atividade enzimática da PLA₂ (LANDUCCI et al, 2000).

Os efeitos do veneno da serpente Cdt e suas frações têm sido testados em vários estudos sobre a resposta imune humoral e celular, desde a resposta proliferativa de linfócitos até a tentativa de tratamento de modelos animais para doenças auto-imunes (CARDOSO e MOTA 1997; GARCIA et al 2003.; CRUZ et al., 2005).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o efeito da administração oral e intraperitoneal da proteína crotapotina, na evolução clínica da doença experimental desmielinizante EAN.

OBJETIVOS

1. Implantar o modelo da EAN através de imunização com o peptídeo da fração P2 da mielina periférica.
2. Estudar o efeito da administração de Crotopotina na evolução clínica da EAN

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais:

Ratos Lewis, fêmeas de 6-8 semanas, foram importados do Harlan Sprague Dawley, com auxílio da FAPESP, e mantidos, durante a fase de experimentação, no biotério de manutenção do depto de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, em condições livres de patógenos (isoladores).

Neuro-antígeno:

A EAN foi induzida com o peptídeo da fração P2 da mielina periférica de acordo com WHITAKER, 1982. O peptídeo P2 (58-81) foi sintetizado por Genemed Synthesis, CA, USA, e tem a seguinte seqüência de amino ácidos: TESPfKnteISfKLGQEFfTTADNR.

Veneno:

O veneno da serpente Cdt foi fornecido pelo Instituto Butantan (São Paulo) e sua purificação foi realizada pelo Laboratório de Química de Proteínas da Unicamp (Laquip).

Purificação da crotapotina:

A crotapotina do veneno total de CDT foi isolada após dois procedimentos cromatográficos. No primeiro passo, a crotoxina foi purificada do veneno total; Em resumo 35 mg do veneno total foi dissolvido em 400µl de bicarbonato de amônio 0,3M, homogeneizado e clarificado por centrifugação a 4500xg por 2 minutos. A coluna cromatográfica (Superdex 75,1 x 60cm) foi equilibrada com o mesmo tampão por 2 horas antes da injeção da amostra. A eluição dos componentes do veneno foi feita a um fluxo constante de 0,2 ml/min e a corrida cromatográfica foi monitorada a 280 nm. A purificação da crotapotina foi feita em HPLC de fase reversa (coluna de 0,1 x 30cm de µ-Bondapack C18, Waters) usando um gradiente linear 0-100% de acetonitrila em 0,1% de ácido trifluoracético (v/v).

Cinco miligramas da fração crotoxina extraídos do veneno total de CDT foram dissolvidos em 250 µl do tampão A (ácido trifluoracético 0,1%) a 4500 xg por 2 minutos, o sobrenadante foi então aplicado no HPLC analítico de fase reversa, previamente equilibrado com o mesmo tampão A por 15 minutos. A eluição das proteínas foi então realizada utilizando-se um gradiente linear do tampão B (Acetonitrila 66,6% em tampão A) e a corrida cromatográfica foi monitorada a 214nm de absorbância. Após a eluição, as frações foram liofilizadas e estocadas em biofreezer a – 40°C. Um gel descontínuo (Tricina SDS-PAGE) foi utilizado para a avaliação do grau de pureza da crotapotina assim como para estimar a massa molecular das proteínas. (SCHAGGER e VON JAGOW, 1987).

Indução:

Os ratos foram imunizados por via subcutânea com 100 µg do peptídeo P2 em 0,1ml do tampão salino fosfato (PBS), em emulsão com igual volume de Adjuvante Completo de Freund contendo 4mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*, inoculado nas patas traseiras (0,1ml por pata).

Tratamento com Crotapotina:

Uma variedade de doses de Ca foi testada e a dose que apresentou melhor resultado no declínio da EAN – P2 induzida sem mortalidade foi escolhida. Grupos de ratos receberam 13µg/animal via IP ou 25 µg/animal via oral, 5 vezes, em doses distribuídas entre o terceiro dia após a imunização e o aparecimento dos primeiros sinais clínicos da EAN, grupos controles receberam doses similares da proteína OVA.

Evolução clínica da EAN:

Os ratos foram observados diariamente, a partir do nono dia após a imunização, para os sinais clínicos da EAN. A avaliação foi feita da seguinte forma: grau 0 = não doente; grau 1= perda do tônus da cauda; grau 2 = fraqueza parcial dos membros posteriores; grau 3= paralisia severa dos membros posteriores; grau 4 = paralisia severa dos membros anteriores e posteriores. As observações seguiram por 30 dias. Atribui-se “scores” clínicos a cada animal do grupo, cada um composto por 5 animais.

Perfusão do animal:

O animal, após a anestesia, foi perfundido com glutaraldeído a 2,5%, utilizando-se bomba de perfusão.

Isolamento do nervo:

O nervo ciático de ratos Lewis controles ou imunizados com o peptídeo de P2, submetidos ou não ao tratamento com crotapotina, foi individualizado sobre microscopia cirúrgica apropriada, após fixação com glutaraldeído (24 horas) seguido de imersão em sacarose a 30 %. Após esse tratamento, parte do nervo foi congelado e cortado em micrótomo comum, criostato.

Obtenção das células de linfonodo:

Linfonodos regionais foram removidos assepticamente e suspensões de células foram preparadas usando uma malha de inox. As células foram lavadas três vezes com solução balanceada de Hanks e ressuspensas em meio RPMI 1640 enriquecido com soro fetal bovino a 5% (Microbiológica – RJ), gentamicina (4,25 mg/l), glutamina e 2 mercaptoetanol. Para determinação da viabilidade celular utilizou-se o método de exclusão com Azul de Trypan.

Cultura de células dos linfonodos:

Para resposta proliferativa específica para P2 (58-81) utilizou-se células de linfonodos de animais imunizados, obtidas de acordo com o item anteriormente descrito. A concentração celular foi ajustada para 2×10^5 células/ml em microplacas de cultura de 96 poços. As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido conforme descrito no item anterior. O ensaio foi realizado em triplicata. Avaliou-se a transformação blástica de linfócitos estimulados por duas diferentes concentrações de P2 (58-81) 1µg/ml e 5µg/ml e por mitógeno não específico Con-A a 2,5µg/ml. As células foram encubadas 96-144 horas com o antígeno e 72 horas com o mitógeno, em incubadora com sistema constante de CO₂, numa tensão de 5% a 37° C. Aproximadamente 18 horas antes do término da incubação, foi adicionado em cada orifício 1µCi de timidina tritiada

(New England Nuclear MA -USA). Após esse período, o excesso radioativo foi retirado, lavando-se as células em um coletor de células (Cell Harvester- modelo 200 A - Cambridge Technology - USA). As células livres de excesso radioativo foram depositadas em papel de fibra de vidro (Cambridge - Tec.- USA) e colocadas em tubos padronizados na presença de líquido de cintilação. O conteúdo radioativo foi avaliado em cintilador Beta (Beckman LS 6000 - Liquid Scintillation System). Os resultados foram expressos em contagens por minuto (CPM), sendo considerada a média das triplicatas.

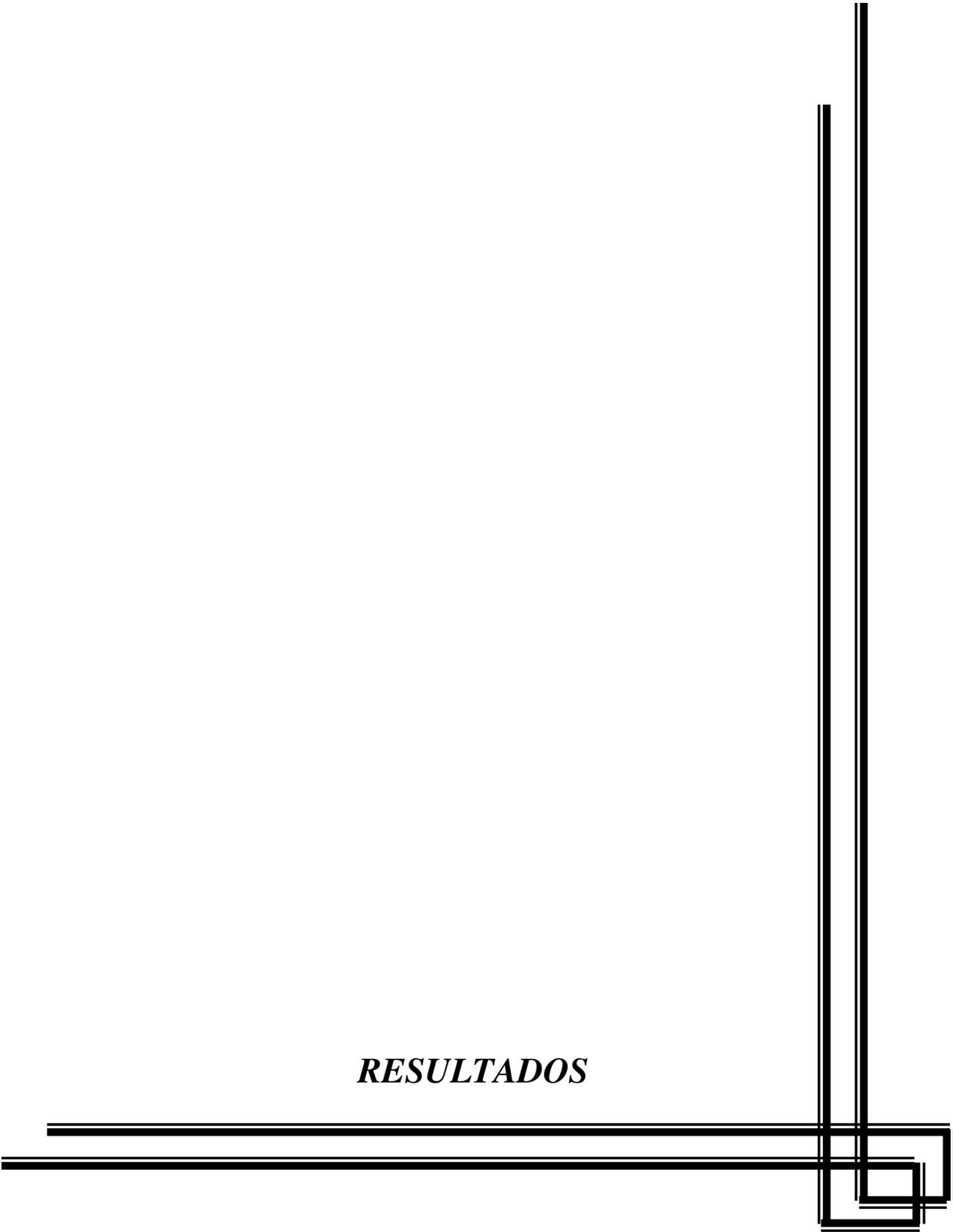
Transferência adotiva:

Para a transferência adotiva de linfócitos foi feita uma cultura de células de linfonodos, com resposta proliferativa específica para P2, de animais previamente imunizados com o peptídeo da fração P2 da mielina periférica. Cada animal utilizado na transferência recebeu 10^6 linfócitos pela veia da cauda (grupo de 6 animais).

Análise Estatística:

Para a análise foi usado o programa WinStat 3.1. Os dados analisados foram em relação ao “score” máximo de cada grupo, assim, foi escolhido um teste não paramétrico, Teste-U(*Mann-Whitney*), quando $p < 0,05$ foi considerado significativa a diferença.

RESULTADOS



Implantação do modelo EAN:

Para a validade de um estudo usando como modelo experimental a EAN através de imunização, é necessário que o mesmo esteja muito bem padronizado. Devem-se evitar grandes variações durante o procedimento de imunização, principalmente em relação à preparação do antígeno a ser inoculado e à própria inoculação deste na pata dos animais. Estas são etapas críticas na implantação do modelo, pois definem o perfil e a evolução da doença. Foram testados diferentes protocolos de imunização utilizando-se várias concentrações de peptídeo P2 e *Mycobacterium tuberculosis* (MT) e verificou-se que altas concentrações do peptídeo P2 (200µg/animal) aliadas às altas concentrações de MT (6mg/ml) induzem uma doença muito grave gerando a morte da maioria dos animais. Por outro lado, baixas concentrações de P2 (30µg/animal), associadas às altas ou baixas concentrações de MT levam a uma doença branda com grau máximo de aproximadamente dois e meio, o que torna difícil a comparação entre os grupos controle e tratados (Figura 1).

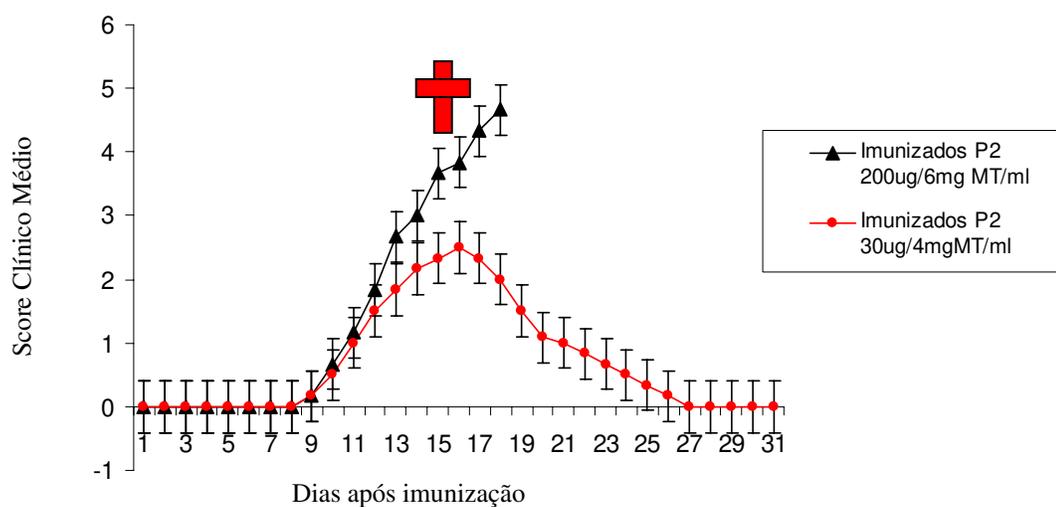


Figura 1- Indução da EAN utilizando 200µg de P2/ 6 mg de MT/ml e 30µg de P2/ 4 mg de MT/ml.

O protocolo ideal que gera uma doença com grau máximo variando entre 3,5 e 4, 5, que não causa a morte dos animais e permite a observação de diferenças significativas entre os grupos estudados foi encontrado com a imunização com 100 µg do peptídeo P2 em 0,1ml do tampão salino fosfato (PBS), em emulsão com igual volume do adjuvante completo de Freund contendo 4mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*, inoculado nas patas traseiras, por via subcutânea, sendo inoculado 0,1ml de emulsão por pata. A figura 2 mostra que a EAN desenvolvida com esse protocolo de imunização induz uma doença que se inicia entre os dias 9 - 11 após a imunização e atinge o pico máximo entre os dias 16-19, recuperando-se após 26-27 dias. Os resultados estão expressos como média dos “scores” clínicos avaliados em 12 ratos Lewis por grupo. A figura 2 também demonstra a evolução clínica da EAN após a transferência adotiva de linfócitos T CD4⁺ respondedores ao peptídeo P2. Pode-se verificar que os primeiros sinais clínicos são observados 5-6 dias após a transferência de 1x10⁶ linfócitos/rato, sendo que os animais se recuperam 16-18 dias após a transferência adotiva.

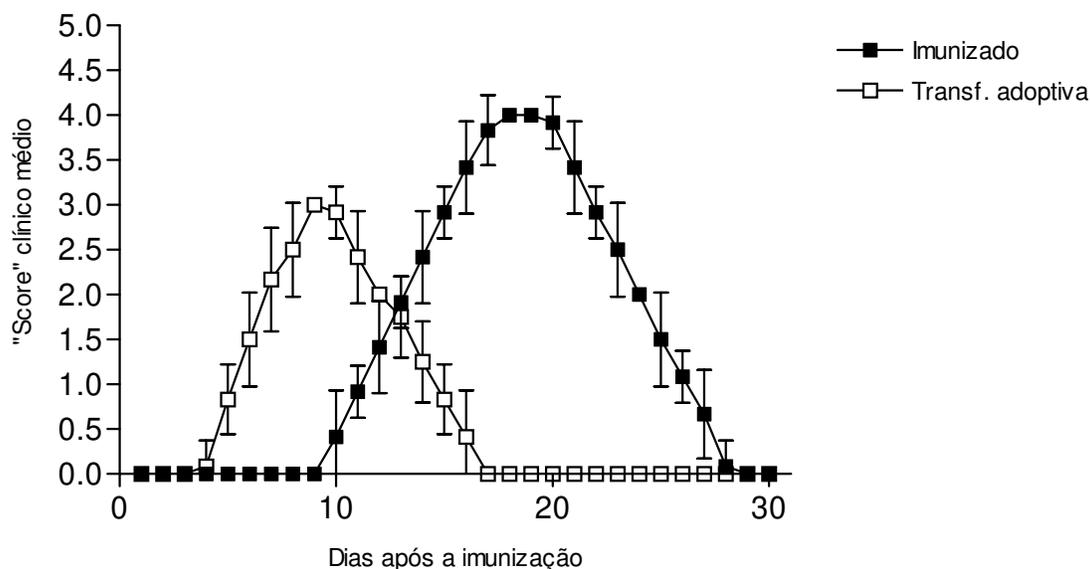


Figura 2- Evolução clínica da EAN induzida ativamente em Ratos Lewis pela imunização com peptídeo da fração P2 da mielina periférica e passivamente pela transferência adotiva de linfócitos reativos ao peptídeo P2.

A observação dos diferentes “scores” clínicos da EAN é um processo dinâmico, difícil de ser documentado em fotos cuja natureza é estática, apesar disso, as imagens das figuras a seguir ilustram algumas características marcantes das diferentes fases da doença.

Na figura 3.1, as imagens mostram ratos Lewis já imunizados e avaliados em grau zero, sem apresentar sintomas clínicos da doença. Observa-se que os animais são capazes de manter a cauda elevada (A-C) e fazer pequenas ondulações com a mesma (D), o que indica a presença do tônus da cauda. O primeiro sinal clínico observado na evolução da EAN é a perda do tônus da cauda, o que caracteriza o grau 1 da doença (Figura 3.2 A). Além disso, os animais podem começar a ter dificuldades em movimentar os membros posteriores (Figura 3.2 B).

Ratos Lewis avaliados em grau 2 já perderam parcialmente a mobilidade dos membros posteriores, passando a arrastá-los (Figura 3.3). Em grau 3, os animais apresentam paralisia severa dos membros posteriores e dificuldade em movimentar os membros anteriores (Figura 3.4). Além disso, pode ser observado que os animais começam a perder peso. Na fase de grau 4 ocorre a paralisia dos membros anteriores e posteriores e é nítida a perda de peso do animal, uma vez que ele não consegue ter acesso aos alimentos.

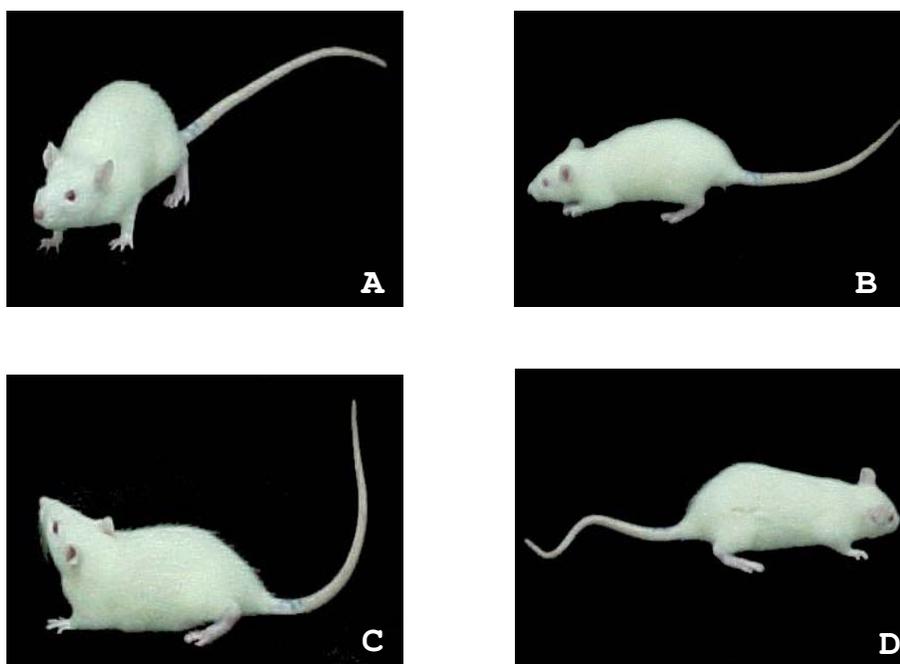


Figura 3.1- Ratos Lewis imunizados com o peptídeo neuritogênico avaliados em grau 0 (9 dias após a imunização). Os animais apresentam tônus da cauda, o que lhes permite mantê-la elevada (A-C) e fazer pequenas ondulações com a mesma (D).

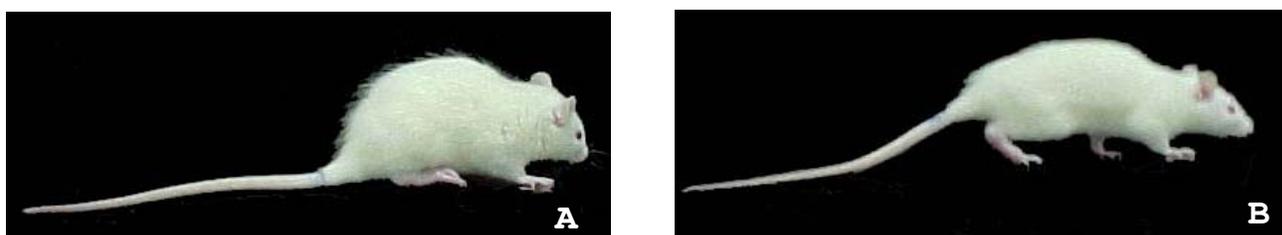


Figura 3.2- Ratos Lewis imunizados com o peptídeo neuritogênico avaliados em grau 1. Os animais perderam o tônus da cauda (A) e podem começar a apresentar dificuldades em movimentar os membros pélvicos (B).

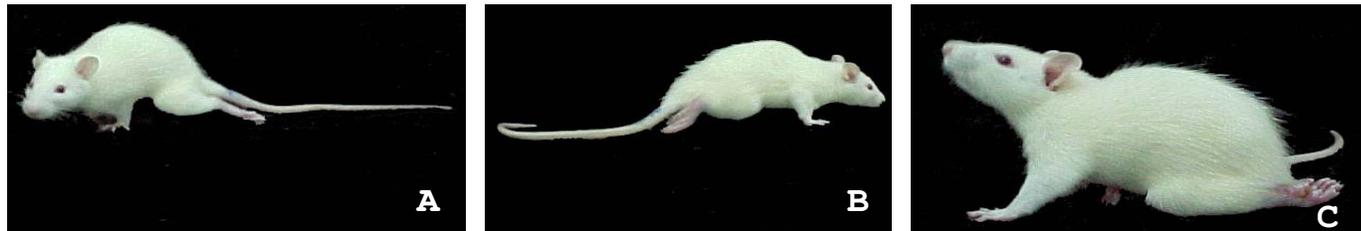


Figura 3.3- Ratos Lewis imunizados com o peptídeo neuritogênico avaliados em grau 2. Os animais perderam parcialmente a mobilidade dos membros pélvicos, passando a arrastá-los (A-C).



Figura 3.4- Ratos Lewis imunizados com o peptídeo neuritogênico avaliados em grau 3. Os animais não têm tônus na cauda, perderam completamente a mobilidade dos membros posteriores e apresentam perda parcial da mobilidade dos membros anteriores.

Purificação da Crotapotina

O veneno total da serpente Cdt foi fornecido pelo Instituto Butantã (São Paulo), e a purificação foi realizada pelo Laboratório de Química de Proteínas da UNICAMP – LAQUIP, de acordo com o item descrito anteriormente em materiais e métodos.

A figura 4a demonstra a cromatografia de peso molecular do veneno total eluído em uma coluna Superdex 75, que resulta em cinco frações principais nomeadas crotacetina, convulxina, giroxina, crotoxina e crotamina. Após essa primeira corrida cromatográfica, a fração crotoxina foi submetida a uma nova cromatografia de fase reversa em HPLC. Nessa eluição em uma coluna de hidrofobicidade (C-18) vários picos foram obtidos, e nomeados F5, F7 (isoformas da crotapotina) e F15, F16 e F17 (isoformas de PLA2). A fração F7 é responsável por aproximadamente 72% de todas as isoformas de crotapotina (Figura 4b). Finalmente um gel descontínuo (Tricina SDS-PAGE) foi utilizado para a avaliação do grau de pureza da crotapotina, assim como para determinar a massa molecular da proteína, estimada em 9 kDa (Figura 4 c)

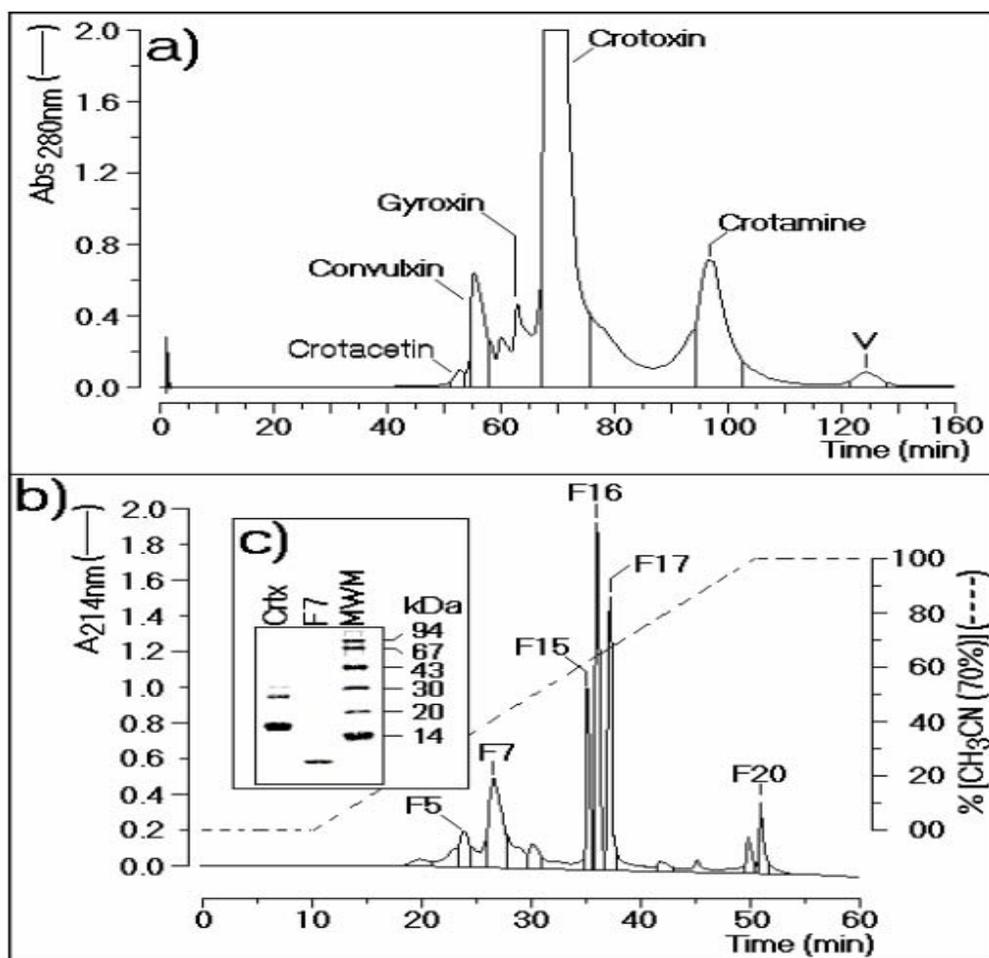


Figura 4- Cromatografia do veneno total da serpente Cdt: a eluição em coluna Superdex 75 mostra 5 frações principais, a crotoacetina, a convulxina, a giroxina, a crotoxina e a crotoamina(Figura 4.a). Posteriormente, a fração crotoxina foi sujeita à cromatografia em HPLC de fase reversa. Nesta condição cromatográfica, alguns picos foram identificados e nomeados F5,F7 (isoformas da crotopotina) e F15, F16 e F17 (isoformas de PLA2). A fração F7 é responsável por aproximadamente 72% de todas as isoformas de crotopotina (Fig. 4b) e o seu peso molecular determinado em 9kDa (Figura 4c).

Evolução clínica da EAN antes e após o tratamento com o crotapotina.

Assim como na implantação do modelo EAN em nosso laboratório, a definição de um regime ideal de tratamento com crotapotina foi bastante trabalhoso. Diferentes doses foram testadas, assim como o período de início do tratamento. Após vários testes, chegou-se a conclusão que a crotapotina é mais efetiva na redução dos sinais clínicos da EAN quando administrada logo nos primeiros dias após a imunização, se administrada tardiamente apresenta um efeito protetor mínimo (Figura 5) e se administrada antes da imunização, apresenta resultados semelhante ao do grupo de animais não tratados. A evolução clínica da EAN em ratos Lewis imunizados com peptídeo da fração P2 da mielina periférica, tratados com ovalbumina e tratados oralmente ou via intraperitoneal com crotapotina (protocolo ideal) está demonstrada na figura 6, estes animais receberam diariamente doses de crotapotina IP-13µg/rato (grupo CAIP/P2CFA), crotapotina oral - 25µg/rato (CAoral/P2CFA) e ovalbumina IP -13µg/rato (OVA/P2CFA) em solução salina começando no quarto dia após a imunização e totalizando cinco doses até o décimo primeiro dia. O grupo P2CFA recebeu apenas solução salina. Nos grupos tratados com crotapotina o pico máximo da doença ocorreu entre dias 17-18, com recuperação 23-25 dias após a imunização, estes animais atingiram apenas o grau 2 da doença no caso de CA/IP, e grau 1 no caso de CA/oral mostrando uma significativa redução da gravidade da doença ($p < 0.001$). Não se observou diferença significativa ($p > 0.05$) entre os grupos P2CFA e OVA/P2CFA.

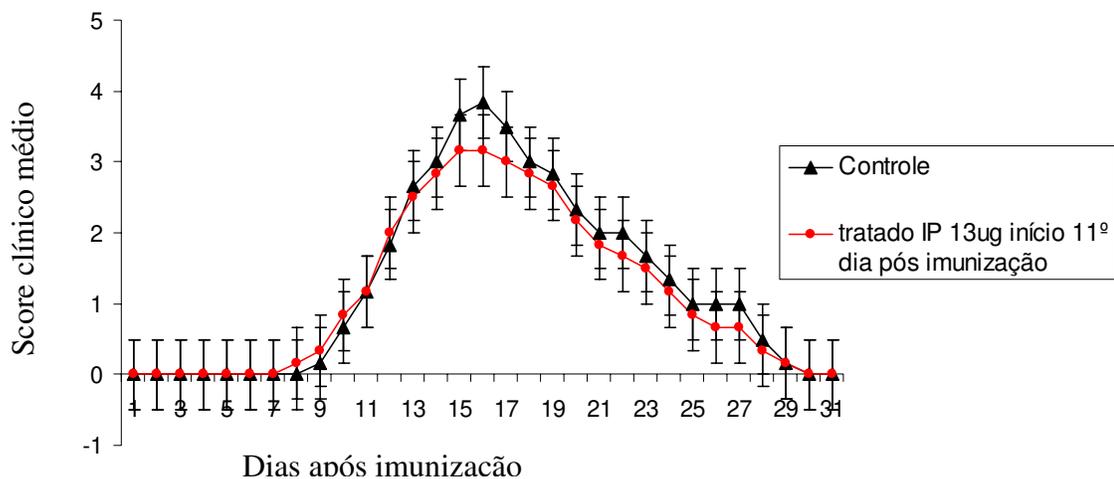


Figura 5- EAN em ratos Lewis tratados e não tratados com crotopotina IP. O tratamento teve início no 11º dia após imunização.

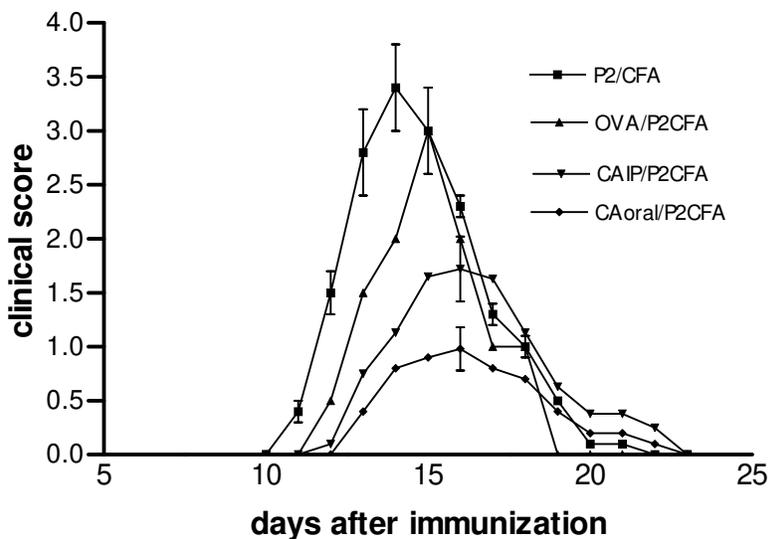


Figura 6- Animais com EAN tratados e não tratados com crotopotina. A crotopotina foi administrada por via oral(CA ora/P2CFA) e por via intraperitoneal (CAIP/P2CFA). O grupo controle recebeu proteína irrelevante OVA via intraperitonial(OVA/P2/CFA).

Estudo histológico de nervos ciáticos de ratos Lewis imunizados com o peptídeo da fração P2 da mielina periférica tratados ou não com crotapotina.

Definimos o pico da doença (13-15 dias) como período de interesse para realização de cortes histológicos de nervos ciáticos dos animais, a figura 7 demonstra cortes histológicos de nervos ciáticos de animais controles imunizados (1,1A e 1B), animais tratados com ovalbumina (2, 2A e 2B), animais tratados com crotapotina IP -13µg/dose/animal x 5 (3, 3A e 3B) e animais tratados com crotapotina oral - 25µg/dose/animal x 5, os aumentos são de 100, 200 e 400 vezes respectivamente e foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE). Pode-se observar uma grande diferença no que se refere à presença de infiltrado celular e dano à estrutura do nervo se compararmos as micrografias dos grupos imunizados e tratados com ovalbumina com os grupos tratados com crotapotina por via IP e oral, evidenciando a ação protetora da crotapotina.

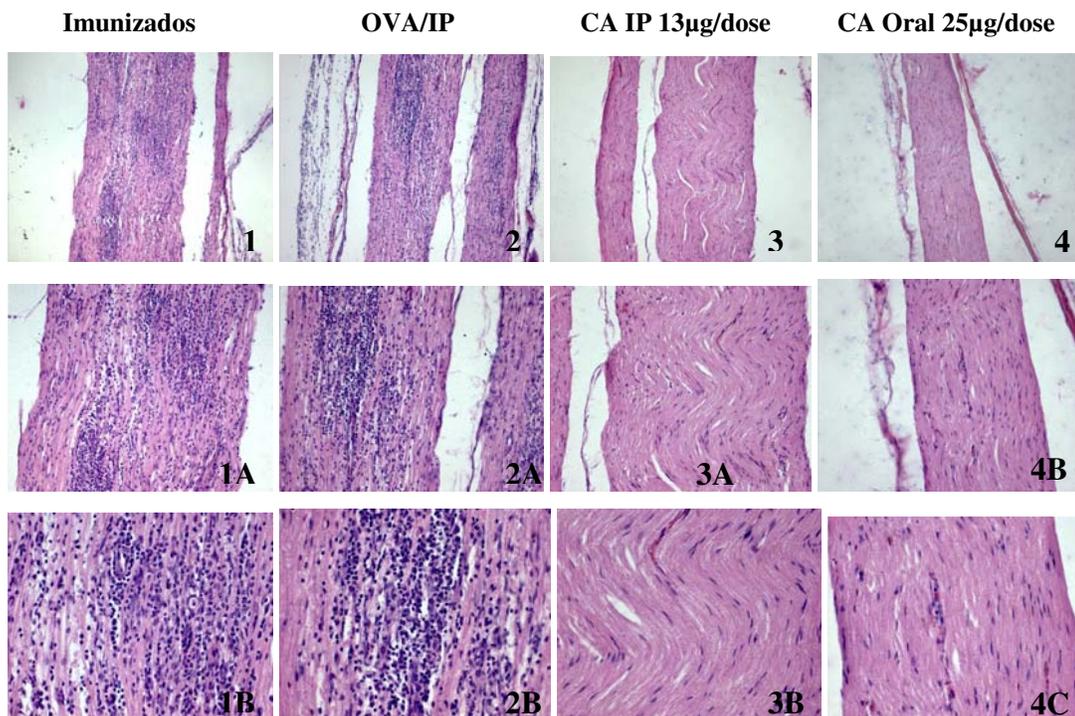


Figura 7- Exame histológico de nervos ciáticos de animais imunizados com peptídeo P2 (1,1A,1B), após tratamento com OVA (2,2A,2B), tratado com crotapotina IP (3, 3A, 3B) e crotapotina oral (4, 4A, 4B) corados com HE. Não houve diferença significativa entre os animais imunizados e tratados com OVA. Pequena quantidade de infiltrados celulares foi encontrada em animais tratados com crotapotina.

Estudo da resposta proliferativa de linfócitos sensibilizados ao peptídeo da fração P2, da mielina periférica, antes e após o tratamento com a Crotapotina.

Grupos de oito ratos Lewis foram imunizados com peptídeo P2 em CFA e tratados ou não com crotapotina e OVA como descrito anteriormente. Quinze dias após a imunização, os linfonodos regionais foram retirados e a resposta proliferativa dos linfócitos estimulados com o peptídeo P2 nas concentrações de 1µg/ml e 5µg/ml foi avaliada, em uma segunda placa foram estimuladas com um mitógeno não específico (Con A 2,5µg/ml). Os resultados, apresentados na Figura 8, demonstram que o tratamento com crotapotina reduziu a resposta proliferativa tanto para o tratamento oral, quanto para o tratamento intraperitoneal. A administração da crotapotina induziu uma depressão na resposta proliferativa de linfócitos neuritogênicos, com uma significativa redução ($p < 0.001$) observada quando as células foram estimuladas com 5µg/ml de peptídeo P2. (14860 ± 3620 cpm e 24360 ± 4324 cpm versus 48240 ± 5420 cpm e 44630 ± 6100 cpm) para animais tratados oral e IP, animais não tratados e tratados com OVA respectivamente (Figura 8A).

A supressão da resposta proliferativa também foi observada quando as células foram estimuladas com o peptídeo P2 na concentração de 1µg/ml (12643 ± 4320 cpm, 22639 ± 4356 cpm versus 36435 ± 6789 cpm, 31254 ± 5324 cpm) para animais tratados com crotapotina oral, IP, tratados com OVA e não tratados respectivamente (Figura 8B) .

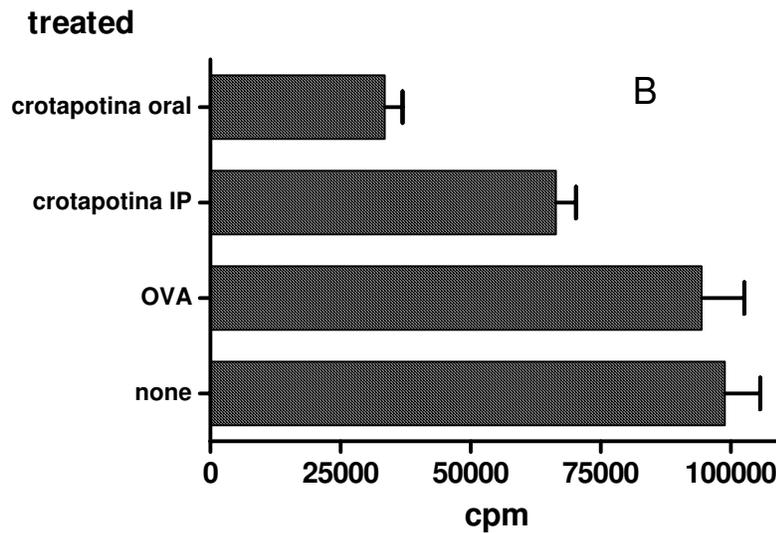
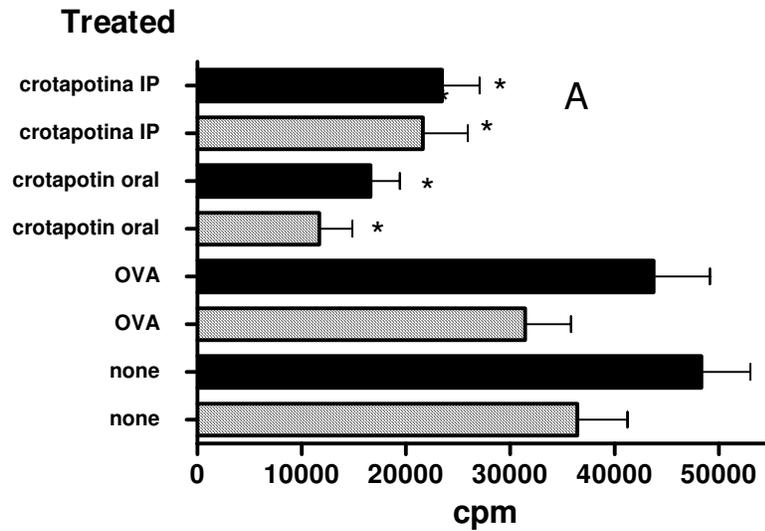


Figura 8- Resposta proliferativa de células dos linfonodos de ratos Lewis imunizados com peptídeo P2 em CFA tratados com OVA ou crotapotina. As células dos linfonodos regionais foram extraídas no pico da doença, e estimuladas *in vitro* com o peptídeo P2 em duas concentrações 1µg/ml (coluna cinza) e 5µg/ml(coluna preta)(Figura 8A). As células também foram estimuladas por mitógeno não específico, Con A 2.5µg/ml (figura 8B).

DISCUSSÃO

Na parte inicial desse estudo, trabalhamos com sucesso no sentido de implantar o modelo da EAN. A EAN é basicamente iniciada por uma reação imune mediada por células (MAURER et al., 2002). Essa observação foi confirmada pela indução da doença em animais recipientes normais, através da transferência adotiva de linfócitos T CD4⁺ de ratos imunizados com o peptídeo P2. Além disso, comprovou-se a infiltração de linfócitos auto-reativos nas áreas de desmielinização nos nervos periféricos.

Uma vez implantado o modelo da EAN foi nosso objetivo verificar o efeito da administração de uma fração do veneno da *Crotalus durissus terrificus* na evolução clínica da EAN. Demonstrou-se que a administração de crotapotina reduz a gravidade da EAN, sendo que parte desse efeito protetor se deve à redução da resposta proliferativa de linfócitos T auto-reativos e a diminuição do infiltrado linfocitário no local da lesão desmielinizante.

O efeito da administração de componentes do veneno de serpentes em doenças que acometem o sistema nervoso já foi descrito anteriormente. Uma iodoacetamida modificada e não tóxica derivada de toxinas de serpente induziu resistência ao desenvolvimento da encefalomielite experimental auto-imune (EAE) induzida em cobaias (HINMAN et al., 1999). Além disso, um fator de crescimento neural, isolado e purificado do veneno total de *Naja naja atra* reduziu a degeneração de fibras nervosas e melhorou a regeneração de nervos periféricos resultando em recuperação funcional da injúria (LIXB et al., 1999).

Os efeitos precoces da administração da crotapotina sugerem a ativação do braço inato da resposta imune, especialmente a ativação de monócitos e macrófagos (LANDUCCI et al., 1995 e LANDUCCI et al., 2000). Já é bastante aceito que a resposta imune inata exerce controle na subsequente resposta imune adaptativa agindo na seleção de linfócitos com receptores específicos a determinado antígeno, controlando sua ativação e expansão clonal. Estudos revelam uma dicotomia na resposta de células T CD4⁺ tanto Th1 com produção de IFN γ e IL-2, quanto Th2 com produção de IL-4 e IL-5.

O balanço na produção dessas citocinas ativa as células efetoras na resposta imune adaptativa (MAURER et al., 2002). A expressão precoce de IL-12 em macrófagos ou a produção de IFN γ por células NK promove respostas do tipo TCD4⁺ Th1 (SZABO et al., 2003), enquanto que a presença de citocinas antiinflamatórias tais como TGF β e IL-10 podem reduzir uma resposta do tipo Th1 (PULENDRAM, 2004; CHEN et al., 1994).

Foi demonstrado que a crotapotina suprime a transformação de linfócitos após a administração oral ou intraperitoneal. Em um trabalho anterior, demonstramos um significativo aumento na produção de prostaglandina E2 (PGE2) no sobrenadante de culturas de macrófagos purificados, após estimulação *in vitro* com crotapotina (GARCIA et al.,2003). A PGE2 é um potente supressor da resposta proliferativa de linfócitos e pode inibir a produção de citocinas produzidas pelos linfócitos CD4 tipo Th1 (MEYER et al., 2003; KURODA e YAMASHITA, 2003). É possível que a supressão da resposta linfoproliferativa observada nos animais tratados com a crotapotina seja devido, pelo menos em parte, a aumento da produção de PGE2 na lesão desmielinizante. No modelo EAE, o aumento da produção de PGE2 no tecido nervoso está associado com a fase de recuperação da doença

(KHOURY et al.,1992). Na figura 6, mostramos que a Crotapotina é eficaz quando administrada nos primeiros dias após a imunização, não tendo o mesmo efeito protetor quando administrada no décimo primeiro dia após a imunização (figura 5). É possível que outros mediadores liberados na resposta imune inata, além dos metabólicos do ácido araquidônico, estejam atuando em sinergismo com a PGE2, inibindo a proliferação dos linfócitos auto-reativos nessa fase precoce de indução da EAN. É possível ainda que a Crotapotina atue na migração dos linfócitos para o SNP, talvez inibindo a expressão de moléculas de adesão. A administração de Crotapotina não é eficiente na fase mais tardia, provavelmente devido ao fato de que nessa fase já tenha havido importante expansão dos linfócitos auto-reativos e ao fato destes já terem migrado para o SNP.

Embora estudos adicionais sobre o efeito da crotopotina na resposta imune adaptativa sejam necessários, nesse estudo apresentamos evidências de que essa fração de veneno da serpente Cdt atua como agente antiinflamatório, reduzindo a resposta proliferativa de linfócitos T auto-reativos e a infiltração dessas células no sistema nervoso periférico, resultando na diminuição das lesões desmielinizantes.

Esses achados podem indicar um novo caminho para a proteção neuronal na SGB e em outras neuropatias inflamatórias desmielinizantes.

CONCLUSÕES



- A EAN é um doença mediada por células, uma vez que a mesma pode ser induzida através da transferência adotiva de linfócitos neuritogênicos extraídos de ratos imunizados com o peptídeo P2.
- A administração de crotapotina, tanto intraperitoneal quanto oral diminuiu os sinais clínicos da EAN quando comparados com grupos controles (imunizado/OVA).
- O estudo histológico de grupos de animais imunizados e tratados ou não com crotapotina ou OVA demonstrou uma significativa redução do número e extensão dos infiltrados de células mononucleares apenas em grupos tratados com Crotapotina.
- A administração da Crotapotina induziu depressão na resposta proliferativa de linfócitos auto-reativos (neuritogênicos)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- ABRAMSKY, O. & LONDON, Y. Purification and partial characterization of two basic proteins from human peripheral nerve. *iochim Biophys Acta*. 1975 Jun 26; 393 (2):556-62.
- ABU-SINNA, G.; ESMAT, A.Y.; AL-ZAHABY, A.A.; SOLIMAN, N.A. & IBRAHIM, T.M. Fractionation and characterization of Cerastes cerastes snake venom and the antitumor action of its lethal and non-lethal fractions. *Toxicon*. 2003 Aug;42 (2):207-15.
- ATKINSON, M.A.; BOWMAN, M.A.; CAMPBELL, L.; DARROW, B.L.; KAUFMAN, D.L. & MACLAREN, N.K. Cellular immunity to determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. *J.Clin. Investi*. 1994. 94:2125-2129.
- BAI, X.F.; ZHU, J.; ZHANG, G.X.; KAPONIDES, G.; HOJEBERG, B.; VAN DER MEIDE, P.H. & LINK, H. IL-10 suppresses experimental autoimmune neuritis and down-regulates TH1-type immune responses. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997 May;83 (2):117-26.
- BERGMANN, M. & FRAENKEL-CONRAT, H. The enzymatic synthesis of peptide bonds. *J. Biol. Chem*. 1938; 124: 1-6.
- BON, C. Synergism of the two subunits of crotoxin. *Toxicon*. 1982; 20 (1):105-9.
- CARDOSO, D.F. & MOTA, I. Effect of Crotalus venom on the humoral and cellular immune response. *Toxicon*. 1997 Apr; 35 (4):607-612.
- CHAUDHURI, A. Guillain-Barre syndrome. *Lancet*. 2006; Feb 11; 367 (9509):472-3.
- CHEN, Y., KUCHROO, V., INOBE, J.I., HAFLER, D.A. AND WEINER, H.L., Regulatory T cell clones of autoimmune encephalomyelitis. 1994 *Science* 265, 1237-1240.
- COHEN, I.R. & YOUNG, D.B. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol Today*. 1991 Apr;12(4):105-10. Review.
- COHEN, J.J.; DUKE, R.C.; FADOK, V.A. & SELLINS, K.S. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Ann. Rev. Immunol*. 1992. 10: 267-293.
- CONSTANTINESCU, C.S.; VENTURA, E.; HILLIARD, B. & ROSTAMI, A. Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1995 Aug; 17 (3):471-91.

- CRUZ, A.H.; MENDONCA, R.Z. & PETRICEVICH, V.L. Crotalus durissus terrificus Venom Interferes With Morphological, Functional, and Biochemical Changes in Murine Macrophage. *Mediators Inflamm.* 2005 Dec (6):349-59.
- DA SILVA, R.J.; DA SILVA, M.G.; VILELA, L.C. & FECCHIO, D. Antitumor effect of Bothrops jararaca venom. *Mediators Inflamm.* 2002 Apr;11(2):99-104.
- DEEG, C.A.; AMANN, B.; RAITH, A.J. & KASPERS, B. Inter- and intramolecular epitope spreading in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 Feb;47(2):652-656.
- EWING, C. & BERNARD, C.C. Insights into the aetiology and pathogenesis of multiple sclerosis *Immunol. and Cell Biology* 1998. 76:47-54.
- FUJIOKA, T.; PUREV, N.; KREMLEV, S.G.; VENTURA, E.S. & ROSTAMI, A. Flow cytometric analysis of infiltrating cells in the peripheral nerves in experimental allergic neuritis. *J. neuroimmunol.* 2000. 108: 181-191.
- GANDHI, R.; HUSSAIN, E.; DAS, J.; HANDA, R. & PAL, R. Anti-idiotypic-mediated epitope spreading and diminished phagocytosis by a human monoclonal antibody recognizing late-stage apoptotic cells. *Cell Death Differ.* 2006 Feb 10.
- GARCIA, F.; TOYAMA, M.H.; CASTRO, F.R.; PROENCA, P.L.; MARANGONI, S. & SANTOS, L.M. Crotafotin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE2 synthesis. *Toxicon.* 2003 Sep 15; 42(4):433-7.
- GAUPP, S.; HARTUNG, H.P.; TOYKA, K. & JUNG, S. Modulation of experimental autoimmune neuritis in Lewis rats by oral application of myelin antigens. *J Neuroimmunol.* 1997 Nov; 79(2):129-37.
- GODSEL, L.M.; LEON, J.S.; WANG, K.; FORNEK, J.L.; MOLTENI, A. & ENGMAN, D.M. Captopril prevents experimental autoimmune myocarditis. *J Immunol.* 2003 Jul 1;171(1):346-352.
- GOPALAKRISHNAN, P. & HAWGOOD, B.J. Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. *Toxicon.* 1984; 22(5):791-804.

GROSSMAN, Z. & PAUL, W.E. Adaptive cellular interactions in the immune system: the tunable activation threshold and the significance of subthreshold responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Nov 1; 89(21):10365-9.

GUILHERME, L.; CUNHA-NETO, E.; COELHO, V.; SNITCIWSKY, R.; POWERANZEFF, P.M.A.; ASSIS, R.V.; PEDRA, F.; NEURMANN, B.S.; GOLDBERG, A.; PATARROYO, M.E.; PILLEGGI, F. & KALIL, J. Human Heart infiltrating T cell clone from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac protein. *Circulation* 1995. 92: 415-420.

HARTUNG, H.P.; JUNG, S.; STOLL, G.; ZIELASEK, J.; SCHMIDT, B.; ARCHELOS, J.J. & TOYKA, K.V. Inflammatory mediators in demyelinating disorders of the CNS and PNS *J. Neuroimmunol* 1992. 40: 197-210.

HINMAN CL, STEVENS-TRUSS R, SCHWARZ C, HUDSON RA. Sequence determinants of modified cobra venom neurotoxin which induce immune resistance to experimental allergic encephalomyelitis: molecular mechanisms for immunologic action. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1999 Aug;21(3):483-506.

HOPKINS, A.; Neurology. In *Clinical Neurology: A modern approach* (Hopkins. A., Ed.) Oxford Univ. Press. New York, 1998.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. & SHLOMCHIK, M. *Imunologia: O sistema Imune na saúde e na doença*, ARTMED, 5ª Ed., Porto Alegre – RS 2002.

KHOURY SJ, HANCOCK WW, WEINER HL. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med*. 1992 Nov 1;176(5):1355-64

KURODA E. & YAMASHITA U. Mechanisms of enhanced macrophage-mediated prostaglandin E2 production and its suppressive role in Th1 activation in Th2-dominant BALB/c mice. *J Immunol*. 2003;170(2):757-64.

LANDUCCI EC, ANTUNES E, DONATO JL, FARO R, HYSLOP S, MARANGONI S, OLIVEIRA B, CIRINO G, DE NUCCI G. Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. *Br J Pharmacol*. 1995 Feb;114(3):578-83.

LANDUCCI, E.C.; TOYAMA, M.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E. & DE NUCCI, G. Effect of crotapotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A2. *Toxicon*. 2000; Feb 38 (2):199-208.

LAVRNIC, D.; ROMIC, M.; KACAR, A.; STOJANOVIC-RAKOCEVIC, V.; STEVIC, Z.; VUJIC, A.; BASTA, I.; MARJANOVIC, I.; BOGDANOVIC, G. & APOSTOLSKI, S. High doses of immunoglobulin G in the therapy for severe forms of myasthenia gravis and Guillain-Barre syndrome. *Vojnosanit Pregl*. 2006 Jan;63(1):37-42.

LENCHOW, D.J.; WALUNAS, T.L. & BLUESTONE, J.A. CD28/B7 System of T cell costimulation. *Ann Review of Immun*. 1996 Apr; 14: 233-258.

LILJE, O. & ARMANTI, P.J. The distribution and abundance of MHC and ICAM-1 on Schwann cells in vitro . *J. Neuroimmunology* 1997. 77: 75-84.

LISAK, R.P. & BEHAN, P.O. Experimental autoimmune demyelinating diseases: experimental allergic encephalomyelitis and experimental allergic neuritis. *Biomedicine*. 1975 Mar; 22(2):81-7. Review.

LIXB, CHEN MJ, LEI DQ, YANG B, LIAO GS, SHU YY, TANG SX Bioactivities of nerve growth factor from Chinese cobra venom. *J Nat Toxins* 1999 8(3):359-62.

MAURER M, TOYKA KV, GOLD R. Cellular immunity in inflammatory autoimmune neuropathies. *Rev Neurol (Paris)*. 2002 Dec;158(12 Pt 2):S7-15. Review.

MCDEVITT, H.O. Discovering the Role of the Major Histocompatibility Complex in the Immune Response. *Ann. Review of Immun*. 2000 Apr; 18:1-17.

MEYER F, RAMANUJAM KS, GOBERT AP, JAMES SP, WILSON KT. Cutting edge: cyclooxygenase-2 activation suppresses Th1 polarization in response to *Helicobacter pylori*. *J Immunol*. 2003;171(8):3913-7.

MORAHAN, M.G. Peripheral T cell tolerance. *Annu. Review of Immun.* 1992 Apr. 10: 51-69.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A. & COFFMAN, R.L. Two types of murine T cell clone. I. Definition according profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 1986 136: 2348-2357.

PULENDRAN B. Modulating TH1/TH2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors. *Immunol Res.* 2004;29:187-96.

QIU, H.; WANG, D.; XIAO, J.; LUO, H.; CHEN, H. & XUE, Z. Circadian rhythm of blood pressure in renovascular hypertensive goats treated with captopril. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 1992 Jun; 23(2):174-177.

ROMAGNANI, S. T cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000 Jul; 85 (1): 9-18; quiz 18, 21.

RUILOPE, L.M. & COCA, A. The role of combination therapy in the treatment of hypertension. *Blood Press Suppl.* 1998; 1: 22-6.

SAKAGUCHI, S. Naturally Arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Ann. Review of Immun.* 2004 Apr. 22: 531 -562.

SALVETTI, M.; RISTORI, G.; BUTTINELLI, C.; FIORI, P.; FALCONE, M.; BRITTON, W.; ADAMS, E.; PAONE, G.; GRASSO, M.G. & POZZILLI, C. The immune response to mycobacterial 70-kDa heat shock proteins frequently involves autoreactive T cells and is quantitatively dysregulated in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 1996 Apr;65(2):143-53.

SCHAGGER H, VON JAGOW G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. *Anal Biochem.* 1987 Nov 1;166(2):368-79.

SCHLOOT, N.C.; ROEP, B.O.; WEGMAN, D.R.; YEU, L.O.; WANG, T.B. & EISENBARTH, G.S., T cell reactivity to GAD 65 peptide sequences, shared with coxsackie virus protein in recent onset IDDM, post onset IDDM patients and control subjects. *Dibetologia* 1997. 40: 332-338.

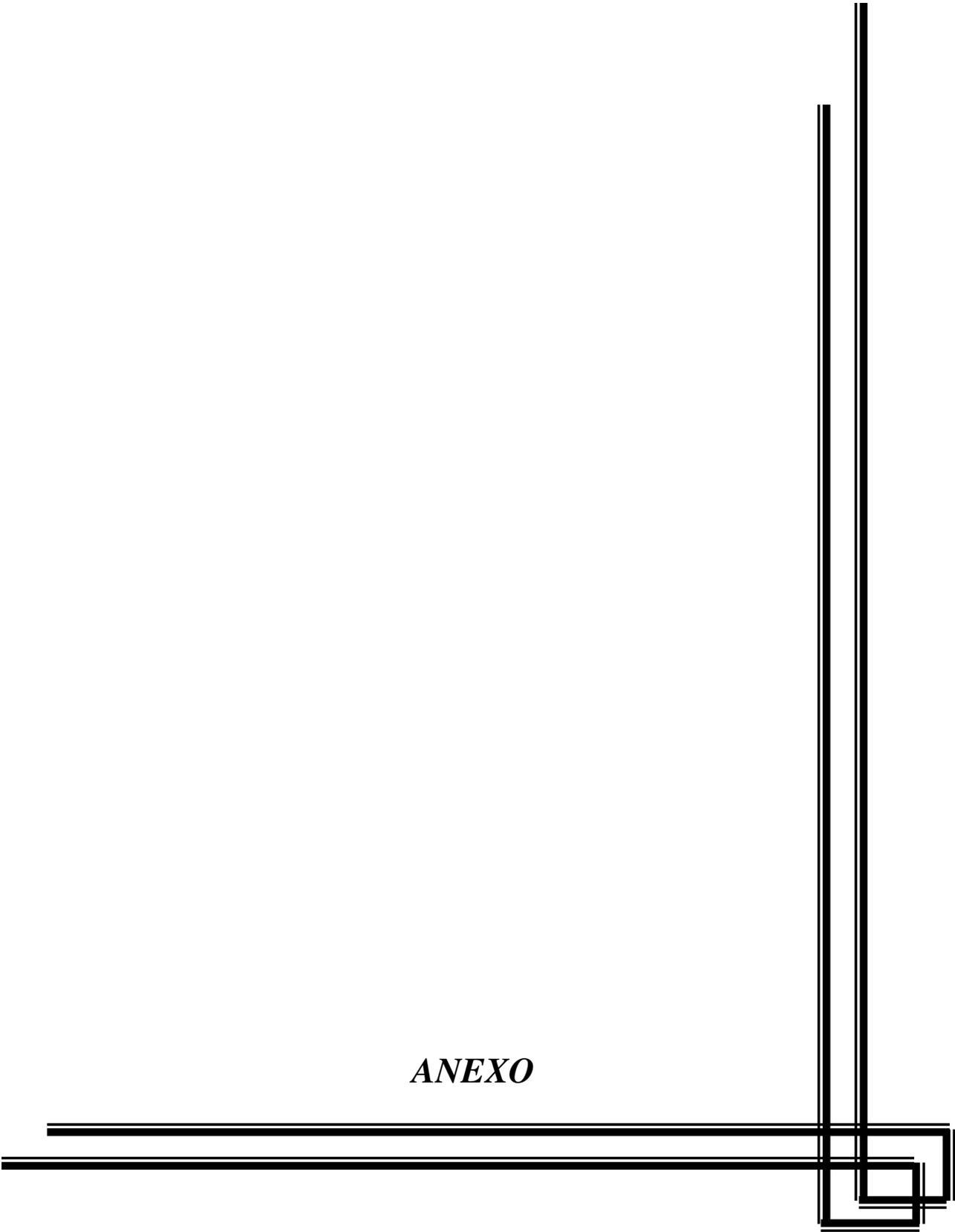
- SCHWARTZ, R.H. T Cell Anergy. *Ann. Review of Immun.* 2003 Apr; 21: 305-334.
- SHIN, H.C.; MCFARLANE, E.F.; POLLARD, J.D. & WATSON E.G. Induction of experimental allergic neuritis with synthetic peptides from myelin P2 protein. *Neurosci Lett.* 1989. Jul 31;102 (2-3): 309-12.
- SLOTTA, K.H. & PRIMOSIGH, J. Amino-acid composition of crotoxin. *Nature.* 1951 Oct 20; 168 (4277): 696-7.
- SWANBORG, R.H. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T-cell immunology and autoreactivity. *Immunol Rev.* 2001 Dec; 184:129-35. Review.
- SZABO SJ, SULLIVAN BM, PENG SL, GLIMCHER LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:713-58.
- TARKOWSKI, A.; CARLSTEN, H.; HERLITZ, H. & WESTBERG, G. Differential effects of captopril and enalapril, two angiotensin converting enzyme inhibitors, on immune reactivity in experimental lupus disease. *Agents Actions.* 1990 Aug; 31 (1-2): 96-101.
- VARELA, F.J. & COUTINHO, A. Second generation immune networks. *Immunol Today.* 1991 May; 12(5):159-66. Review.
- VRIESENDORP, F.J.; FLYNN, R.E.; MALONE, M.R. & PAPPOLLA, M.A. Systemic complement depletion reduces inflammation and demyelination in adoptive transfer experimental allergic neuritis. *Acta Neuropathol (Berl).* 1998 Mar; 95(3):297-301.
- WAKSMAN, B.H. & ADAMS, R.D. Allergic neuritis: an experimental disease of rabbits induced by the injection of peripheral nervous tissue and adjuvants. *J. Exp. Med.* 1955; 102. 213-236.
- WHITAKER, J.N. The antigenic reactivity of small fragments derived from human myelin basic protein peptide 43-88. *J Immunol.* 1982 Dec; 129 (6): 2729-2733.
- WUCHERPFENNIG, K.W. & STROMINGER, J.L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: Viral peptides activate human T cell clones specific for Myelin Basic Protein. *Cell* 1995. 80: 695-705.

ZHU, J.; BAI, X.F.; MIX, E. & LINK, H. Experimental allergic neuritis: cytolysin mRNA expression is upregulated in lymph node cells during convalescence. *J Neuroimmunol.* 1997 Sep;78 (1-2):108-116.

ZHU, J.; MIX, E.; BENGTSSON, B.O. & LINK, H. The effects of monoamine reuptake inhibiting antidepressants in experimental allergic neuritis. *J Peripher Nerv Syst.* 1997;2 (1):30-42. Review.

ZHU, J.; PELIDOU, S.H.; DERETZI, G.; LEVI, M.; MIX, E.; VAN DER MEIDE, P.; WINBLAD, B. & ZOU, L.P. P0 glycoprotein peptides 56-71 and 180-199 dose-dependently induce acute and chronic experimental autoimmune neuritis in Lewis rats associated with epitope spreading. *J Neuroimmunol.* 2001 Mar 1;114(1-2):99-106. Erratum in: *J Neuroimmunol* 2001 Sep 3;119(1):150.

ANEXO



Effect of treatment with Crotopotin on clinical evolution of Experimental Autoimmune Neuritis

Fabiano R. Castro¹, Patricia L. F. Proença¹, Cristiane de La Hoz², Alessandro S. Farias¹, Francesco Langone², Marcos H. Toyama³, Sergio Marangoni³ and Leonilda M.B. Santos^{1,*}

¹ Neuroimmunology Unit, Department of Microbiology and Immunology, University of Campinas, UNICAMP, Campinas, SP Brazil

² Department Physiology, University of Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

³ Department Biochemistry University of Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

* Address for correspondence: Leonilda M.B.Santos Ph.D. Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biologia- UNICAMP- Campinas – SP – Brazil- CEP 13083-970-

Tel.:+55-19-3788-6263; Fax: 55-19-3788-6276 – E mail: leonilda@unicamp.br

Co-authors:

2- Departamento de Fisiologia – Instituto de Biologia – UNICAMP – Campinas – Brazil – CEP 13083-970.

3- Departamento de Bioquímica – Instituto de Biologia – UNICAMP – Campinas – Brazil – CEP 13083-970.

ABSTRACT

Biomedical research in which venom components are being investigated for their potential as novel therapeutic agents has emerged as an interesting option. Crotopotin which is a fraction of the venom of the rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, has been described as an antiinflammatory that acts on the innate arm of the immune response. Here we have demonstrated that intraperitoneal (IP), as well as oral administration of crotopotin significantly reduces the severity of experimental autoimmune neuritis (EAN), an experimental model for Guillain-Barré Syndrome. The reduction of the severity of the disease is associated with a reduction in the mononuclear cells infiltrating in the sciatic nerve and a significant decrease in the lymphocyte proliferative response to neuritogenic peptide.

Key words: demyelination; T cell activation; Experimental autoimmune neuritis; Guillain-Barré syndrome;

Running title: Crotopotin modify the severity of EAN

1. INTRODUCTION

Experimental autoimmune neuritis (EAN) is an animal model that in many aspects resembles an inflammatory demyelinating polyradiculitis known as Guillain-Barré syndrome (GBS) (Hahn,1996 ; Toyka, 1999). EAN is a sub-acute, monophasic, reversible polyneuropathy that can be experimentally induced by immunization of genetically susceptible rats with peripheral nerve tissue in complete adjuvant or with peripheral nerve components such as P0 or P2 peptides (Zou et al.,2000 ; Cavaletti et al., 2000).

In the area of venomology, the envenomation syndromes are the focus of therapeutic strategies, however biomedical research investigating venom components for their potential as novel therapeutic agents is an interesting alternative viewpoint (Lewis and Garcia 2003). An approach using snake venom as a possible therapeutic agent has been described for many pathologic conditions including neoplasms (Yeh et al., 2001; Kang et al., 1999) and transplantation (Taniguchi et al., 1996). Moreover, toxins have also been used to modify the clinical evolution of diseases of the nervous system, such as experimental autoimmune encephalomyelitis (Hinman et al., 1999) and reduce sciatic nerve damage (LIXB et al., 1999).

The venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (cdt) is a mixture of many proteins containing crotoxin (ctx), which represents the major neurotoxic component of the venom. The crotoxin molecule is composed of two subunits, a basic weakly toxic phospholipase A2 (PLA2) and crotapotin (Hendon, 1971).

Crotapotin is an acidic and non-toxic subunit of crotoxin, which has been reported to possess an *in vivo* anti-inflammatory activity, as demonstrated by the inhibition of carrageenin-induced rat paw edema (Cardoso et al., 2001; Landucci et al., 1995; Landucci et al., 2000). We have demonstrated that part of this anti-inflammatory effect is due to an increase in the production of prostaglandin E2 by the macrophages stimulated by this fraction of venom (Garcia et al., 2003).

The present study was designed to show the effect of the administration of crotapotin on the clinical evolution of EAN, as well as on the lymphocyte proliferative response.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

Six to eight-week old female Lewis rats were obtained from the Harlan Sprague Dawley Laboratory and were housed and maintained pathogen free in the university animal facility. All procedures were carried out in accordance with the guidelines proposed by the Brazilian Council on Animal Care (COBEA) and approved by the Ethical Committee on Animal Experimentation (CEEAA/UNICAMP).

2.2. Antigen

Peripheral myelin P2 (58-81) peptide (TESPFKNTEISFKLQGFEFTTADNR) was synthesized by Genemed Synthesis Inc. (San Francisco, CA-USA).

2.3 Venom

Crotalus durissus terrificus venom was provided by Instituto Butantan (São Paulo, Brazil).

2.4. Purification of Crotopotin

The crotopotin from the *Crotalus durissus terrificus* whole venom was isolated after two chromatographic procedures. In the first step, the crotoxin was purified from the whole venom; briefly, 35 mg of whole venom was dissolved in 400 microliter of ammonium bicarbonate 0.3M, homogenized and clarified by centrifugation at 4500xg for two minutes. The chromatographic column (Superdex 75, 1x60cm) was equilibrated with same buffer for 2 hours before the injection of sample. The elution of the venom compounds were carried out at constant flow rate of 0.2 ml/min and chromatographic run was monitored at 280nm. The purification of crotopotin was done with a reverse phase HPLC (0.1x 30cm column of μ -Bondapack C18, Waters) using a linear gradient 0-100% of acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid (v/v). Briefly, five milligrams of crotoxin fraction from the *Crotalus durissus terrificus* whole venom was dissolved in 250 μ l of buffer A,

centrifuged at 4500xg for 2 minutes, and the supernatant was applied on the analytical reverse phase HPLC, previously equilibrated with buffer A (0.1% trifluoroacetic acid (TFA) for 15 minutes. The elutions of the proteins were conducted using a linear gradient of buffer B (66.6% Acetonitrile in buffer A) and the chromatographic run was monitored at 214 nm of absorbance. After elution, the fractions were lyophilized and stored at -40°C. A discontinuous gel (Tricine SDS-PAGE) was used for evaluation of the purity degree of crotopotin, as well as for estimation of molecular mass of the protein (Schagger, 1987).

2.5. Crotopotin treatment regimen

A variety of doses of crotopotin were tested and the highest dose that gave a decrease in P2 peptide-induced EAN without mortality was chosen. The rats received 10 µg/rat via IP and 25 µg/rat via oral route, five times, distributed from three days after immunization until the development of clinical signs of EAN.

2.6. Immunization and induction of EAN

Lewis rats were immunized with peripheral myelin P2 (58-81) peptide (Jung et al., 2001), with each animal receiving an injection of 50 µg peptide in 0.10 ml of Complete Freund's Adjuvant (CFA) containing 4 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. Clinical expression was graded on a clinical index scale of 0 to 5 as follows: Grade 1- limp tail; Grade 2- hind-limb weakness; Grade 3- plegia of both hind limbs; Grade 4- plegia of three or four limbs; Grade 5- moribund.

2.7. Histological evaluation of disease

Sciatic nerve were excised, fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Sections were stained with hematoxylin-eosin and examined by light microscopy. Each section was examined blinded for evidence of mononuclear cellular infiltration.

2.8. Proliferation assay

Lymph node cells were teased into single-cell suspensions in Hanks' balanced salt solution (HBSS), washed, and suspended in RPMI 1640 medium supplemented with 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, penicillin-streptomycin (Flow lab.-USA), 12.5 mM HEPES buffer (pH=7.4), 0.2% NaHCO_3 , and 4% fetal bovine serum (Hyclone laboratories, Okla- USA). The cells were cultured, 10^5 per well, in 96 well flat-bottom culture plates in the presence of two different concentrations of the P2 peptide (1 $\mu\text{g/ml}$ and 5 $\mu\text{g/ml}$) and nonspecific mitogen Con A (2.5 $\mu\text{g/ml}$). Cells were incubated for 144 h with neuritogenic peptide and 72 h with Con A, in an humidified, 5% CO_2 atmosphere at 37°C , pulsed with 1.0 Ci of ^3H Thymidine per well, and harvested 18 hours later with a cell harvester. The incorporation of ^3H thymidine was assessed by standard liquid scintillation techniques.

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Mann-Whitney U-test and a two-tailed Wilcoxon rank sum test. A *p* value smaller than 0.05 was taken as significant.

3. RESULTS

3.1. Purification of *Crotalus durissus terrificus* venom by RP-HPLC

The crotopotin was purified at high molecular degree after two chromatographic procedures. The whole crotoxin was obtained using the molecular exclusion HPLC (Figure 1a). This fraction showed a moderate PLA_2 activity in presence of adequate substrate according to the method previously described (Toyama et al., 2003). After free drying, crotoxin was subjected to reverse phase HPLC chromatography that resulted in crotopotin isoforms F5 and F7 that correspond to the main crotopotin fraction (Figure 1b). This protein appears as one protein band with molecular mass of 9 kDa (Figure 1c). The positive identification of crotopotin was confirmed by ability of this protein to inhibit the enzymatic activity of isolated PLA_2 (Figure 1c).

3.2. Effect of *in vivo* treatment with crotopotin on EAN evolution

The effect of the administration of *crotopotin* on the course of EAN was evaluated. The venom fraction and the protein control ovalbumin (OVA) were administered IP daily, in 5 doses of 10 µg/each, the first applied 3 days after immunization with P2 peptide/CFA. The venom fraction was also administered in 5 doses of 25 µg/rat, via oral route. Four groups of 10 rats were used. The clinical scores of the untreated control ($3.4.0 \pm 0.4$) and protein control (3.0 ± 0.3) were significantly greater ($p < 0.001$) than those of rats in the groups treated with crotopotin given IP (1.6 ± 0.40) and (1.1 ± 0.3) via oral route. (Figure 2). No significant difference was observed between the untreated group and that treated with OVA ($p > 0.05$).

3.3. Histopathological findings:

Histopathological examination revealed infiltrations of inflammatory cells into the sciatic nerve in the group immunized with P2 peptide without treatment, or treated with irrelevant protein ovalbumin (OVA), while fewer inflammatory cells infiltrated in the group treated with crotopotin either by IP or oral routes (Figure 3).

3.4. Effect of treatment on proliferative response

The Lewis rats were immunized with P2 peptide/CFA and treated with crotopotin as described above. Fourteen days after immunization, the lymph nodes were stimulated *in vitro* with the P2 peptide (0.5 µg/ml and 5 µg/ml) as well as with nonspecific mitogen (Con A). The results showed that the treatment with Crotopotin reduced the lymphocyte proliferative response of the rats treated either orally or by intraperitoneal route starting three days after immunization. The *in vivo* administration of crotopotin induced depression of proliferative response of lymphocytes from rats (8 in each group) with a significant reduction ($p < 0.001$) observed when cells were stimulated with 5 µg/ml of P2 peptide (14860 ± 3620 cpm and 24360 ± 4324 cpm versus 48240 ± 5420 cpm and 44630 ± 6100 cpm) for the treated rats orally and IP, untreated animals and treated with OVA respectively. Similar suppressive proliferative response was also observed when the cells

were stimulated with the neuritogenic peptide in the concentration of 0.5 µg/ml (12643±4320 cpm, 22639±4356 cpm versus 36435±6789 cpm, 31254±5324 cpm) for orally treated, IP, untreated rats and treated with OVA.

The *in vivo* administration of crotopotin also reduced significantly ($p < 0.001$) the proliferative response of lymphocytes stimulated with 2.5 µg/ml of Con A (27620± 3730 cpm, 68124 ±7400 versus 98340 ±12420 cpm and 96840± 11740 cpm) for animals orally treated, IP treated, untreated and treated with OVA respectively.

4. DISCUSSION

The present study demonstrates that the administration of crotopotin, a fraction of the venom of the *Crotalus durissus terrificus* reduces the severity of EAN, with part of this protective effect due to a reduction of the proliferative response of autoreactive T lymphocytes.

EAN is basically initiated by a cell-mediated immune reaction, since the adoptive transfer of lymphocytes from a P2-immunized rat to a naive recipient causes EAN (Maurer, 2002). We have confirmed the importance of the participation of lymphocytes by demonstrating that the tissue damage in EAN is characterized by intense endoneurial infiltration of mononuclear cells accompanied by significant nerve lesions.

Treatment with crotopotin either by IP or oral routes leads to a significant reduction in the severity of disease associated with a reduction in inflammatory infiltration by mononuclear cells. The effect of snake venom components on the nervous system diseases has previously been described. A nontoxic iodoacetamide-modified derivative of snake toxin was found to induce resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in the guinea pig model (Hinman et al., 1999). Moreover, a nerve growth factor isolated and purified from the venom of *Naja naja atra* reduced the degeneration of nerve fibers and enhanced peripheral nerve regeneration and the consequent functional recovery from injury (LIXB et al., 1999).

The early effects of injection of the crotopotin suggest the activation of the innate arm of the immune response, especially to activation of monocytes/macrophages (Cardoso et al., 2001; Landucci et al., 1995; Landucci et al., 2000). It is now well established that the innate immune response controls the subsequent adaptative immune response by acting on the selection of lymphocytes bearing antigen receptors and ensures that lymphocytes specific for determinate antigen are activated and clonally expanded. Studies have revealed a dichotomy of CD4 T cell responses as either T helper (Th1) with IFN γ and IL2 production or T helper 2 (TH2) with IL4 and IL5 production, with early cytokines of the innate immune response capable of promoting the subset of adaptive response (Maurer, 2002). Early IL-12 expression on macrophages or the production of IFN γ by NK cells promotes CD4 Th1 type responses (Szabo et al., 2003), while the presence of anti-inflammatory cytokines such as TGF β and IL10 can shut down a Th1 response (Pulendran, 2004; Chen et al., 1994).

We have demonstrated that crotopotin suppresses the lymphocytes transformation after *in vivo* oral or IP administration. In a previous report, we also showed a significant increase in PGE2 production in the supernatant of a culture of purified macrophages after *in vitro* stimulation with crotopotin (Garcia et al., 2003). The PGE2 itself is a potent suppressor of the proliferative response of lymphocytes and inhibits the production of Th1 cytokines (Meyer et al., 2003; Kuroda, 2003). In the EAE model, an increase in of the production of PGE2 in the nervous tissue is associated with the recovery phase of the disease (Khoury et al., 1992). Since both EAE and EAN are caused by Th1 type lymphocytes (Lider et al., 1989; Stoll et al., 2004), any approach reducing the functioning of these cells may result in a reduction in the severity of the disease.

Although further studies on the mechanisms involved in the effects of crotopotin in the adaptative immune response are necessary, we present evidence that this fraction of snake venom acts as an antinflammatory agent, reducing the proliferative response of autoreactive T lymphocytes and consequently reducing the damage of autoimmune reactions in EAN. These findings may indicate a novel avenue for neuronal protection in GBS and other inflammatory demyelinating neuropathies.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge the financial support by FAPESP (grant # 01/12827); CNPq grant # 300375/84-87 and FAEP-UNICAMP. They also acknowledge the collaboration of Linda Gentry El-Dash in the linguistic revision of the manuscript and would like to thank Gislaine C.L. Brito for provision of technical assistance.

APPENDIX

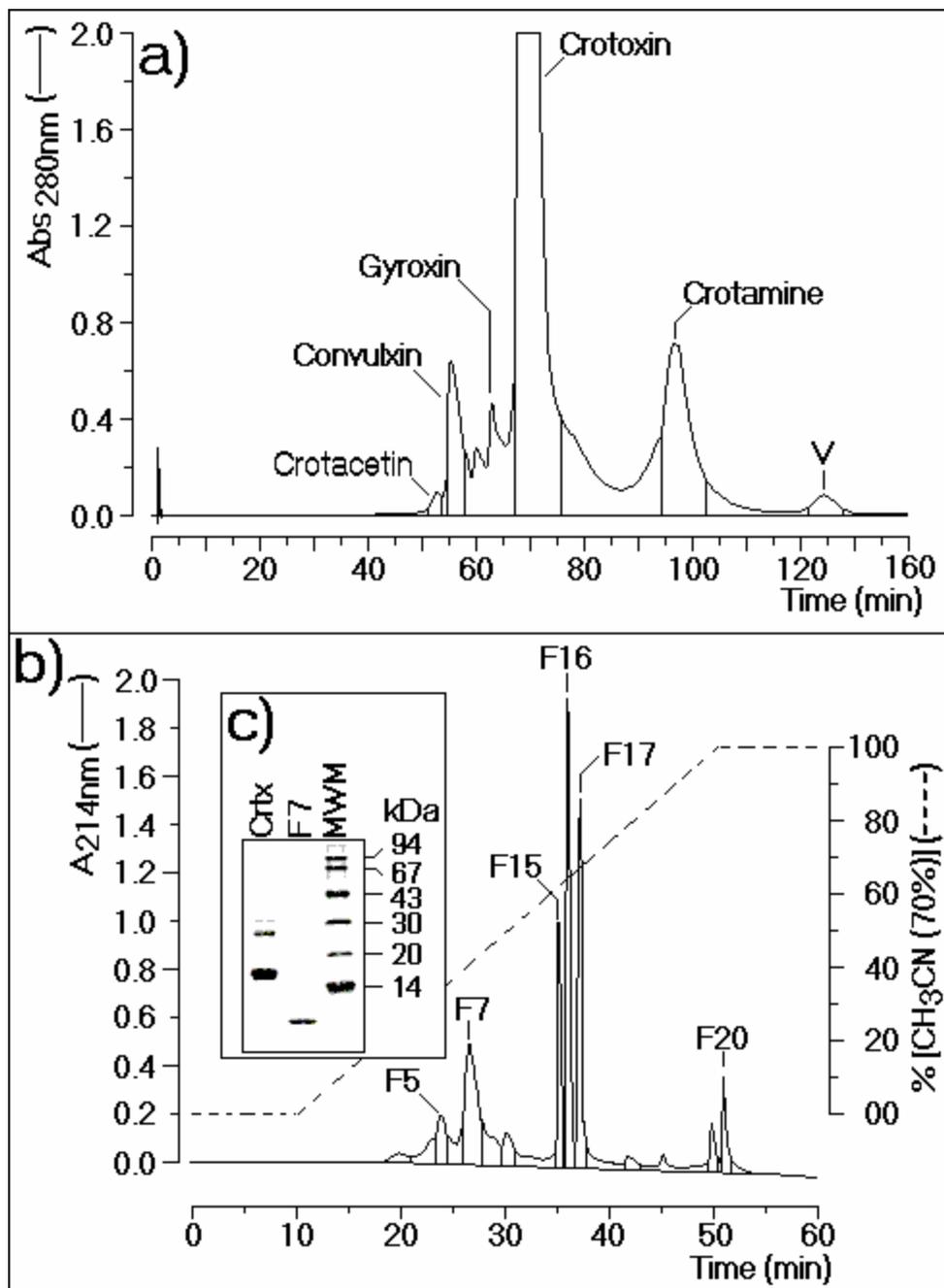


Figure 1

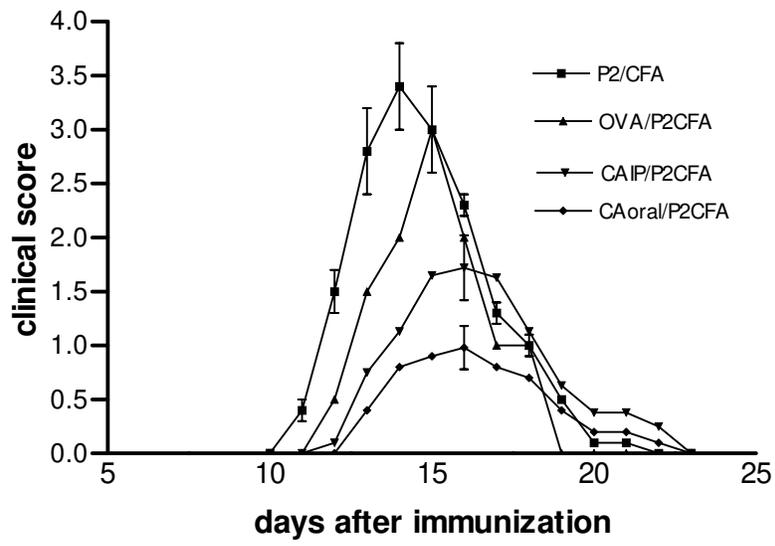


Figure 2.

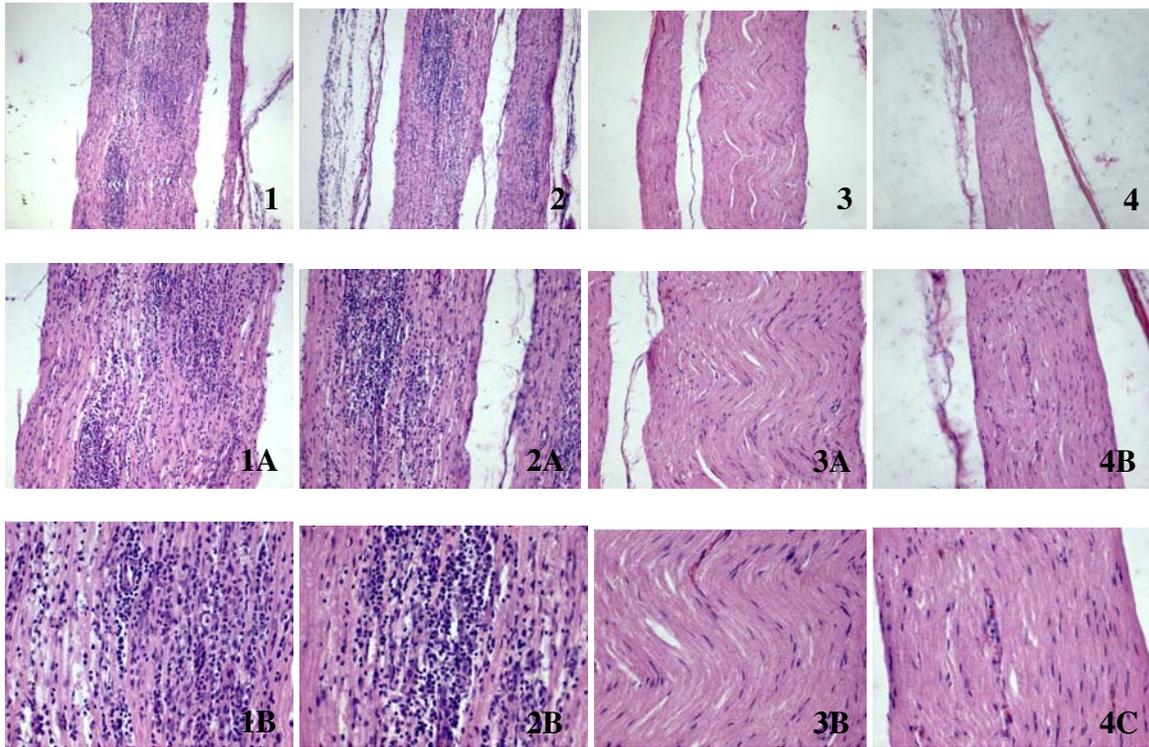


Figure 3

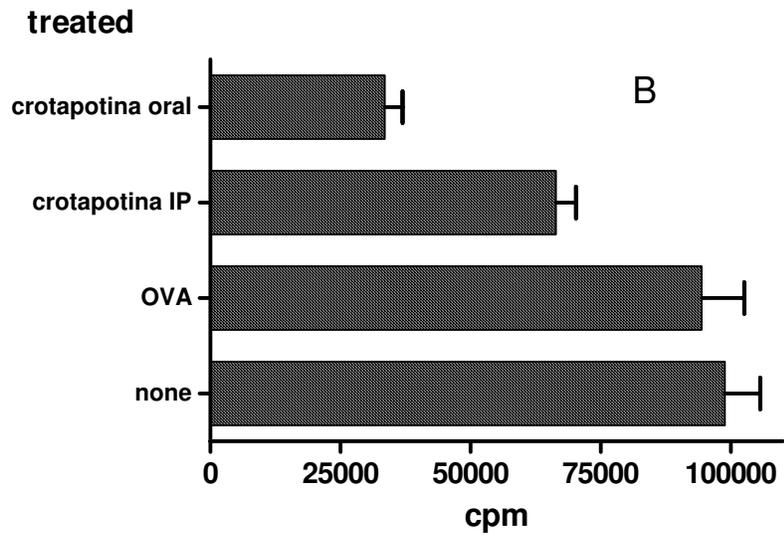
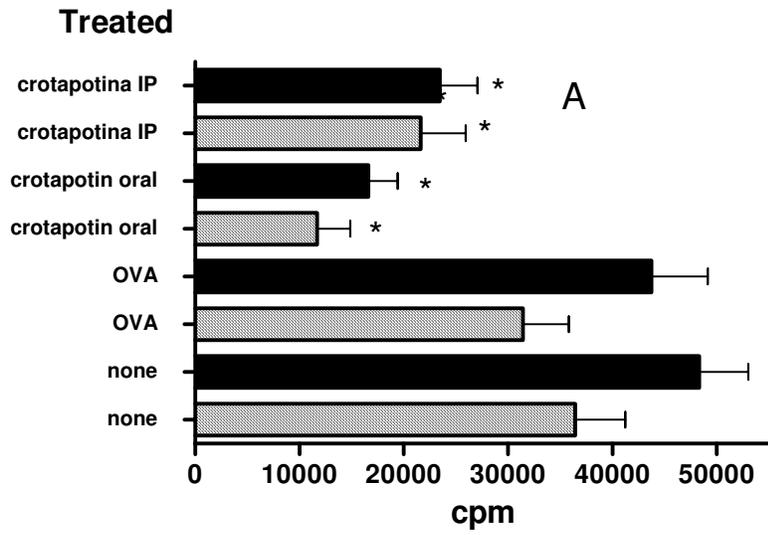


Figure 4

REFERENCES

- Cardoso DF, Lopes-Ferreira M, Faquim-Mauro EL, Macedo MS, Farsky SH. Role of crotoxin, a phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. *Mediators Inflamm.* 2001 Jun; 10(3): 125-33.
- Cavaletti G, Mata S, Fasano A, Lolli F, Riccio P, Celon S, Marmiroli P, Tredici G. Lipid-free versus lipid-bound P2 protein-induced experimental allergic neuritis: clinicopathological, neurophysiological and immunological study. *J. Neurosci Res.* 2000 Dec 1;62(5):709-16.
- Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 1994 Aug 26; 265(5176): 1237-40.
- Garcia F, Toyama M, Castro FR, Proença PL, Marangoni S, Santos LM. Crotoxin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE2 synthesis. *Toxicon.* 2003 Sep 15;42(4): 433-7.
- Hahn AF. Experimental allergic neuritis (EAN) as a model for the immune-mediated demyelinating neuropathies. *Rev Neurol (Paris).* 1996 May; 152(5):328-32. Review.
- Hendon RA, Fraenkel-Conrat H. Biological Roles of the two Components of Crotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1971 Jul; 68(7) 1560-3.
- Hinman CL, Stevens-Truss R, Schwarz C, Hudson RA. Sequence determinants of modified cobra venom neurotoxin which induce immune resistance to experimental allergic encephalomyelitis: molecular mechanisms for immunologic action. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1999 Aug; 21(3)483-506.
- Jung S, Gaupp S, Hartung HP, Toyka KV. Oral tolerance in experimental autoimmune neuritis (EAN) of the Lewis rat. II. Adjuvant effects and bystander suppression in P2 peptide-induced EAN. *J Neuroimmunol.* 2001 May 1;116(1):21-8.
- Kang IC, Lee YD, Kim DS. A novel disintegrin salmosin inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 1999 Aug 1;59(15):3754-60.

- Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med.* 1992 Nov 1;176(5):1355-64.
- Kuroda E, Yamashita U. Mechanisms of enhanced macrophage-mediated prostaglandin E2 production and its suppressive role in Th1 activation in Th2-dominant BALB/c mice. *J Immunol.* 2003 Jan 15;170(2):757-64.
- Landucci EC, Antunes E, Donato JL, Faro R, Hyslop S, Marangoni S, Oliveira B, Cirino G, de Nucci G. Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotopotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. *Br J Pharmacol.* 1995 Feb;114(3):578-83.
- Landucci EC, Toyama M, Marangoni S, Oliveira B, Cirino G, Antunes E, de Nucci G. Effect of crotopotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A2. *Toxicon.* 2000 Feb;38(2):199-208.
- Lewis RJ, Garcia ML. Therapeutic potential of venom peptides. *Nat Rev Drug Discov.* 2003 Oct;2(10):790-802.
- Lider O, Santos LM, Lee CS, Higgins PJ, Weiner HL. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. II. Suppression of disease and in vitro immune responses is mediated by antigen-specific CD8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 1989 Feb 1;142(3):748-52.
- LIXB, Chen MJ, Lei DQ, Yang B, Liao GS, Shu YY, Tang SX. Bioactivities of nerve growth factor from Chinese cobra venom. *J Nat Toxins.* 1999 Oct;8(3):359-62.
- Maurer M, Toyka KV, Gold R. Cellular immunity in inflammatory autoimmune neuropathies. *Rev Neurol (Paris).* 2002 Dec;158(123):7-15. Review.
- Meyer F, Ramanujam KS, Gobert AP, James SP, Wilson KT. Cutting edge: cyclooxygenase-2 activation suppresses Th1 polarization in response to *Helicobacter pylori*. *J Immunol.* 2003 Oct 15;171(8):3913-7.

- Pulendran B. Modulating TH1/TH2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors. *Immunol Res.* 2004;29(1-3):187-96. Review.
- Schagger H, Von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 Kda. *Anal Biochem.* 1987 Nov 1;166(2): 368-379.
- Stoll G, Wesemeier C, Gold R, Solymosi L, Toyka KV, Bendszus M. *In vivo* monitoring of macrophage infiltration in experimental autoimmune neuritis by magnetic resonance imaging. *J Neuroimmunol.* 2004 Apr; 149(1-2):142-6.
- Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:713-58. Epub 2001 Dec 19 Review.
- Taniguchi S, Kobayashi T, Neethling FA, Ye Y, Niekrasz M, White DJ, Cooper DK. Cobra venom factor stimulates anti-alpha-galactose antibody production in baboons. Implications for pig-to-human xenotransplantation. *Transplantation.* 1996 Sep 15;62(5): 678-81.
- Toyama MH, de Oliveira DG, Beriam LO, Novello JC, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S. Structural enzymatic and biological properties of new PLA(2) isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon* 2003 Jun; 41(8): 1033-8.
- Toyka KV. 1999 Eighty-three years of the Guillain-Barre syndrome: clinical and immunopathologic aspects, current and future treatments. *Rev. Neurol. (Paris).* 1999 Oct; 155(10):849-56. Review.
- Yeh CH, Peng HC, Yang RS, Huang TF. Rhodostomin, a snake venom disintegrin, inhibits angiogenesis elicited by basic fibroblast growth factor and suppresses tumor growth by a selective alpha(v)beta (3) blockade of endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* 2001 May; 59(5):1333-42.
- Zou LP, Ljunggren HG, Levi M, Nenmesmo I, Wahren B, Mix E, Winblad B, Schalling M, Zhu J. P0 protein peptide 180-199 together with pertussis toxin induces experimental autoimmune neuritis in resistant C57Bl/6 mice. *J. Neurosci. Res.* 2000 Dec 1;62(5):717-21.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Fig. 1a. Molecular size chromatography of whole venom subjected on the Superdex 75 column that give six main fractions names as croacetin, giroxin, crotoxin and crotramine. After the chromatographic elution, Crotoxin fraction was subjected to new chromatography in the reverse phase HPLC. In this chromatographic condition, several peaks names as F5, F7 (crotopotin isoforms) and F15, F16 and F17 (PLA2 isoforms) were obtained. The F7 accounts for approximately 72% of whole crotopotins isoforms (Fig. 1b) and its molecular mass was estimated at 9 kDa (Fig. 1c).

Figure 2. Clinical scores of EAN in Lewis rats treated *in vivo* with crotopotin. Treatment with crotopotin/rat in five doses (10 µg/rat IP and 25 µg/rat via oral) was initiated on day 3 followed by immunization with P2 peptide /CFA on day 0. Ovalbumin (OVA) was administered under the same conditions.

Figure 3. Histological examination of the sciatic nerve of rats immunized with P2 peptide alone (1,1A and 1B) or after treatment with OVA (2,2A and 2B) crotopotin IP (3,3A and 3B) and crotopotin oral (4,4A and 4B) counterstained with hematoxylin. The nerves from immunized rat alone were indistinguishable from nerves from animals treated with irrelevant protein (OVA). Few inflammatory cells infiltrated were observed in crotopotin-treated animals.

Figure 4. Effect of administration of crotopotin and irrelevant protein (OVA) on proliferative response of lymph nodes cells stimulated with P2 peptide. Lewis rats treated with crotopotin or irrelevant protein (OVA) *in vivo* were immunized with P2 peptide in complete Freund adjuvant (CFA); lymph nodes cells were removed at the peak of the disease, cultured and stimulated *in vitro* with P2 peptide in the concentrations of 0.5 µg/ml (dashed column) and 5 µg/ml (black column) (Figure 4A). The mononuclear cells were also stimulated with nonspecific mitogen (Con A 2.5 µg/ml) (Figure 4B).