

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS BOTUCATU

**ESTUDO DA AÇÃO MODULATÓRIA DA CROTOXINA NA
EVOLUÇÃO DA COLITE ULCERATIVA EXPERIMENTAL**

RAQUEL GUEDES DE OLIVEIRA BRITO

BOTUCATU

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

RAQUEL GUEDES DE OLIVEIRA BRITO

**ESTUDO DA AÇÃO MODULATÓRIA DA CROTOXINA NA
EVOLUÇÃO DA COLITE ULCERATIVA EXPERIMENTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências, Campus de
Botucatu, UNESP, para obtenção de Bacharel
em Ciências Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Sforcin

Coorientador: Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho

BOTUCATU - SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Brito, Raquel Guedes de Oliveira.

Estudo da ação modulatória da crotoxina na evolução da colite ulcerativa experimental / Raquel Guedes de Oliveira Brito. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Maurício Sforcin

Coorientador: Orlando Garcia Ribeiro Filho

Capes: 21103003

1. Crotoxina. 2. Colite ulcerativa. 3. Sulfato de Dextrana. 4. Colon (Anatomia) - Doenças. 5. Inflamação.

Palavras-chave: Colite ulcerativa; Crotoxina; Sulfato sódico de dextrana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a meus pais, Edimar Guedes de Oliveira Brito e David Ferreira de Brito por sempre me incentivarem e acreditarem em mim. Não conseguiria concluir essa jornada sem vocês.

Agradeço aos pesquisadores, colaboradores e amigas do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan que me acompanharam e me ensinaram durante essa jornada, em especial o Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho e a Me. Fernanda Narangeira.

Agradeço ao Instituto de Biociências de Botucatu por proporcionar a melhor experiência e aprendizado durante toda a graduação, em especial o Prof. Dr. José Maurício Sforcin, Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas e o Me. Jorge Willian Franco de Barros.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio e financiamento para a realização da pesquisa (processo: 2022/02512-8). Obrigada por acreditar em jovens cientistas.

RESUMO

A colite ulcerativa (UC) é considerada uma doença inflamatória caracterizada por processo crônico de lesão da mucosa do cólon e está associada ao modo de vida ocidentalizado moderno e alguns fatores de risco ligados ao ambiente. Como não há tratamento eficaz, busca-se novas abordagens de tratamento como o uso de toxinas, entre elas a crotoxina (CTX), principal componente do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) que apresenta ação imunomodulatória. Estudos prévios demonstraram que o método mais indicado para induzir quimicamente a UC é por meio da ingestão de sulfato sódico de dextrana (DSS) por animais suscetíveis. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação modulatória da crotoxina administrada por via oral (gavagem) na evolução da UC experimental. Para isso, foram utilizados camundongos selecionados fenotipicamente para alta resposta inflamatória aguda (AIRmax) ao Biogel que ao ingerirem DSS são suscetíveis ao desenvolvimento de UC. Com isso, esses animais foram divididos em 6 grupos experimentais (n = 3-5/ grupo) sendo esses: água (A), CTX 37,5 µg/ Kg - 1x (C1), CTX 37,5 µg/ Kg - 2x (C2), DSS 2,5% (D), DSS 2,5% + CTX 37,5 µg/ Kg - 1x (DC1) e DSS 2,5% + CTX 37,5 µg/ Kg - 2x (DC2). Os grupos receberam água filtrada ou DSS para ingestão durante 7 dias e foram submetidos aos mesmos procedimentos. O estudo constituiu na determinação da DL50 oral da crotoxina, análise do índice de atividade da doença (IAD), análise da imunofenotipagem, determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) e análise histológica do cólon visando a identificação de alvos terapêuticos para o controle desta patologia.

Palavras-chave: Crotoxina, colite ulcerativa, Sulfato de Dextrana, cólon e inflamação.

ABSTRACT

Ulcerative colitis (UC) is considered an inflammatory disease characterized by a chronic process of colonic mucosal damage and is associated with the modern Westernized lifestyle and some risk factors linked to the environment. As there is no effective treatment, scientists are searching for new treatment approaches such as the use of toxins, including crotoxin (CTX), the main component of *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) venom, which has immunomodulatory action. Previous studies have shown that the most indicated method for chemically inducing UC is by ingesting sodium sulfate of dextran (DSS) by susceptible animals. Thus, the objective of this work was to evaluate the modulatory action of oral-administered crotoxin in the evolution of experimental UC. For this, phenotypically selected mice for high acute inflammatory response (AIRmax) to Biogel were used in order to develop UC in susceptible animals when ingesting DSS. Thus, these animals were divided into 6 experimental groups (n = 3-5/ group) and these were: water (A), CTX 37,5 µg/ Kg - 1x (C1), CTX 37,5 µg/ Kg - 2x (C2), DSS 2,5% (D), DSS 2,5% + CTX 37,5 µg/ Kg - 1x (DC1) e DSS 2,5% + CTX 37,5 µg/ Kg - 2x (DC2). The groups received filtered water or DSS for ingestion for 7 days and underwent the same procedures. The study consisted in the determination of oral median lethal dose of crotoxin, analysis of disease activity index (IAD), immunophenotyping analysis, determination of myeloperoxidase activity (MPO) and histological analysis of the colon aiming at the identification of therapeutic targets for the control of this pathology.

Keywords: Crotoxin, ulcerative colitis, sodium sulfate of dextran, colon and inflammation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVO	11
2.1. Objetivo geral	11
2.2. Objetivo específico	11
3. METODOLOGIA	12
3.1. Animais	12
3.2. Purificação da fração Crotoxina do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> (Cdt)	12
3.3. Determinação da DL50 da Crotoxina por via oral	13
3.4. Indução da colite por DSS e tratamentos com CTX 37,5 µg/ Kg	13
3.4.1. Análise fenotípica da colite	13
3.4.2. Imunofenotipagem	14
3.4.3. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	15
3.4.4. Análise histológica	15
3.5. Análise estatística	15
4. RESULTADOS	16
4.1. Purificação da fração de Crotoxina do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> (Cdt)	16
4.2. DL50	17
4.3. Indução da colite por DSS e tratamentos com CTX 37,5 µg/ Kg	17
4.3.1. Análise fenotípica da colite	17
4.3.2. Imunofenotipagem	19
4.3.3. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	20
4.3.4. Análise histológica	21
5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÃO	24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (IBD, do inglês inflammatory bowel disease) são patologias que afetam o trato gastrointestinal humano e são categorizadas em dois tipos de alterações, sendo estas, a colite ulcerativa (UC, do inglês Ulcerative Colitis) e a doença de Crohn. A UC é uma doença crônica, complexa e multifatorial de etiologia desconhecida que apresenta períodos intermitentes agravados por recaídas clínicas devido a inflamação intestinal recorrente (ASAKURA *et al.*, 2009; HOENTJEN *et al.*, 2011). Essa patologia está, em sua maioria, restrita a região do cólon e caracteriza-se clinicamente por seus episódios de diarreia sanguinolenta (hematoquezia) e sintomas associados como dores abdominais (cólica), sensação de defecação incompleta (tenesmo), urgência evacuatória e eliminação de exsudato mucopurulento nas fezes (BAUMGART; SANDBORN, 2007; DIGNASS *et al.*, 2012). As intervenções farmacológicas são paliativas e visam induzir e manter a remissão clínica e evitar recidivas. Para isso, utiliza-se corticosteróides, aminossalicilatos, imunomoduladores ou terapias direcionadas a componentes específicos da resposta imune (HOENTJEN *et al.*, 2011; SAIRENJI *et al.*, 2017). Além disso, cirurgias são indicadas a pacientes com diagnóstico de displasia ou câncer, resposta inadequada ao tratamento com fármacos e uso prolongado de medicamentos imunossupressores (BAUMGART; SANDBORN, 2007).

Em função da cronicidade da doença, problemas intestinais têm sido um desafio para os sistemas de saúde por estarem associados à morbidade e altos custos, principalmente em países com hábitos ocidentalizados e em rápido desenvolvimento socioeconômico (NG *et al.*, 2017). Além disso, por ser uma doença multifatorial, a UC é resultado da interação entre a susceptibilidade genética, resposta imunológica, antígenos da microbiota luminal e fatores ambientais. Entretanto, nenhum desses fatores por si próprios são suficientes para iniciar o desenvolvimento da doença (ANANTHAKRISHNAN, 2015; KOBAYASHI *et al.*, 2020; SARTOR, 2006).

Com o objetivo de simular um quadro de UC *in vivo*, Okayasu e colaboradores descreveram um modelo onde camundongos receberam sulfato sódico de dextrana (DSS) por via oral e desenvolveram colite aguda e crônica que se assemelha à colite ulcerativa (OKAYASU *et al.*, 1990). A partir disso, passou-se a adicionar o DSS na água ofertada aos animais visando a indução da colite. Essa indução depende da concentração, duração e frequência da oferta do DSS aos animais, sendo as doses mais adequadas de 2 a 5% de DSS por um período de 4 a 9 dias. O mecanismo de ação pelo qual o DSS induz a colite ainda não é totalmente esclarecido, porém o mais aceito é que o DSS induza alterações na barreira epitelial intestinal levando a uma alteração nas estruturas com a ruptura das criptas intestinais

e agressão às células epiteliais, aumentando a permeabilidade da barreira epitelial (CHASSAING *et al.*, 2014). Com esse afrouxamento da barreira, a microbiota intestinal entra em contato com os granulócitos presentes na mucosa adjacente levando a ocorrência de inflamação e ulceração, seguida de uma cicatrização e reparo tecidual, evidenciando assim, a importância da integridade da barreira epitelial intestinal na manutenção da homeostase e na prevenção de UC e IBD (KITAJIMA *et al.*, 1999; STROBER *et al.*, 2002).

Devido à falta de tratamentos eficazes, o uso do principal componente do veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) é apresentado como uma nova abordagem farmacológica por apresentar reação inflamatória local menos pronunciada em envenenamentos humanos e experimentais, fator a ser explorado nas IBD como a UC induzida por DSS (MALAQUE; GUTIÉRREZ, 2015). Esse componente é denominado de crotoxina (CTX) que apresenta duas subunidades: crotapotina, que não apresenta atividade catalítica, e a fosfolipase A2 (PLA2), que exerce sua função patofisiológica por meio do bloqueio da transmissão neuromuscular (BON *et al.*, 1989; CARDOSO *et al.*, 2001; FRAENKEL-CONRAT; SINGER, 1956). Utilizando-se dessas particularidades, Almeida *et al* demonstraram que a CTX apresenta efeito imunomodulador *in vivo* devido à sua capacidade de atenuar a colite induzida quimicamente por TNBS em camundongos (ALMEIDA *et al.*, 2015).

Com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade local e proteger contra as enzimas digestivas, encapsula-se a CTX na Sílica Nanoestruturada SBA-15 (de Santa Barbara Amorphous, nº 15), na proporção de 1 para 10 de forma a alcançar o intestino e ser absorvida. A SBA-15 é constituída por partículas de óxido de silício [SiO₂] com estrutura de mesoporos altamente organizadas e apresentam propriedades como: alta capacidade de adsorção/incorporação de diversas espécies orgânicas, inorgânicas e biológicas, além de notável estabilidade térmica, hidrotérmica e mecânica (FANTINI *et al.*, 2022; SCARAMUZZI *et al.*, 2016).

Para compreender os mecanismos envolvidos nas IBD, utiliza-se modelos animais apesar de não englobarem a complexidade da doença. Para isso, pesquisadores utilizam linhagens isogênicas de camundongos suscetíveis à colite ou animais geneticamente modificados em genes específicos para determinar os fatores genéticos envolvidos na UC, bem como testar novas intervenções terapêuticas (PERŠE; CERAR, 2012). Como os modelos citados não refletem fielmente uma população geneticamente heterogênea e por se tratar de uma doença multifatorial e complexa desenvolveu-se por um processo de seleção fenotípica

artificial, um modelo de camundongo para a alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) reatividade inflamatória aguda a um corpo estranho, o Biogel P100 (IBANEZ *et al.*, 1992).

As linhagens AIRmax e AIRmin foram obtidas por seleção fenotípica bidirecional a partir de uma população geneticamente heterogênea (F0) oriunda de acasalamentos equilibrados entre 8 linhagens isogênicas (Figura 1). Para selecionar os animais, foi injetado gel de poliacrilamida (Biogel), substância não imunogênica e não biodegradável, no tecido subcutâneo. A reação inflamatória produzida foi avaliada de acordo com o número total de leucócitos infiltrados e o teor de proteínas extravasadas no local. Os camundongos que apresentaram alta ou baixa reatividade inflamatória aguda foram acasalados seletivamente entre si para a produção das linhagens AIRmax e AIRmin, respectivamente. Os acasalamentos ocorreram ao longo das gerações e na 20ª geração houve o máximo de separação fenotípica entre as linhagens. Neste momento, os genes responsáveis pela regulação de máxima ou mínima resposta fixaram-se em homozigose nas respectivas linhagens, mantendo um fundo genético heterogêneo (BIOZZI *et al.*, 1998; IBANEZ *et al.*, 1992). Esse modelo animal é utilizado para o estudo de várias doenças, entre elas a UC (DI PACE *et al.*, 2006).

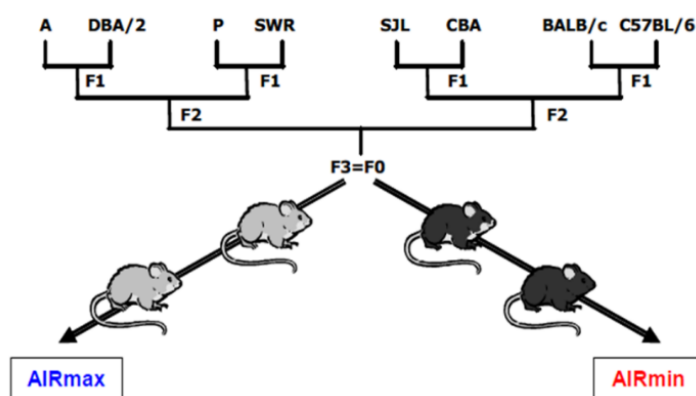


Figura 1. Seleção fenotípica bidirecional das linhagens AIRmax e AIRmin

Sabendo dos dados relacionados acima, o estudo da ação modulatória da crotoxina na evolução da colite ulcerativa experimental induzida por DSS na linhagem AIRmax se mostra de grande importância tendo em vista: o potencial farmacológico da CTX como agente modulador da imunidade, os mecanismos operantes na resistência ou sensibilidade desses animais à UC e na utilização de linhagens geneticamente heterogêneas que se comportam como uma população natural e com maior complexidade quando comparado com linhagens isogênicas.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar as ações modulatórias da CTX incorporada a sílica SBA-15 administrada por via oral (gavagem) em animais AIRmax com fenótipo de suscetibilidade à colite ulcerativa induzida quimicamente por DSS por meio do índice de atividade da doença (IAD), da imunofenotipagem, da atividade da mieloperoxidase (MPO) e da análise histológica.

2.2. Objetivo específico

Avaliar a colite após 7 dias da ingestão de DSS visando:

- os aspectos clínicos da colite experimental por meio do IAD que consiste na avaliação dos seguintes parâmetros: alteração do peso, consistência das fezes e a presença de sangue nas fezes e/ ou no ânus do camundongo;
- as populações celulares que possam estar modificadas localmente no cólon por meio da análise fenotípica por citometria de fluxo;
- a determinação da atividade de MPO como medida indireta de infiltrado inflamatório neutrofílico;
- as alterações da arquitetura do cólon decorrente do tratamento com DSS por meio de preparações histológicas focando na possível instalação de um processo inflamatório.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Camundongos da linhagem AIRmax, com idade entre 2 a 3 meses, foram mantidos no biotério de experimentação do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Os animais foram tratados com água e ração para roedores *ad libitum* e mantidos de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. CEUAIB: protocolo aprovado sob nº. 6966270422 (ID 002680).

3.2. Purificação da fração Crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt)

Para obter a fração de CTX do veneno de *Cdt* foi realizada a purificação do veneno segundo o método descrito por Bon (BON *et al.*, 1989) no Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan. Aliquotas de veneno diluídas em tampão fosfato (50 mM, pH 7) foram submetidas à cromatografia de troca aniônica em coluna MONO-Q HR 5/5 em sistema Akta-FPLC (GE Healthcare, Brasil). As proteínas adsorvidas à resina foram eluídas em gradiente linear de NaCl de 0 a 1 M, tamponado com fosfato 50 mM e as frações correspondentes à CTX foram reunidas, dialisadas contra PBS e a concentração protéica determinada pelo método de BCA.

Para a análise das amostras foi utilizado um gel de empilhamento contendo 3% de bisacrilamida/ acrilamida em Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) e 1% de SDS e um gel de separação contendo 15% de bisacrilamida/ acrilamida em Tris-HCl 2,0 M (pH 8,8) e 1% SDS. Amostras contendo de 5 a 10 µg de proteínas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8); glicerol a 10% (v/v); β-mercaptoetanol 5% (v/v); 2% de SDS e 0,001% de azul de bromofenol como corante. As soluções foram aquecidas a 100°C / 5 min e aplicadas nos poços do gel. Utilizamos o padrão molecular “Trail Mix Protein Markers” (Novagen). O tampão de corrida é constituído por solução de Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,19 M e SDS a 0,1% (pH 8,3).

A eletroforese foi realizada com uma corrente de 55 mA por 2 horas. As proteínas foram coradas por 1 horas em uma solução de 0,2% (m/v) de Coomassie Blue R-250 em água e metanol na proporção de 1:1 (v/v). O gel foi descorado com metanol 30% / ácido acético / 10% em água destilada.

3.3. Determinação da DL50 da Crotoxina por via oral

Para iniciar os estudos da modulação da CTX na colite por via oral, fez-se necessária a determinação da dose letal mediana (DL50). Para determinar a DL50, animais AIRmax e AIRmin foram divididos em 5 grupos que foram tratados com CTX incorporada à Sílica SBA-15 na proporção 1:10. As doses de 600, 300, 150, 75 e 37,5 µg/ Kg de peso corpóreo foram administradas por via oral (gavagem) em volume de 300 µL (ALMEIDA *et al.*, 2015) e os animais foram observados visando a constatação de sintomas de toxicidade.

3.4. Indução da colite por DSS e tratamentos com CTX 37,5 µg/ Kg

Os animais da linhagem AIRmax foram divididos em 6 grupos (n = 3-5 animais/grupo), sendo esses: água (A), CTX 37,5 µg/ Kg - 1x (C1), CTX 37,5 µg/ Kg - 2x (C2), DSS 2,5% (D), DSS 2,5% + CTX 37,5 µg/ Kg - 1x (DC1) e DSS 2,5% + CTX 37,5 µg/ Kg - 2x (DC2). As doses com CTX foram incorporadas à Sílica SBA-15 na proporção de 1 para 10. Os grupos tratados receberam DSS (MP Biomedical, LLC) diluído a 2,5% em água destilada em bebedouros para ingestão *ad libitum*, com análise diária da evolução da doença por meio do Índice de Atividade da Doença (IAD) durante 7 dias (DE FAZIO *et al.*, 2014). Os demais grupos receberam simultaneamente aos grupos tratados com DSS apenas água filtrada em bebedouros para ingestão *ad libitum* e foram submetidos aos mesmos procedimentos dos grupos tratados. A seguir encontra-se uma esquematização do experimento realizado (Figura 2).



Figura 2. Esquematização do experimento de indução da UC por DSS e tratamento com CTX

3.4.1. Análise fenotípica da colite

Para realizar a análise fenotípica da colite foram considerados os seguintes parâmetros: alteração do peso, consistência das fezes e a presença de sangue nas fezes e/ ou no ânus do camundongo. Esses parâmetros foram graduados separadamente em uma escala de 0 a 4 e a soma dos escores constituiu o IAD (Tabela 1) (DE FAZIO *et al.*, 2014). Os animais foram pesados e analisados diariamente em relação a esses escores. Após 7 dias de avaliação

clínica, os animais foram eutanasiados com doses letais de xilazina (30 mg/ Kg) e quetamina (300 mg/ Kg) e tiveram o cólon retirado, medido e registrado. Em seguida, o tecido foi fixado para posterior avaliação histológica.

Tabela 1. Escores do IAD, adaptação de De Fazio (DE FAZIO *et al.*, 2014)

Escore			
Escores	Perda de peso	Consistência das fezes	Presença de sangue
0	Ausente	Normal	Ausente
1	5 - 10%	Semi pastosa	Sangue restrito ao ânus em pequenas quantidades e/ou nas fezes
2	10 - 15%	Pastosa	Sangue nas fezes em quantidades moderadas e/ou além do ânus
3	15 - 20%	Diarreico	Sangue nas fezes e/ou além do ânus em abundância
4	> 20%	-	-

3.4.2. Imunofenotipagem

Para a realização da imunofenotipagem, segmentos do cólon distal foram retirados e colocados em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 2%. Em seguida foram picotados e incubados por 40 minutos em colagenase (1 mg/mL) e DNase (0,5 mg/mL). Posteriormente foi feito o bloqueio da reação com PBS com 20% de SFB e as células foram coletadas, filtradas e centrifugadas.

Essas células viáveis foram numeradas em câmara hemocitométrica de Malassez. Após a contagem, uma alíquota de 100 µL de uma suspensão celular a 1×10^4 células/ mL foi marcada com anticorpos monoclonais dirigidos às moléculas GR1, CD11b e realizada a verificação quanto a viabilidade celular (FVS, do inglês Fixable Viability Stain), com combinações diferentes de fluoróforos. Para os isótipos controle foram utilizados anticorpos não específicos marcados com os respectivos fluoróforos. Todos os anticorpos foram obtidos da BD Biosciences Pharmingen (BD Bioscience Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA) e foram adquiridas 20.000 células, utilizando FACSCantoII e analisado pelo programa FlowJo (Tree Star).

3.4.3. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Para a determinação da atividade de MPO, fragmentos distais do cólon foram homogeneizados com 1 mL de Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (HTAB), a 0,5% em EDTA (10 mM) no equipamento Polytron (BRICKMAN). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos a 4 °C. O ensaio de MPO foi conduzido em 10 µL do sobrenadante de cada amostra em placa de 96 poços adicionando 200 µL de tampão substrato (tampão fosfato a 50 mM, peróxido de hidrogênio a 0,1% e orto-dianisidina 1,3% em água). Após 5 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 50 µL de solução de azida sódica a 1,3% em água. Os valores da atividade de MPO foram expressos pelo valor das absorbâncias, por grama de tecido, obtidos a 450 nm em um leitor de ELISA (Bio-Tek Instruments).

3.4.4. Análise histológica

Segmentos distais do cólon foram removidos e fixados em paraformaldeído 10% por 24 horas, seguido de armazenamento em etanol 70% até o início do processamento histológico. As amostras foram incluídas em parafina e seccionadas a 5 µm para coloração com hematoxilina e eosina (HE). Os cortes foram analisados em microscópio óptico Diaplan Leitz e as imagens documentadas em câmera Leica modelo DFC 295.

3.5. Análise estatística

Os resultados obtidos pelo estudo e parâmetros avaliados foram analisados por meio do teste paramétrico de ANOVA, seguido pelo teste de Tukey ou pelo teste *t*-student e expressos como média ± erro padrão da média. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$, bicaudal. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Purificação da fração de Crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt)

O veneno bruto de *Cdt* foi obtido do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, sendo constituído por pool de diferentes serpentes da mesma espécie para manter a heterogeneidade da amostra. Após a purificação do veneno, obteve-se um pico correspondente à CTX como resultado da cromatografia de troca aniônica (Figura 3). Para analisar as amostras, realizou-se uma eletroforese do veneno total de *Cdt* e CTX purificada (Figura 4).

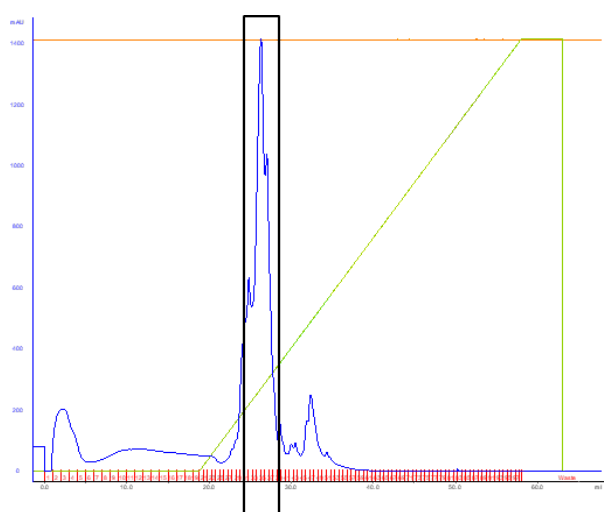


Figura 3. Resultado da cromatografia de troca aniônica em coluna MONO-Q HR 5/5 em sistema Akta-FPLC. O pico da Crotoxina corresponde ao destacado no gráfico.

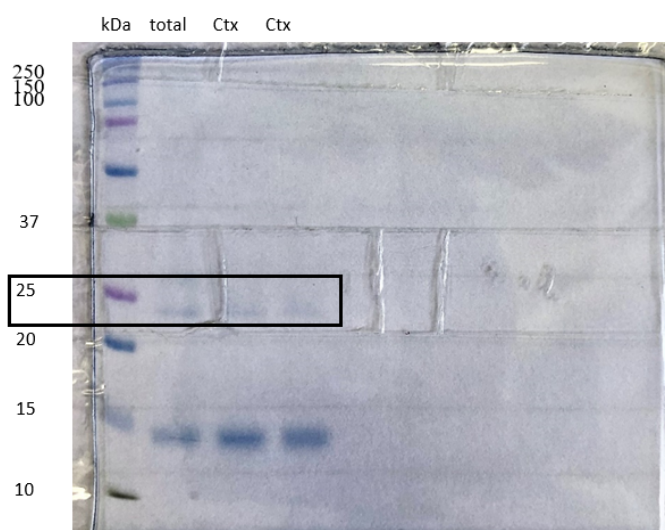


Figura 4. Eletroforese de amostras de veneno total de *Crotalus durissus terrificus* e Crotoxina purificada.

4.2. DL50

O experimento para determinar a DL50 da Crotoxina foi realizado com as doses variando de 600 a 37,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corpóreo em SBA-15, administradas por via oral (gavagem). Os animais do grupo de maior dose apresentaram apenas sintomas leves de toxicidade como coceira na região proximal dos olhos por aproximadamente 20 minutos e não houve mortalidade durante os 7 dias de observação. Com isso, não foi possível determinar a DL50 da CTX nas doses escolhidas por essa via.

4.3. Indução da colite por DSS e tratamentos com CTX 37,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$

4.3.1. Análise fenotípica da colite

Experimentos anteriores que utilizaram duas doses de CTX (75 e 37,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) por via oral (gavagem) incorporadas à Sílica mesoporosa SBA-15 evidenciaram uma maior eficácia de inibição na menor dose. Uma vez estabelecida a dose a ser utilizada, iniciamos os tratamentos com DSS e CTX por via oral (gavagem) na dose de 37,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ em uma única aplicação ou com duas doses no intervalo de 4 dias.

A partir do 1º dia de experimento, os parâmetros do índice de atividade da doença (IAD) foram observados e registrados com escores conforme descrito na Tabela 1 da metodologia. Durante os 7 dias de avaliação verificamos diferenças significativas nos escores entre os grupos D vs DC1 nos dias 5, 6 e 7 e entre D vs DC2 no dia 5 (Figura 5). Os grupos controles tratados apenas com CTX ou água não apresentaram índices de UC significativos.

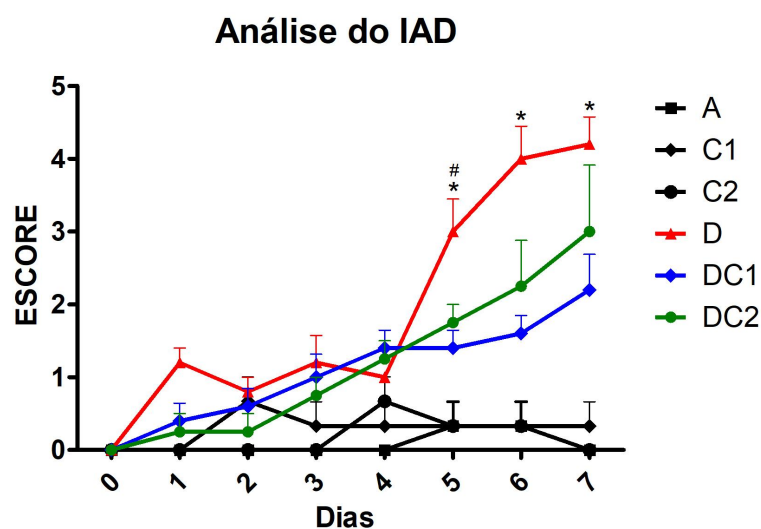


Figura 5. Análise dos escores do índice de atividade da doença (IAD) durante 7 dias de tratamento (n = 3-5/ grupo). Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. Teste *t*-student, #diferença entre D e DC2 e * entre D e DC1 para $p < 0,05$.

Juntamente com o IAD foi observado a variação do peso corpóreo dos animais durante os 7 dias de tratamento e não foram observadas perdas de peso significativas entre os grupos experimentais (Figura 6).

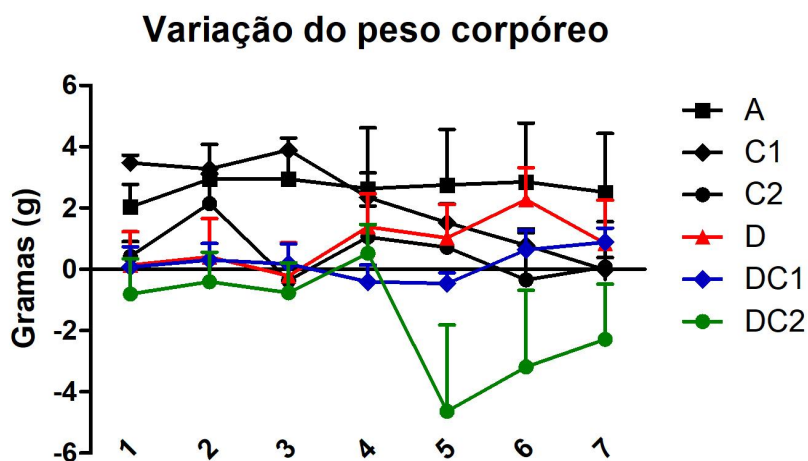


Figura 6. Análise da variação do peso corpóreo durante 7 dias de tratamento (n = 3-5/ grupo). Valores expressos como média $\pm$ E.P.M.

No 7º dia de registro do IAD, os animais foram eutanasiados e os cólons foram removidos, medidos e registrados (Figura 7). O tamanho do cólon foi similar entre os grupos experimentais (Figura 8).

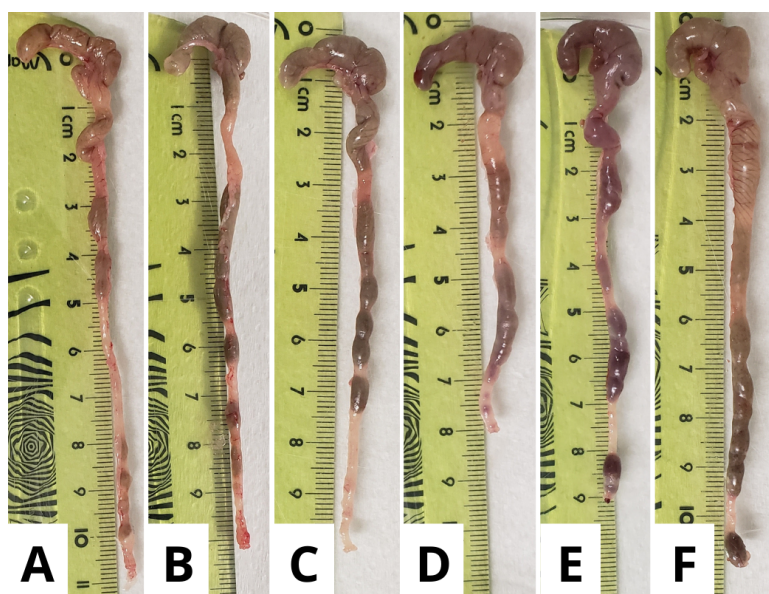


Figura 7. Imagens dos cólons de um representante de cada grupo experimental após 7 dias de análise (n = 3-5/ grupo). Sendo os grupos A-F, respectivamente, A, C1, C2, D, DC1 e DC2.

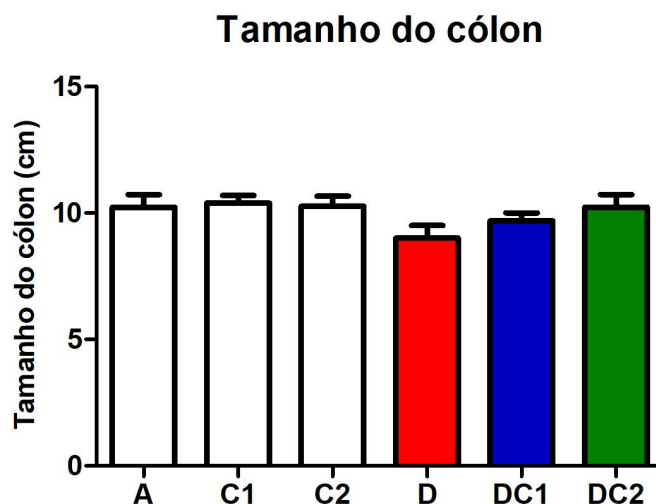


Figura 8. Tamanho do cólon após 7 dias do início do experimento (n = 3-5/ grupo). Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

4.3.2. Imunofenotipagem

A partir de segmentos distais do cólon, as células foram extraídas, processadas e marcadas com fluoróforos específicos para GR1/CD11b e verificadas quanto à viabilidade celular. Os grupos C1 e D apresentaram uma maior quantidade de células marcadas com GR1/CD11b enquanto os demais grupos apresentaram uma quantidade menor das mesmas células (Figura 9). A seguir encontra-se uma esquematização da análise pelo programa FlowJo (Figura 10).

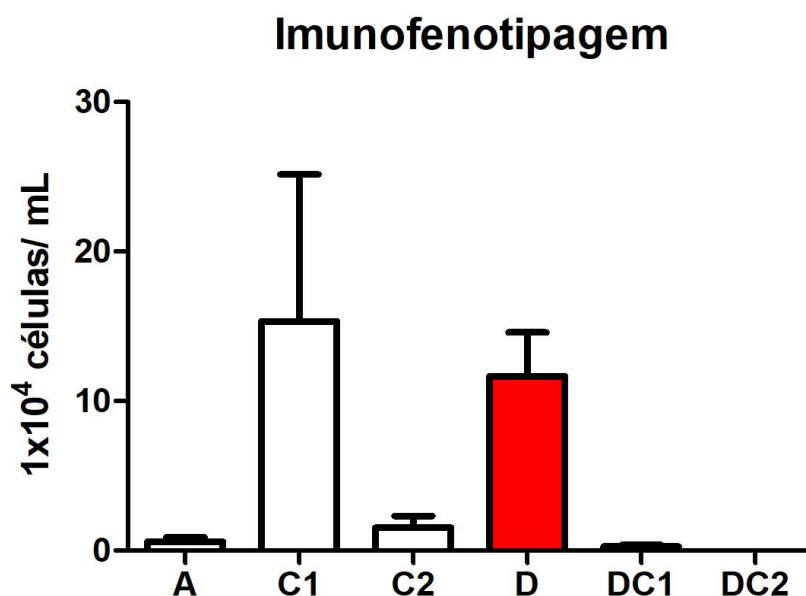


Figura 9. Análise da imunofenotipagem para as células marcadas com GR1/ CD11b no 7º dia de experimento (n = 3-5/ grupo). Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

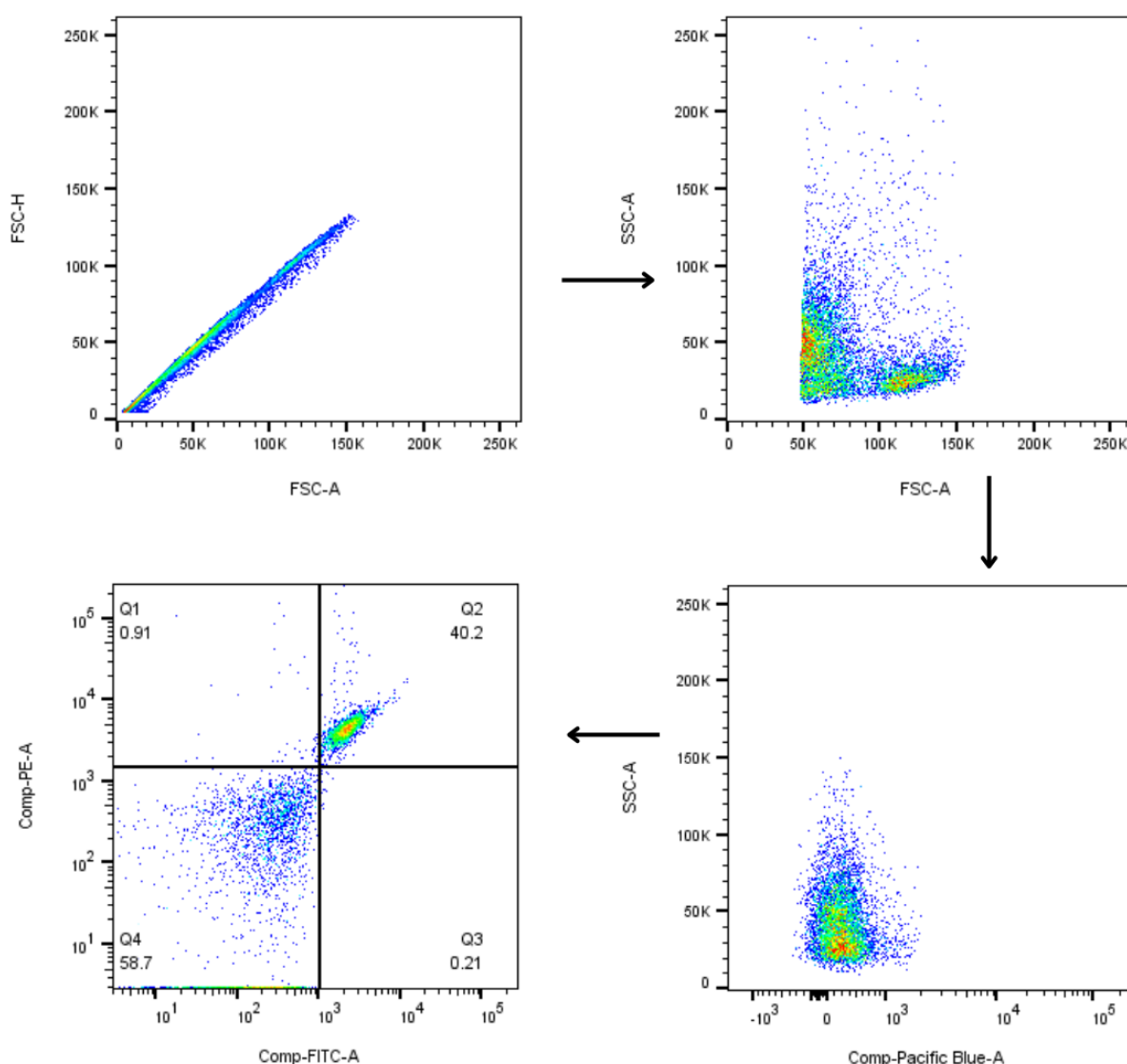


Figura 10. Análise da imunofenotipagem para as células marcadas com GR1/CD11b no 7º dia de experimento (n = 3-5/ grupo). Os quadros referem-se, respectivamente, às *singlets cells*, as células a serem analisadas, as células vivas (FVS) e a análise da marcação GR1/CD11b. Imagens geradas pelo programa FlowJo.

4.3.3. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A determinação da atividade enzimática da mieloperoxidase pode indicar processos inflamatórios durante a instalação da colite pelo DSS. Assim, para a avaliação da MPO, fragmentos do cólon distal foram coletados e processados. Os resultados obtidos não mostram diferenças significativas entre os grupos no período analisado (Figura 11).

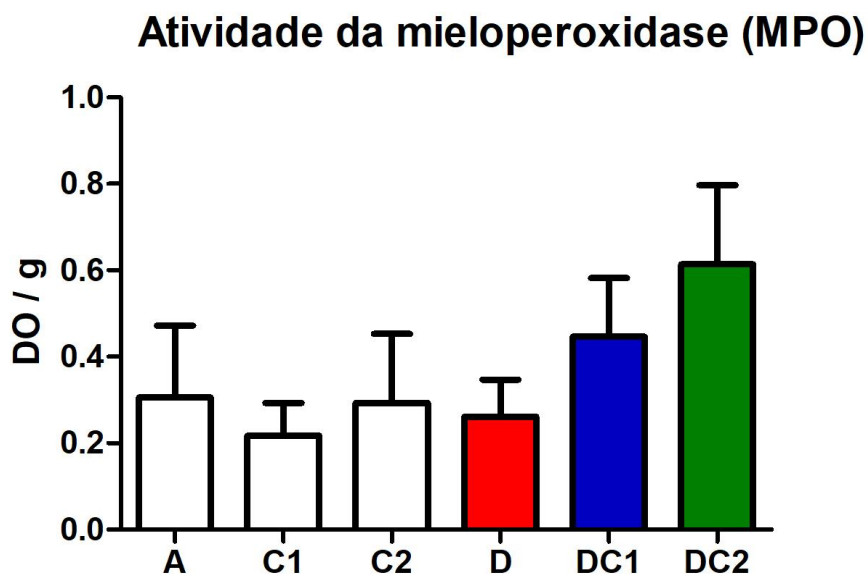


Figura 11. Atividade da mieloperoxidase (MPO) no 7º dia de experimento (n = 3-5/ grupo). Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

4.3.4. Análise histológica

Com o objetivo de avaliar os efeitos locais do DSS no epitélio da porção distal do cólon, realizamos cortes histológicos dos fragmentos coletados aos 7 dias de tratamento utilizando HE como coloração. A seguir encontra-se um quadro representativo dos diferentes grupos experimentais (Figura 12).

Verificamos nos grupos A, B e C a preservação da arquitetura normal do epitélio do cólon, mostrando as vilosidades e os diferentes tipos celulares presentes nas criptas como as *Goblets cells*. No grupo D, tratado apenas com DSS, podemos verificar uma leve alteração epitelial e considerável processo inflamatório na camada submucosa. Nos grupos E e F, não há alterações significativas observadas no tecido (Figura 12).

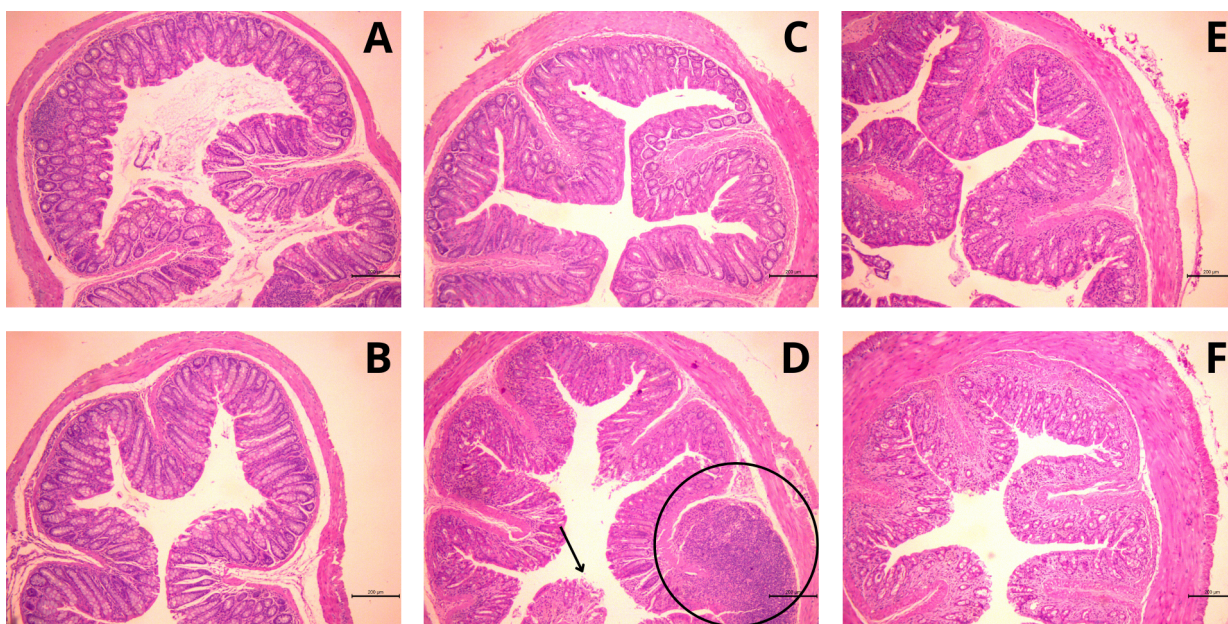


Figura 12. Análise histológica dos grupos experimentais, sendo os grupos A-F, respectivamente, A, C1, C2, D, DC1 e DC2 com $n=3-5$ / grupo. Coloração com Hematoxilina/Eosina (HE) e aumento de 40x. Indicações no quadro D, sendo a seta apresentando a alteração epitelial e o círculo a inflamação.

5. DISCUSSÃO

O estudo das toxinas provenientes de animais peçonhentos como serpentes, escorpiões e aranhas, trouxeram benefícios à saúde humana como o desenvolvimento de fármacos anti-hipertensivos provenientes de estudos com *Bothrops jararaca* como o Captopril® (CUSHMAN; ONDETTI, 1991; PONTIERI *et al.*, 1990; ZAMBELLI *et al.*, 2016). Uma toxina bastante estudada é a CTX que advém do veneno de serpentes do gênero *Crotalus* e apresenta potencial efeito antinociceptivo e imunomodulatório *in vivo* sendo uma possível intervenção farmacológica a ser utilizada em doenças de caráter inflamatório (ALMEIDA *et al.*, 2015; CARDOSO *et al.*, 2001; RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004). Entretanto, o potencial terapêutico dessas terapias são limitadas por conta da sua toxicidade. Como uma maneira de amenizar esse efeito, e melhorar a biodisponibilidade oral da CTX, utiliza-se a SBA-15 (PHILIPPART *et al.*, 2016).

Para verificar a toxicidade de uma substância são realizados testes *in vivo* como a DL50. Assim, em nossos resultados, as doses administradas não provocaram efeitos tóxicos detectáveis e, portanto, não foi possível determinar a DL50. Uma das hipóteses discutidas é o fato da SBA-15 diminuir os efeitos tóxicos da CTX quando encapsulada a ela fato que corrobora com os dados obtidos neste experimento, uma vez que a SBA-15 age como um carreador e protetor da CTX no trajeto do trato gastrointestinal até alcançar o seu alvo terapêutico (LU *et al.*, 2010; SANT'ANNA *et al.*, 2019).

Por não termos determinado a DL50, optamos por utilizar a menor concentração de CTX considerando os experimentos anteriores do laboratório que utilizaram as doses de CTX encapsuladas a sílica SBA-15 nas concentrações de 75 e 37,5 µg/ Kg (Dados não publicados). Além disso, foram consideradas as doses utilizadas em outros estudos (SANT'ANNA *et al.*, 2019) e vias de administração (ALMEIDA *et al.*, 2015). Estudos anteriores realizados no nosso laboratório e por Almeida *et al* evidenciaram a modulação da colite ulcerativa experimental com o uso de CTX por via intraperitoneal em diferentes modelos experimentais e vias de indução da UC (ALMEIDA *et al.*, 2015). Com isso, os experimentos realizados estão concordantes com esses dados tendo em vista a inibição total da colite ulcerativa verificada nos últimos dias de indução por DSS, principalmente no grupo tratado com DSS e crotoxina uma única vez (DC1).

Entretanto, nos aspectos que caracterizam a indução da colite aguda como a perda de peso, a diminuição do tamanho do cólon, a presença de células da resposta inflamatória aguda evidenciada por meio da imunofenotipagem e o aumento da atividade da MPO não foram verificadas alterações significativamente que corroborem com a modulação da UC observada

na análise do IAD. Quando comparado esses dados com estudos realizados por Almeida *et al*, observa-se diferenças nesses parâmetros, uma vez que foram observadas reduções significativas em camundongos que receberam TNBS para a indução de colite e tratamento com CTX (ALMEIDA *et al.*, 2015).

A análise histológica, por sua vez, refletiu o cenário esperado dos grupos experimentais uma vez que o grupo tratado apenas com DSS (D) apresentou maiores alterações histológicas e os grupos tratados com CTX (DC1 e DC2), apresentaram uma manutenção do epitélio do cólon o que reflete as notas atribuídas pelo escore observada no índice de atividade da doença (IAD).

6. CONCLUSÃO

Esses resultados confirmam a atividade imunossupressora da CTX incorporada a sílica na dose de 37,5 µg/ Kg, administrada por via oral (gavagem) e evidenciada por aspectos clínicos relacionados à colite como a redução do índice de atividade da doença (IAD) nos grupos tratados com CTX como o DC1 e DC2.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C. de S.; DE SOUZA ALMEIDA, C.; ANDRADE-OLIVEIRA, V.; CÂMARA, N. O. S.; JACYSYN, J. F.; FAQUIM-MAURO, E. L. **Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* Is Able to Down-Modulate the Acute Intestinal Inflammation in Mice.** [*S. l.*: *s. n.*], 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121427>.
- ANANTHAKRISHNAN, A. N. Epidemiology and risk factors for IBD. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, [*s. l.*], v. 12, n. 4, p. 205–217, 2015.
- ASAKURA, K.; NISHIWAKI, Y.; INOUE, N.; HIBI, T.; WATANABE, M.; TAKEBAYASHI, T. Prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in Japan. **Journal of gastroenterology**, [*s. l.*], v. 44, n. 7, p. 659–665, 2009.
- BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **The Lancet**, [*s. l.*], v. 369, n. 9573, p. 1641–1657, 2007.
- BIOZZI, G.; RIBEIRO, O. G.; SARAN, A.; ARAUJO, M. L.; MARIA, D. A.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. K.; SANT'ANNA, O. A.; MASSA, S.; COVELLI, V.; MOUTON, D.; NEVEU, T.; SIQUEIRA, M.; IBANEZ, O. M. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis**, [*s. l.*], v. 19, n. 2, p. 337–346, 1998.
- BON, C.; BOUCHIER, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M. S.; LAMBEZAT, M. P.; RADVANYI, F.; SALIOU, B. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta physiologica et pharmacologica latinoamericana: organo de la Asociacion Latinoamericana de Ciencias Fisiologicas y de la Asociacion Latinoamericana de Farmacologia**, [*s. l.*], v. 39, n. 4, p. 439–448, 1989.
- CARDOSO, D. F.; LOPES-FERREIRA, M.; FAQUIM-MAURO, E. L.; MACEDO, M. S.; FARSKY, S. H. Role of crotoxin, a phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. **Mediators of inflammation**, [*s. l.*], v. 10, n. 3, p. 125–133, 2001.
- CHASSAING, B.; AITKEN, J. D.; MALLESHAPPA, M.; VIJAY-KUMAR, M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. **Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]**, [*s. l.*], v. 104, p. 15.25.1–15.25.14, 2014.
- CUSHMAN, D. W.; ONDETTI, M. A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension**, [*s. l.*], v. 17, n. 4, p. 589–592, 1991.
- DE FAZIO, L.; CAVAZZA, E.; SPISNI, E.; STRILLACCI, A.; CENTANNI, M.; CANDELA, M.; PRATICÒ, C.; CAMPIERI, M.; RICCI, C.; VALERII, M. C. Longitudinal analysis of inflammation and microbiota dynamics in a model of mild chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. **World journal of gastroenterology: WJG**, [*s. l.*], v. 20, n. 8, p. 2051–2061, 2014.
- DIGNASS, A.; ELIAKIM, R.; MAGRO, F.; MAASER, C.; CHOWERS, Y.; GEBOES, K.; MANTZARIS, G.; REINISCH, W.; COLOMBEL, J.-F.; VERMEIRE, S.; TRAVIS, S.; LINDSAY, J. O.; VAN ASSCHE, G. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. **Journal of**

Crohn's & colitis, [s. l.], v. 6, n. 10, p. 965–990, 2012.

DI PACE, R. F.; MASSA, S.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H. K.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; SEMAN, M.; IBÁÑEZ, O. C. M. Inverse genetic predisposition to colon versus lung carcinogenesis in mouse lines selected based on acute inflammatory responsiveness. **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 1517–1525, 2006.

FANTINI, M. C. de A.; OLIVEIRA, C. L. P.; LOPES, J. L. de S.; MARTINS, T. da S.; AKAMATSU, M. A.; TREZENA, A. G.; FRANCO, M. T.-D.; BOTOSSO, V. F.; SANT'ANNA, O. A. B. E.; KARDJLOV, N.; RASMUSSEN, M. K.; BORDALLO, H. N. Using crystallography tools to improve vaccine formulations. **IUCrJ**, [s. l.], v. 9, n. Pt 1, p. 11–20, 2022.

FRAENKEL-CONRAT, H.; SINGER, B. **A new technique for the analysis of histidine, tyrosine, methionine and arginine in protein hydrolysates**. [S. l.: s. n.], 1956. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(56\)90195-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(56)90195-3).

HOENTJEN, F.; SAKURABA, A.; HANAUER, S. Update on the management of ulcerative colitis. **Current gastroenterology reports**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 475–485, 2011.

IBANEZ, O. M.; STIFFEL, C.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. K.; MASSA, S.; DE FRANCO, M.; SANT'ANNA, O. A.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **European journal of immunology**, [s. l.], v. 22, n. 10, p. 2555–2563, 1992.

KITAJIMA, S.; TAKUMA, S.; MORIMOTO, M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. **Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 137–143, 1999.

KOBAYASHI, T.; SIEGMUND, B.; LE BERRE, C.; WEI, S. C.; FERRANTE, M.; SHEN, B.; BERNSTEIN, C. N.; DANESE, S.; PEYRIN-BIROULET, L.; HIBI, T. Ulcerative colitis. **Nature reviews. Disease primers**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 74, 2020.

LU, J.; LIONG, M.; LI, Z.; ZINK, J. I.; TAMANOI, F. Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals. **Small**, [s. l.], v. 6, n. 16, p. 1794–1805, 2010.

MALIQUE, C. M. S.; GUTIÉRREZ, J. M. Snakebite envenomation in central and South America. **Critical Care Toxicology**, [s. l.], 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Jose-Gutierrez-17/publication/308786422_Snakebite_envenomation_in_Central_and_South_America_In_Critical_Care_Medicine_Brendt_et_al_Eds_Springer_International_Switzerland_pp_1-22/links/57f1324708ae91deaa56139d/Snakebite-envenomation-in-Central-and-South-America-In-Critical-Care-Medicine-Brendt-et-al-Eds-Springer-International-Switzerland-pp-1-22.pdf.

MCALINDON, M. E.; HAWKEY, C. J.; MAHIDA, Y. R. Expression of interleukin 1 beta and interleukin 1 beta converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease. **Gut**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 214–219, 1998.

NG, S. C.; SHI, H. Y.; HAMIDI, N.; UNDERWOOD, F. E.; TANG, W.; BENCHIMOL, E. I.; PANACCIONE, R.; GHOSH, S.; WU, J. C. Y.; CHAN, F. K. L.; SUNG, J. J. Y.; KAPLAN,

G. G. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **The Lancet**, [s. l.], v. 390, n. 10114, p. 2769–2778, 2017.

OKAYASU, I.; HATAKEYAMA, S.; YAMADA, M.; OHKUSA, T.; INAGAKI, Y.; NAKAYA, R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 98, n. 3, p. 694–702, 1990.

PERŠE, M.; CERAR, A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. **Journal of biomedicine & biotechnology**, [s. l.], v. 2012, p. 718617, 2012.

PHILIPPART, M.; SCHMIDT, J.; BITTNER, B. Oral delivery of therapeutic proteins and peptides: an overview of current technologies and recommendations for bridging from approved intravenous or subcutaneous administration to novel oral regimens. **Drug research**, [s. l.], v. 66, n. 03, p. 113–120, 2016.

PONTIERI, V.; LOPES, O. U.; FERREIRA, S. H. **Hypotensive effect of captopril. Role of bradykinin and prostaglandinlike substances**. [S. l.: s. n.], 1990. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1161/01.hyp.15.2_suppl.i55.

RANGEL-SANTOS, A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; CARDOSO, D. F. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, [s. l.], v. 44, n. 6, p. 609–616, 2004.

SAIRENJI, T.; COLLINS, K. L.; EVANS, D. V. An Update on Inflammatory Bowel Disease. **Primary care**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 673–692, 2017.

SANT'ANNA, M. B.; LOPES, F. S. R.; KIMURA, L. F.; GIARDINI, A. C.; SANT'ANNA, O. A.; PICCOLO, G. Crotoxin Conjugated to SBA-15 Nanostructured Mesoporous Silica Induces Long-Last Analgesic Effect in the Neuropathic Pain Model in Mice. **Toxins**, [s. l.], v. 11, n. 12, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins11120679>.

SARTOR, R. B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. 390–407, 2006.

SCARAMUZZI, K.; TANAKA, G. D.; NETO, F. M.; GARCIA, P. R. A. F.; GABRILI, J. J. M.; OLIVEIRA, D. C. A.; TAMBOURGI, D. V.; MUSSALEM, J. S.; PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; D'AZEREDO ORLANDO, M. T.; BOTOSSO, V. F.; OLIVEIRA, C. L. P.; FANTINI, M. C. A.; SANT'ANNA, O. A. Nanostructured SBA-15 silica: An effective protective vehicle to oral hepatitis B vaccine immunization. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 2241–2250, 2016.

STROBER, W.; FUSS, I. J.; BLUMBERG, R. S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annual review of immunology**, [s. l.], v. 20, p. 495–549, 2002.

ZAMBELLI, V. O.; PASQUALOTO, K. F. M.; PICCOLO, G.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; CURY, Y. Harnessing the knowledge of animal toxins to generate drugs. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, [s. l.], v. 112, p. 30–36, 2016.