CAROLINE DE SOUZA ALMEIDA

**ESTUDO DA IMUNOMODULAÇÃO INDUZIDA PELA
CROTOXINA DO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus*
EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA
INFLAMATÓRIA NO INTESTINO**

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

São Paulo
2014

CAROLINE DE SOUZA ALMEIDA

**ESTUDO DA IMUNOMODULAÇÃO INDUZIDA PELA CROTOXINA DO VENENO
DE *Crotalus durissus terrificus* EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA
INFLAMATÓRIA NO INTESTINO**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Dra. Eliana Faquim de L. Mauro

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Almeida, Caroline de Souza.

Estudo da imunomodulação induzida pela crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em modelo experimental de doença inflamatória no intestino / Caroline de Souza Almeida. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Eliana Faquim de Lima Mauro.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunorregulação.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the immunomodulation induced by crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom in experimental model of inflammatory bowel disease.

1. *Crotalus durissus terrificus* 2. Crotoxina 3. Inflamação intestinal 4. TNBS 5. Imunomodulação 6. Células T reguladoras e Th 17 I. Mauro, Profa. Dra. Eliana Faquim de Lima II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB075/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Caroline de Souza Almeida.

Título da Tese: Estudo da imunomodulação induzida pela crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em modelo experimental de doença inflamatória no intestino.

Orientador(a): Profa. Dra. Eliana Faquim de Lima Mauro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo da imunomodulação decorrente da terapia com crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em modelo experimental de doença inflamatória intestinal induzida pelo ácido trinitobenzeno sulfônico", **protocolo nº 719/10**, sob a responsabilidade de Eliana Faquim de Lima Mauro e Caroline de Souza almeida - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 7/3/2012.

We certify that the research entitled "Evaluation of the immunomodulation induced by crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom in experimental model of inflammatory bowel disease", **protocol number 719/10**, under the responsibility of Eliana Faquim de Lima Mauro and Caroline de Souza almeida - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research - is in agreement with Brazilian laws for use of experimental animals and the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 3/7/2012.

Vigência do Projeto: 05/2010 - 05/2014	Nº de animais/espécie	ADITIVO/OBSERVAÇÃO
Laboratório de Imunopatologia	432 Balb/c (M); 96 C57BL/6 wild type (M); 96 C57BL/6 IL-10 ^{-/-} (M)	248 camundongos Balb/c (M)

São Paulo, 12 de março de 2012.

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Linus Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **80** nas fls. **89** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Eliana Faquim de Lima Mauro, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Estudo da imunomodulação induzida pela crotoxina do veneno de Crotalus durissus terrificus em modelo experimental de doença inflamatória intestinal** do qual participam o(s) alunos **Caroline de Souza Almeida**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **13.12.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 13 de dezembro de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário-suplente
CEUA - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Regina e Gilmar, pelos esforços contínuos que fizeram para minha formação, além do apoio para realização de mais um sonho, meus sinceros sentimentos de gratidão. Ao meu irmão Matheus pelo apoio e companheirismo, mesmo que a distância.

A minha orientadora Dra. Eliana Faquim, por todos os ensinamentos, pela dedicação, incentivo, confiança e paciência, pela ajuda na finalização do trabalho e por me acolher com tanto carinho em sua equipe de trabalho.

Ao Paulo, pelo amor incondicional, carinho, paciência, e pelos anos de companheirismo, tornando minha vida mais leve e mais fácil de seguir em frente.

A minha querida amiga Stella que me acolheu como uma irmã, por toda ajuda com adaptação à vida paulistana, de todo meu coração muito obrigada, você fez a vida em São Paulo ficar muito “menos cinza”. À minha outra amiga-irmã Daiana, por todo o carinho, pela acolhida e mesmo à distância sempre me apoiando. Vocês foram a minha família aqui durante esses 4 anos. À mais nova integrante da casa, Vânia muito obrigada pela amizade, risadas e carinho.

Aos meus familiares, primos, tios e minha avó por todo carinho e apoio.

As minha amigas de longe, mas sempre presentes, Alessandra, Suelen, Ana Carolina e Lyvia, obrigada meninas pelo apoio.

Ao Thiago Andrade Patente por todos os ensinamentos com o modelo desenvolvido neste trabalho.

A Jackie pelo carinho, amizade e disposição para auxiliar na realização das citometrias.

Ao Jorge Ferreira pelo auxílio também nas leituras de citometria.

Ao Márcio Matsubara pela ajuda nos ensaios de extração de eicosanoides.

Às minha queridas “Elianetes” Bruna, Priscila e Amanda por me ajudarem no laboratório, pelo carinho, apoio, e por tornarem o este ambiente sempre mais divertido.

Ao Juninho pela grande amizade e apoio e obrigada por fazer parte do nosso querido quarteto fantástico!

Aos alunos e funcionários do laboratório pelo apoio na realização desse trabalho.

Aos pesquisadores do Laboratório de Imunopatologia, Irene, Geraldo, Kátia, Ana Moura e Patrícia pelos ensinamentos, apoio e amizade. Meu agradecimento especial a pesquisadora Máisa pela amizade, carinho e por me ajudar tão gentilmente na finalização deste trabalho.

À Maria Eni pela ajuda com as questões burocráticas para realização do trabalho.

A CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro concedido.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho,

Muito obrigada!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

RESUMO

ALMEIDA, C. S. **Estudo da imunomodulação induzida pela crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em modelo experimental de doença inflamatória no intestino.** 2014. 119 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A perda da tolerância às bactérias entéricas, ativação de células do sistema imune e infiltrado leucocitário são características de inflamações gastrointestinais como a doença de Crohn e colite ulcerativa. No entanto, os fatores envolvidos no desencadeamento dessas doenças ainda não estão claramente estabelecidos. No presente trabalho foi estudado o potencial imunorregulador da crotoxina (CTX), principal toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, em modelo experimental de colite induzida pelo ácido 2,4,6- trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) em camundongos. Após a administração da CTX 18 horas pós-indução da inflamação intestinal, constatamos que esta toxina foi capaz de diminuir a perda de peso, o *score* clínico e histológico, além da síntese da mieloperoxidase (MPO) e citocinas inflamatórias (IL-6, TNF- α , IL-17 e IL-1 β) em camundongos BALB/c com inflamação intestinal. Além disso, verificamos menor número de neutrófilos e macrófagos com fenótipos M1 e M2 na lâmina própria dos camundongos que receberam TNBS e CTX em relação ao grupo que recebeu somente o TNBS. Por outro lado, a CTX estimulou a produção de citocinas anti-inflamatórias, TGF- β e IL-10, e a síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂) e lipoxigenase A₄ (LXA₄). A neutralização *in vivo* dessas citocinas com anticorpos monoclonais específicos ou o bloqueio da síntese desses eicosanoides com os inibidores Indometacina e *Nordihydroguaiaretic acid*- NDGA indica que o TGF- β , IL-10, PGE₂ e LXA₄ exercem papel relevante na melhora induzida pela CTX no quadro inflamatório observado nos camundongos que receberam TNBS. As análises das diferentes populações celulares extraídas da lâmina própria intestinal ou dos linfonodos mesentéricos e Placas de Peyer permitiram verificar que não houve diferença significativa na população de linfócitos Th1 (CD4⁺Tbet⁺) entre os animais que foram induzidos à inflamação com TNBS e que receberam ou não a CTX. No entanto, a CTX promoveu aumento das células T reguladoras (CD4⁺FoxP3⁺), envolvida na homeostasia, e diminuição da população Th17 (CD4⁺ROR γ ⁺) que está diretamente relacionada com a exacerbação da resposta imune de mucosa, como na Doença de Crohn. Estes resultados indicam, portanto que a CTX é capaz de regular a resposta inflamatória aguda intestinal induzida pelo TNBS resultando na melhora do quadro clínico observado nos animais. Além disso, TGF- β , IL-10, PGE₂ e LXA₄ e células T regs estão envolvidos nesse efeito modulador exercido pela CTX *in vivo*.

Palavras-chave: *Crotalus durissus terrificus*. Crotoxina. Inflamação Intestinal. TNBS. Imunomodulação. Células T reguladoras e Th17.

ABSTRACT

ALMEIDA, C. S. **Evaluation of immunomodulation induced by crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom in experimental model of inflammatory bowel disease.** 2014. 119 p. Ph. D. thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The loss of the tolerance against enteric bacteria, immune cells activation and leukocyte infiltration are characteristic of the gastrointestinal inflammations such as Crohn's disease and ulcerative colitis. However, the factors involved in the development of these intestinal diseases are not yet clearly established. In the present work it was analyzed the modulatory effect of the crotoxin (CTX), the major toxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, in the experimental model of colitis induced by intra-rectal instillation of 2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) in mice. It was firstly established the experimental model and determined the therapeutic administration of the CTX (18 hours after the TNBS instillation). We observed that this toxin was able to inhibit the weight loss, clinical and histological score, as well as the myeloperoxidase (MPO) synthesis and pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-17) in BALB/c mice with bowel inflammation. Furthermore, we observed decreased number of neutrophils and macrophage (M1 and M2) in lamina propria from mice that received TNBS and CTX compared with TNBS-group. In contrast, the CTX induced increased secretion of anti-inflammatory cytokines, TGF- β and IL-10, and synthesis of prostaglandin E₂ (PGE₂) and lipoxin A₄ (LXA₄). The *in vivo* neutralization of these cytokines using specific monoclonal antibodies or blockage of these eicosanoids synthesis with Indomethacin and Nordihydroguaiaretic acid-NDGA inhibitors indicates that TGF- β , IL-10, PGE₂ and LXA₄ exert significant role in the improvement of intestinal inflammation induced by CTX in mice that received TNBS. The analyzes of distinct cell populations obtained from intestinal lamina propria and mesenteric lymph nodes and Peyer's patches showed that there was no significant difference in Th1 lymphocytes (CD4⁺Tbet⁺) between TNBS-mice and the TNBS-mice that received the CTX. However, CTX induced an increase of T regulatory cells (CD4⁺FoxP3⁺) that are involved in immune tolerance and decreased Th17 population (CD4⁺ROR γ t⁺), which is directly related with the exacerbation of mucosal immune response, as observed in Crohn's disease. Together, these results indicate that CTX is able to modulate intestinal acute inflammatory response induced by TNBS resulting in the improvement of clinical status of the mice. In addition, TGF- β , IL-10, PGE₂ and LXA₄ and T regulatory cells are involved in modulatory effect exerted by CTX *in vivo*.

Keywords: *Crotalus durissus terrificus*. Crotoxin. Inflammatory bowel disease. TNBS. Immunomodulation. T regulatory and Th17 cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -Componentes do sistema imune de mucosa	21
Figura 2 - Esquema representativo dos grupos usados no protocolo experimental quanto à indução do modelo de inflamação e tratamento com CTX.	43
Quadro 1 - Grupos de animais utilizados nos ensaios de neutralização in vivo de TGF- β ou IL -10.....	53
Figura 3 - Perfil cromatográfico do veneno de C.d.terrificus submetido à cromatografia de troca aniônica em coluna MONO-Q.....	55
Figura 4 – Perfil eletroforético do veneno de C.d. terrificus e dos picos obtidos em cromatografia de troca aniônica.....	56
Figura 5 - Pesos e score clínico de camundongos BALB/c após indução experimental da inflamação no intestino.....	59
Figura 6 - Histologia da porção perirretal em camundongos BALB/c.....	61
Figura 7 – Secreção das citocinas pró-inflamatórias nos sobrenadantes de macerados dos intestinos.....	63
Figura 8 – Determinação da atividade enzimática da MPO nos macerados de intestinos e número absoluto de células Ly6G-Gr1 ⁺	64
Figura 9 - Análise da presença de macrófagos da lâmina própria nos diferentes grupos experimentais	65
Figura 10 - Produção de citocinas anti-inflamatórias e eicosanoides na porção colônica intestinal de camundongos BALB/c.....	67
Figura 11 - Expressão relativa de RNA mensageiro para as citocinas pró-inflamatórias em linfonodos e placas de Peyer de camundongos BALB/c.....	68
Figura 12 - Expressão relativa de RNA mensageiro para as citocinas anti-inflamatórias em células de linfonodos e placas de Peyer de camundongos BALB/c	69
Figura 13 - Análise de células CD4 ⁺ ROR γ t ⁺ e CD4 ⁺ Tbet ⁺ provenientes da lâmina própria (LP) dos diferentes grupos experimentais	70
Figura 14 - Análise de células CD4 ⁺ ROR γ t ⁺ e CD4 ⁺ Tbet provenientes dos linfonodos e placas de Peyer (LN) dos diferentes grupos experimentais.....	71
Figura 15 - Análise de células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ reguladoras na lâmina própria (LP) e nos linfonodos e placas de Peyer (LN).....	72
Figura 16 - Efeito da neutralização in vivo da IL-10 ou TGF- β sobre a variação de peso corporal, score clínico e aspecto macroscópico dos intestinos de camundongos injetados com TNBS e que receberam ou não CTX	74

Figura 17 –	Histologia da porção perirretal de camundongos BALB/c submetidos ao tratamento com anticorpos anti- β -gal., anti-TGF- β ou anti-IL10 seguida de indução de inflamação intestinal aguda com TNBS e administração ou não com CTX.....	76
Figura 18 -	Determinação da atividade enzimática da MPO nos macerados de intestinos dos animais que receberam tratamento com anticorpos seguida de indução da inflamação intestinal aguda com TNBS e administração ou não de CTX	77
Figura 19 –	Variação de peso corporal, score clínico e aspecto macroscópico dos intestinos de camundongos após administração de inibidores da produção de eicosanóides seguida de indução de inflamação intestinal aguda e administração ou não de CTX	79
Figura 20 -	Histologia da porção perirretal de camundongos BALB/c submetidos a administração de inibidores NDGA e INDO seguida de indução da inflamação aguda com TNBS e que receberam ou não CTX	81
Figura 21 -	Dosagem da atividade enzimática da MPO nos macerados de intestinos dos animais que receberam inibidores da produção de eicosanóides.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de peso corporal diária dos camundongos BALB/c submetidos aos tratamento com CTX 18h pré-indução com TNBS	57
Tabela 2 - Porcentagem de peso corporal diária dos camundongos BALB/c submetidos aos tratamento com CTX 18h pós-indução com TNBS.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA- Ácido araquidônico

APC- Célula apresentadora de antígeno (*Antigen-presenting cell*)

BCG- *Mycobacterium bovis*

Boc-2 - antagonista seletivo Boc-2 (*Butoxycarbonyl 2*)

BSA- Soro albumina bovina (Bovine albumin serum)

C.d. terrificus- *Crotalus durissus terrificus*

CA- Crotapotina (Crotapotin)

Camundongos IL17^{-/-} - camundongos geneticamente deficientes em IL-17

CB- subunidade B da crotoxina (*Phospholipase A₂*)

CD40L- Ligante da molécula CD40

CDAI - (*Crohn's Disease Activity Index*)

ConA- Concanavalina A

COX-2- Cicloxigenase-2

CpGs- Guanina oligodeoxinucleotídeos fosforotioato

CTLA-4 - (*Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*)

CTX- Crotoxina (Crotoxin)

DC - Célula Dendrítica (*Dendritic Cell*)

DSS - (*Dextran sulfate sodium*)

EDTA- Ácido etilodiaminotetracético (Ethylenediaminetetraacetic acid)

ELISA- Ensaio imunoenzimático (Enzyme linked immunosorbent assay)

ETOH - etanol (*Ethanol*)

EU - Unidades de endotoxina

SFB- Soro fetal bovino (Fetal bovine serum)

FITC- Isotiocianato de fluoresceína (Fluorescein isothiocyanate)

Flt3L- Ligante tirosina quinase 3

FoxP3- *fork head box P3*

FPLC- Cromatografia líquida de alta performance (*Fast- Performance Liquid Chromatography*)

FPRs- Receptores pertencentes a família do formil peptídeo

FSC- Tamanho das células

GAB - *antibodies against goblet cells*-

HBSS - *Hank's Balanced Salt Solution*

HTAB - *hexadecyl trimethyl ammonium bromide*

ICE - (*Interleukin (IL)-1 converting enzyme*)

IFN γ - Interferon- γ

IL- interleucina

ILC - Célula linfóide inata (*Innate Lymphoid Cell*)

INDO - Indometacina

Infliximab - anticorpo monoclonal anti-TNF- α

iTregs – células T reguladoras induzidas

kDa- Unidade de massa atômica (Atomic mass unit)

LAL- *Limulus Amoebocyte Lysate*

15-LO - 15-lipoxigenase

LNMs - linfonodos mesentéricos

LP- Lâmina Própria

LPS- Lipopolissacarídeo (*Lipopolysaccharid*)

LTs- Linfócitos T

LXA₄- Lipoxina A₄

LXs- Lipoxinas

M1 - macrófagos classicamente ativados

M2 - macrófagos alternativamente ativados

MHC- Complexo de histocompatibilidade principal (Major Histocompatibility Complex)

MyD88- Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88

NaCl- Cloreto de sódio (*Sodium chloride*)

NDGA - *Nordihydroguaiaretic acid*

NF-κB- Factor nuclear kappa B

NK- Célula matadora natural (*Natural Killer Cell*)

NLRs - *Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors*

NO - óxido nítrico

nTregs - células T reguladoras naturais (Natural T regulatory cell)

OVA- Ovalbumina (*Ovalbumin*)

PAF - fator ativador de plaquetas

PAMPs- Padrões moleculares associados aos patógenos (*pathogen associated molecular patterns*)

pANCA *anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies*

PBS- Solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate buffered saline*)

PBS-T- Solução salina tamponada com fosfato + Tween 20 (*Phosphate buffered saline tween*)

PCR- RT- Reação de transcriptase reversa em tempo real

pDCs- Células dendríticas plasmocitóides

PE- Ficoeritrina (Phycoerythrin)

PFA - paraformaldeído

PGE₂- Prostaglandina E₂

PGs- prostaglandinas

PLA₂- Fosfolipase A₂ (Phospholipase A₂); subunidade CB

PMSF - *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*

PP- Placas de Peyer

PGE₂ - Prostaglandina E₂

PRRs- Receptores de reconhecimento de padrões

RLRs -*RIG-I-like receptor*

RNA_m - ácido ribonucleico mensageiro

ROR_α *Retinoic acid receptor (RAR)-related orphan receptor alfa*

ROR_γ - *Retinoic acid receptor (RAR)-related orphan receptor gamma*

RPMI- Meio de cultura RPMI 1640

RPMI-S- Meio de cultura RPMI 1640 suplementado

RT- Transcrição reversa

SAH - albumina de soro humano

SDS-PAGE- Dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida

SSC- Granulosidade

STAT-4 - *Signal Transducer and Activator of Transcription protein family* - 4

TA- Temperatura ambiente

T-bet - T-box expressed in T cells

TCR/CD3- Receptor de antígeno associado ao complexo CD3

TFF3 - trefoil fator 3

TGF- β - Fator de transformação de crescimento (*Transforming Growth Factor- β*)

Th- linfócito T auxiliar (*lymphocyte T helper*)

Th1 - linfócito T auxiliar 1 (*lymphocyte T helper 1*)

Th17- linfócito T auxiliar 17 (*lymphocyte T helper 17*)

Th2 - linfócito T auxiliar 2 (*lymphocyte T helper 2*)

Th3 - linfócito T auxiliar 3 (*lymphocyte T helper 3*)

TIR- Domínio IL-1R

TLRs- Receptores do tipo Toll (*Toll like receptors*)

TMB - 3,3',5,5' *tetramethylbenzidine*

TNBS - ácido 2,4,6-trinitrobenzenesulfônico

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor-alfa*)

Tr1- linfócito T regulador1

Treg - linfócitos T regulador (*T regulatory cell*)

TRP- Aminoácido triptofano

VEGF- *Vascular Endothelial Growth Factor*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Imunologia da mucosa intestinal	21
1.2 Doenças inflamatórias intestinais	27
1.3 Espécies de serpentes e acidente ofídicos	33
1.4 Características gerais da crotoxina do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	34
2 OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo principal	38
2.2 Objetivos específicos	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Camundongos	40
3.2 Purificação da fração crotoxina do veneno de <i>C. d. terrificus</i>	40
3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	40
3.4 Determinação e eliminação de endotoxinas nas amostras de crotoxina	41
3.5 Determinação da concentração proteica das amostras	41
3.6 Indução da inflamação intestinal aguda em camundongos BALB/c	42
3.7 Determinação da dose e tempo de administração da crotoxina	42
3.8 Avaliação clínica dos camundongos e coleta das amostras	43
3.9 Histologia	43
3.10 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de IL-1 β , IL-6, IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-10 e TGF- β	44
3.11 Dosagem da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)	45
3.12 Extração de eicosanoides e ensaio competitivo de detecção de Prostaglandina E ₂ e Lipoxina A ₄	46
3.13 Expressão gênica de citocinas	47
3.13.1 Extração de RNA total	47
3.13.2 Reação de Transcrição Reversa (RT)	48
3.13.3 PCR em Tempo Real	48
3.14 Obtenção e preparo de suspensões celulares a partir de órgãos linfoides de camundongos	49
3.15 Separação de linfócitos da lâmina própria intestinal	50

3.16 Citometria de fluxo	50
3.16.1 <i>Marcação das células provenientes dos linfonodos, placas de Peyer e lâmina própria com anticorpos fluorescentes para análise de populações linfocíticas em citômetro de fluxo</i>	<i>50</i>
3.16.2 <i>Marcação com anticorpos fluorescente para análise de neutrófilos e subtipos de macrófagos da lâmina própria por citometria de fluxo</i>	<i>52</i>
3.17 Tratamento <i>in vivo</i> dos camundongos com anticorpos anti-TGF-β, anti-IL-10 e anti-β-galactosidase	52
3.18 Tratamento dos animais com inibidores da produção de eicosanoides	53
3.19 Análise estatística	54
4 RESULTADOS.....	55
4.1 Obtenção da fração crotoxina do veneno de <i>C.d.terrificus</i>	55
4.2 Estabelecimento da colite experimental aguda e tratamento com a CTX em camundongos BALB/c	56
4.3 Análise histológica de cortes de intestino dos diferentes grupos experimentais	59
4.4 Perfil de citocinas inflamatórias e dosagem da atividade da MPO na porção colônica dos intestinos de animais BALB/c após indução da doença inflamatória intestinal	62
4.6 Secreção de citocinas moduladoras e eicosanoides em camundongos BALB/c com doença inflamatória intestinal e que receberam ou não a CTX	65
4.7 Expressão gênica de citocinas em células linfoides dos camundongos BALB/c dos diferentes grupos experimentais	67
4.8 Análise da expressão de fatores de transcrição em células dos diferentes grupos experimentais	69
4.9 Participação do TGF-β e IL-10 no efeito modulador da CTX sobre a colite experimental aguda.....	72
4.10 Envolvimento dos eicosanoides PGE₂ e LXA₄ no efeito modulador da CTX sobre a inflamação experimental aguda em camundongos BALB/c	78
5 DISCUSSÃO	83
6 CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS*	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 Imunologia da mucosa intestinal

Cerca de 10^{14} microrganismos residem no lúmen intestinal contribuindo e auxiliando no metabolismo de nutrientes, integridade do epitélio assim como no equilíbrio da imunidade local (KURASHIMA et al., 2013). Esses benefícios causados pela flora intestinal sugerem que a co-evolução permitiu selecionar mecanismos que promovem e mantêm a associação entre bactérias e eucariontes (CERF-BENSUSSAN; GABORIAU-ROUTHIAU, 2010).

O sistema imune da mucosa intestinal é composto principalmente por células epiteliais, células dendríticas (DCs), células *natural killers* (NK), linfócitos (espaços intraepiteliais e lâmina própria - LP), células M, além de tecidos linfoides organizados como: placas de Peyer (PP), folículos linfoides isolados e linfonodos mesentéricos (LNMs) (Fig. 1).

Figura 1-Componentes do sistema imune de mucosa

Fonte: Mowat (2003)

As células epiteliais formam uma importante barreira físico-química que limitam o crescimento microbiano e o acesso à superfície do intestino. O epitélio intestinal pode reconhecer produtos microbianos através de sensores como TLR (*Toll-like receptor*) que detectam bactérias, fungos, vírus e protozoários; NLRs (*Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors*), responsáveis por reconhecerem produtos bacterianos, e por fim os RLRs (*RIG-I-like receptor*), os quais reconhecem componentes virais (MACIA et al., 2012). Esses componentes do sistema imune contribuem para integridade e regeneração do epitélio sob constante exposição aos antígenos microbianos, mantendo uma barreira mucosa saudável.

O epitélio intestinal é constituído por uma monocamada celular que inclui: células M, células caliciformes, células de Paneth, células epiteliais colunares, as quais têm papel crítico na manutenção da homeostase local. Essa monocamada celular forma uma barreira conectada com sofisticadas junções celulares, como ocludina, claudina-1 e zônula de oclusão 1 (NIESS et al., 2005; RESCIGNO et al., 2001).

As células de Paneth e as caliciformes são responsáveis pela produção de peptídeos antimicrobianos e mucinas, respectivamente, e ainda auxiliam na transcitose de IgA pelo epitélio colunar (KUROSHIMA et al., 2013). O muco produzido pelas células caliciformes bloqueia adesão direta de bactérias comensais ao epitélio. Neste sentido, foi observado que camundongos deficientes na produção de mucina 2, as bactérias comensais são capazes de alterar a morfologia de células epiteliais e através deste contato direto levam ao desenvolvimento espontâneo de colite e câncer de colo (VAN DER SLUIS et al., 2006). Além disso, antígenos microbianos reconhecidos por TLR2 nas células caliciformes podem estimular a produção de peptídeos como o TFF3 (trefoil fator 3), os quais sinergizam com mucinas aumentando as propriedades protetoras da barreira mucosa intestinal (PODOLSKY et al., 2009). Somado a produção de moléculas antimicrobianas, as células caliciformes também contribuem para homeostase intestinal ao entregarem antígenos de baixo peso molecular às DCs-CD103⁺ tolerogênicas, as quais são capazes de induzir células T reguladoras (MCDOLE et al., 2012).

Outro tipo celular importante no intestino são as células M que também funcionam como porta de entrada para antígenos e frequentemente estão associadas às PP ou aos folículos linfoides isolados. As células M carreadoras de

antígenos estão em contato com DCs encontradas nas regiões interfoliculares e na região subepitelial das placas de Peyer, auxiliando na rápida apresentação de antígenos às células T e B (KUNISAWA et al., 2012).

As DCs do intestino estão presentes no espaço intraepitelial, na lâmina própria e nos tecidos intestinais linfoides organizados. DCs intraepiteliais CX3CR1⁺ penetram a camada celular do epitélio sem causar danos a essa barreira e capturam antígenos do lúmen (NIESS et al., 2005; RESCIGNO et al., 2001). Além de estarem prontas a apresentar antígenos patogênicos para os linfócitos, estas DCs também participam da manutenção do equilíbrio da resposta imune intestinal. DCs mieloides encontradas na cúpula subepitelial das PP produzem IL-10 após ativação por CD40L e podem apresentar antígenos às células T CD4⁺ estimulando-as a produzirem IL-4 e IL-10 (MCDOLE et al., 2012).

Os linfonodos mesentéricos (LNMs) compreendem os maiores gânglios linfoides do corpo. Antígenos capturados por DCs nas PP e lâmina própria são levados aos linfonodos mesentéricos por vasos linfáticos aferentes e assim, são apresentados às células T. Esses linfócitos T se acumulam nos LNMs por meio de moléculas de adesão como L-selectina e $\alpha_4\beta_7$ -integrina, as quais normalmente direcionam os linfócitos para periferia e para as mucosas, respectivamente (WAGNER et al., 1998).

As PP são compostas por folículos ricos em células B circundados por uma malha de células T, chamada de regiões interfoliculares. As células B representam 75% das células encontradas nas PP e podem formar centros germinativos mesmo em condições de homeostasia, devida a constante estimulação com antígenos das bactérias comensais. Nesses centros germinativos há um ambiente propício para ocorrer o *switching* de classe de IgM para IgA nas células B (KUNISAWA et al., 2012). Apenas 20% da população celular das PP são linfócitos T. As células T interfoliculares mantêm principalmente o fenótipo *naïve*, porém nas PP são encontradas células T ativadas do tipo Th1 (T helper 1) produtoras de IFN- γ ; células T do tipo Th2 (T helper 2) produtoras de IL-4, e ainda células T FoxP3 reguladoras produtoras de IL-10 (MCGBEE et al., 1989).

Semelhantes às PP, os folículos linfoides isolados são tecidos linfoides organizados responsáveis pela indução da resposta imune antígeno-específica dentro da mucosa intestinal. Apresentam grande quantidade de células B e algumas

DCs em contato com as células M. Em contraste com as PP, esses folículos não apresentam regiões interfoliculares ricas em linfócitos T, desse modo a maciça produção de IgA nesses locais se dá de forma independente de células T (SODHI et al., 2012).

Abaixo da camada epitelial, na lâmina própria encontram-se também diversas células imunes que participam da resposta inata e adquirida e da manutenção da homeostase entre flora comensal e intestino. Dentre essas células estão os neutrófilos, macrófagos, DCs, linfócitos, mastócitos e as recentemente descobertas células linfoides inatas (ILCs) (KUROSHIMA et al., 2013).

Células linfoides inatas (ILCs) estão envolvidas na manutenção da barreira intestinal, indução da inflamação e regulação do reparo tecidual. Essas células foram divididas em 3 grupos: (1) são caracterizadas como as ILC1 e NKs que expressam T-bet e IFN- γ ; (2) ILC2 (*natural helper cells*), nuócitos e células auxiliaadoras inatas do tipo 2, as quais expressam ROR α (*Retinoic acid receptor (RAR)-related orphan receptor*) e GATA-3, e produzem IL-5 e IL-13; (3) ILC3 (*fetal lymphoid tissue-inducer cells*), NKp46⁺ e NKp46⁻, que expressam ROR- γ t e produzem IL17A, IL-17F e IL-22 (MJÖSBERG et al., 2012; SPITS et al., 2013). Dessas populações, as ILC3, em conjunto com as células T CD4⁺ (Th17 e Th22), mantêm a fonte de IL-22, a qual é uma citocina homeostática crucial para a resposta imune fisiológica desencadeada pelo epitélio (LAMKANFI; DIXIT, 2012). ILC3 produtoras de IL-22 no intestino também são capazes de induzir células epiteliais a secretarem peptídeos microbianos como RegIII- γ auxiliando no controle da inflamação intestinal fisiológica (SATO-TAKAYAMA et al., 2008).

A presença de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) na mucosa e nas criptas epiteliais têm sido usados como marcadores de doença inflamatória intestinal. Massiva infiltração de células polimorfonucleares para dentro das criptas tem sido diretamente correlacionada com sintomas e a injúria da mucosa vista em pacientes com doença inflamatória intestinal. Essas células causam danos na barreira protetora do epitélio, com destruição tecidual por dano oxidativo e proteolítico, e perpetuam a inflamação através da produção de mediadores inflamatórios (BRAZIL et al., 2013).

Monócitos/macrófagos podem desempenhar papel importante na resposta imunológica de mucosas. DCs e macrófagos ativados secretam várias citocinas, as

quais influenciam na diferenciação de células T e consequentemente no desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa. Aumento no número de monócitos recém-recrutados e de macrófagos ativados tem sido encontrado na mucosa de pacientes com doença inflamatória intestinal (SANCHEZ-MUÑOZ et al., 2008).

Diferentes populações funcionais de macrófagos foram descritas em camundongos, como os macrófagos classicamente ativados (M1) ou alternativamente ativados (M2). Os macrófagos do tipo M1 estão relacionados ao desenvolvimento da resposta com padrão Th1, enquanto que os M2 estão envolvidos em resposta do tipo Th2 em diferentes modelos experimentais. Os macrófagos classicamente ativados (M1) apresentam citoplasma granular consistente, comportamento fagocítico ativo, expressão de CD68 (macrosialina), além da expressão de pan-marcadores de macrófagos como F4/80, CD11b e CD115 (MOWAT; BAIN, 2011). Dentro da população de macrófagos, os chamados M2 apresentam propriedades imunorreguladoras e anti-inflamatórias, essas células expressam marcadores de superfície como CD163 e CD206, além de produzirem IL-10 e fatores de remodelagem tecidual como VEGF (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*) (MOWAT; BAIN, 2011). Além dessas características descritas, esses macrófagos não produzem mediadores pró-inflamatórios em resposta a estímulos

Muitas populações celulares contribuem para regulação da resposta imune no intestino, entre elas podemos citar os linfócitos T reguladores (Tregs) e suas subpopulações. Uma das células responsáveis por este efeito são as células T regs naturais (nTregs) CD4⁺CD25⁺ que se desenvolvem no timo e tem capacidade de reconhecer antígenos próprios e não-próprios e desempenhar papel importante na tolerância prevenindo patologias e estimulação crônica do sistema imune (SAKAGUCHI, 2004). O marcador mais específico para as nTregs é o fator de transcrição FoxP3 (*fork head box P3*). O papel relevante dessas células na tolerância intestinal foi evidenciado em ensaios de transferência de CD4⁺CD25⁺ antes de gavagem com *Helicobacter hepaticus*. Neste trabalho foi visto que essas células foram fundamentais para prevenir a inflamação intestinal e concomitante acúmulo de neutrófilos, monócitos/macrófagos, DCs e NKs no fígado e nos linfonodos mesentéricos desses animais (MALOY et al., 2003).

Em outros trabalhos foi demonstrado que algumas células Tregs antígeno-específicas podem ser geradas *de novo* a partir de células FoxP3⁻ sob condições específicas (IZCUE et al., 2006). As células Tregs induzidas (iTregs) compartilham características fenotípicas e funcionais com as nTregs e assim, podem expressar FoxP3, CD25, CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*) e podem produzir TGF- β (CHEN et al., 2003; PARK et al., 2004).

Uma das primeiras populações de células descritas como Tregs foram as Th3, responsáveis por induzir tolerância oral (CHEN et al., 1994). As Th3 parecem depender mais de IL-4 e IL-10 para sobrevivência *in vitro*, enquanto que as nTregs dependem de IL-2 (SETOGUCHI et al., 2005; WEINER et al., 1994). No entanto, há discussões se as Th3 e Tregs FoxP3⁺ são mesmo populações independentes (IZCUE et al., 2006).

Outra população bem descrita de células Tregs são as Tr1 produtoras de IL-10. Essas células podem ser induzidas à diferenciação em condições específicas e diferentemente das nTregs, podem ser FoxP3⁻ (VIEIRA et al., 2004). Similares às Tregs produtoras de IL-10, as Tr1 são induzidas *in vivo* pela administração oral de antígenos (BURKHART et al., 1999), seu desenvolvimento e suas funções são dependentes de IL-10 (O'GARRA; VIEIRA, 2003). Tregs produtoras de IL-10 estão presentes na mucosa intestinal em condições normais inibindo a resposta patogênica à flora intestinal (CONG et al., 2002).

Além das populações de células T reguladoras que são capazes de manter a homeostasia, outros subtipos de células T (Th1, Th2 e Th17) podem estar presentes no intestino. Alguns produtos bacterianos da flora normal podem induzir uma inflamação fisiológica. Neste processo, essas populações de linfócitos T atuam no recrutamento de células da imunidade inata, na produção de mucinas, de peptídeos antimicrobianos e na produção de IgA (CERF-BENSUSSAN; GABORIAU-ROUTHIAU, 2010). O controle desta resposta inflamatória envolve o balanço entre estas populações de linfócitos T e células T reguladoras, fortalecendo a barreira intestinal.

1.2 Doenças inflamatórias intestinais

As doenças inflamatórias intestinais podem afetar o trato gastrointestinal, sendo frequente o acometimento do intestino delgado, colo e reto. Nessas enfermidades idiopáticas, pacientes sofrem de sangramento retal, diarreia severa, dores abdominais, febre, fadiga e perda de peso (FIOCCHI, 1998; SATOR, 2006; STROBER et al., 2007).

A tolerância imunológica é responsável por controlar a inflamação no trato gastrointestinal limitando a resposta contra alimentos e antígenos derivados de bactérias comensais (GEBOES, 1994; KRAUS; MAYER 2005; SARTOR, 1995). Quando esse complexo sistema falha, seja devido a agentes químicos, patogênicos ou predisposição genética ocorre ativação da resposta imunológica causando as doenças inflamatórias intestinais (BRANDTZAEG, 2001; DIGNASS et al., 2004; HOLTSMANN; GALLE, 2004; SARTOR, 1997; SHANAHAN, 2002). Acredita-se ainda, que essas doenças possam estar relacionadas a fenômenos autoimunes (JURJUS et al., 2004).

Esta ativação desregulada do sistema imunológico intestinal desempenha um importante papel na patogênese dessas doenças, visto que pacientes com doença inflamatória intestinal têm presença de extensivo infiltrado inflamatório, edema, perda de células caliciformes, diminuição na produção de muco, hiperplasia de células crípticas e ulceração, observados em cortes histológicos (OSTANIN et al., 2009). Fatores genéticos são importantes moduladores da severidade da doença, porém bactérias comensais entéricas também são requeridas para iniciar e manter a inflamação intestinal ou colônica, a qual é mediada principalmente por linfócitos T (OSTANIN et al., 2009).

Doença de Crohn e colite ulcerativa são as duas principais formas de doenças inflamatórias intestinais. Apesar dessas doenças apresentarem características em comum, algumas diferenças podem ser observadas. A colite ulcerativa primariamente atinge a camada mucosa do colo e do reto, enquanto que a doença de Crohn usualmente afeta toda a parede intestinal e potencialmente pode comprometer outros sítios do trato gastrointestinal, com predileção pela região ileocecal (PODOLSKY, 2002).

Na doença de Crohn observa-se resposta imunológica adaptativa mediada principalmente por células Th1 secretoras de IFN- γ , com ativação dos fatores de transcrição T-bet e STAT-4. Linfócitos secretores de IFN- γ são abundantes na lâmina própria da mucosa intestinal de pacientes com esta doença. Neste mesmo local ocorre aumento nos níveis de IL-18, citocina envolvida na perpetuação da resposta imunológica do tipo Th1 (MONTELEONE et al., 1999; PIZARRO et al., 1999). Foi observado que células Th17 estão envolvidas no desenvolvimento desta doença juntamente com as células Th1 (MAYANARD; WEAVER, 2009). Dambacher et al. (2009) demonstraram número aumentado de células T expressando o fator de transcrição ROR γ t, característico de células Th17, na lâmina própria de pacientes com esta doença. Apesar de células Th1 regularem negativamente a diferenciação de células Th17, alguns trabalhos mostraram a presença de um conjunto de células Th17 capazes também de secretar citocinas do perfil Th1, como o IFN- γ , nos sítios inflamatórios, além das próprias Th1 (ANNUZIATO et al., 2007; ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007).

Já na colite ulcerativa ocorre envolvimento de células Th2, com elevada presença de citocinas IL-13 e IL-5 (MAYANARD; WEAVER, 2009). Outros autores consideram que ambas as doenças podem envolver a ativação de macrófagos causando aumento na produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (KOLIOS et al., 1998; HOLTMANN et al., 2001).

Além dessas, podemos citar as doenças inflamatórias intestinais não-classificadas, encaixadas na zona “cinzenta” de incerteza diagnóstica entre doença de Crohn e colite ulcerativa. O diagnóstico usual das doenças inflamatórias intestinais envolve sinais clínicos, endoscopia, radiologia, histologia e características bioquímicas. Entretanto, essa abordagem pode ser falha, principalmente em caso de sobreposição dos sintomas da colite ulcerativa e da doença de Crohn.

O desenvolvimento de testes com marcadores sorológicos como a pesquisa de anticorpos anti-glicanos ou contra outros antígenos microbianos podem ser úteis na identificação de doença de Crohn. Já a pesquisa de auto-anticorpos contra conteúdo neutrofílico (*anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies*- pANCA) e anticorpos contra células caliciformes (*antibodies against goblet cells*-GAB) são importantes para identificar colite ulcerativa. As evidências atuais sugerem que os painéis sorológicos de múltiplos anticorpos são úteis no diagnóstico diferencial da

doença de Crohn e colite ulcerativa, podendo auxiliar na estratificação de pacientes de acordo com o fenótipo da doença e do risco de complicações, visando melhor terapia (KUNA, 2013).

Produtos secretados por diferentes populações celulares são elementos essenciais na ativação ou manutenção do estado de homeostasia do sistema imunológico e no controle dessas doenças citadas acima. Com atividade imunomoduladora, a IL-10 produzida por linfócitos Th2, células Tregs, macrófagos, linfócitos B e DCs modula as funções das células apresentadoras de antígenos (APCs - *Antigen Presenting Cells*), inibe a produção de IL-2 e citocinas pró-inflamatórias assim como a sinalização intracelular via CD28 (MOORE et al., 2001; GRUTZ, 2005). A presença de TGF- β , juntamente com a IL-10, também tem sido associada à indução de tolerância e geração de células Tregs (DOETZE et al., 2000; GRUTZ, 2005).

As citocinas IL-10 e TGF- β são reconhecidos principalmente pela sua capacidade de modular a resposta imunológica. Nas doenças inflamatórias intestinais essas moléculas desempenham papel crucial na origem e controle da patologia. O desenvolvimento espontâneo de colite em camundongos deficientes em IL-10 mostra a importância desta citocina no controle da resposta contra a flora comensal do intestino (KHUN et al., 1993). A administração de *Lactococcus lactis* capazes de secretar IL-10 melhora a patologia no modelo de colite induzida por DSS (*Dextran sulfate sodium*) em camundongos (STEIDLER et al., 2000), sugerindo que a administração local desta citocina pode ser uma terapia promissora. Além disto, foi observado que a injeção de IL-10 recombinante inibe a colite desenvolvida pela transferência de célula T *naïve* em camundongos (POWRIE et al., 1994).

O TGF- β atua por vários mecanismos e foi demonstrado que pode participar na prevenção da colite por meio da sua indução por células T regs (MILLER et al., 1992; CHEN et al., 1994). Neste contexto, Powrie et al. (1996) mostraram que a injeção de anticorpos monoclonais anti-TGF- β em camundongos aboliu a prevenção da colite mediada por células T reguladoras.

Experimentos realizados em camundongos deficientes em IL-10 e TGF- β demonstraram que as funções destas citocinas nas doenças inflamatórias intestinais podem ser distintas. Camundongos deficientes em IL-10 desenvolveram enterocolite crônica quando a flora bacteriana intestinal estava presente, enquanto que os

deficientes em TGF- β desenvolveram resposta inflamatória em múltiplos órgãos (SHULL et al., 1992; KHUN et al., 1993). Portanto, sugere-se que IL-10 pode estar relacionada principalmente à resposta local, já o TGF- β atua de forma sistêmica inibindo a resposta imunológica.

Prostaglandina E₂ (PGE₂) é descrita como um potente modulador da inflamação e resposta imunológica celular, inibindo a atividade das APCs e produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-12, além de induzir a síntese de IL-10 (HARIZI et al., 2002; HARIZI; NOBERT, 2004). Kuroda e Yamashita (2003) mostraram que a PGE₂, proveniente de macrófagos inibe a produção de IL-12 e IFN- γ por linfócitos Th1.

Na doença inflamatória intestinal o papel da PGE₂ não está bem estabelecido. Sheibainie et al. (2007) observaram que administração do análogo de PGE₂ em altos níveis exacerbou os sinais clínicos da doença, aumentando os níveis de IL-23 e IL-17. Por outro lado, a produção constitutiva de PGE₂ no intestino protege/mantém a integridade do epitélio intestinal, aumentando sua regeneração (COHN et al., 1997; TESSNER et al., 1998; JIANG et al., 2007). Somado a isso, trabalhos mostraram que este eicosanoide inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-12 e induz a síntese de IL-10 por APCs (HARIZI et al., 2002).

Baratelli et al. (2005) verificaram ainda, que a PGE₂ está relacionada com a indução da expressão gênica do fator de transcrição FoxP3 e o aumento da atividade moduladora das células TCD4⁺CD25⁺. Além disso, foi demonstrada a capacidade da PGE₂ em suprimir a expressão do fator de transcrição ROR γ t, a secreção de IL-17 e a diferenciação de células Th17 (CHEN et al., 2009). Outros trabalhos mostraram que PGE₂ está envolvida na mudança da produção de leucotrienos B₄ para a síntese de lipoxinas, como a lipoxina A₄ (LXA₄) que é um produto resultante da ação da 15-lipoxigenase (15-LO) (GODSON et al., 2000; LEVY et al., 2001).

Sobre a regulação da resposta imune adaptativa, Aliberti et al. (2002) mostraram que a produção de LXA₄ *in vivo* esteve acompanhada pela inibição da produção de IL-12 por DCs esplênicas estimuladas *in vitro* com antígenos de *Toxoplasma gondii*. Mediadores lipídicos resultantes da ação da enzima 15-LO sobre produtos do ácido araquidônico também participam na resolução da resposta inflamatória, inibindo o recrutamento de neutrófilos, produção de IL-1 β , IL-8 e IL-6 e

estimulando a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos, bem como a secreção de IL-10, IL-4, IL-13 (GOLDSON et al., 2000; LEVY et al., 2001; SERHAN, 1994).

Novas estratégias terapêuticas para o tratamento das inflamações intestinais têm sido alvo de estudos, como a administração de anticorpo anti-TNF- α . Vários trabalhos demonstraram que antagonistas de TNF- α , como anticorpos monoclonais, têm sido eficazes no tratamento da doença de Crohn levando à diminuição nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, inibição da migração celular para o tecido intestinal, redução da citotoxicidade causada pela ativação do complemento entre outras ações (CHOWERS; ALLEZ, 2010).

Na colite ulcerativa, foi evidenciado que pacientes com a doença moderada ou severa submetidos ao tratamento com anticorpos anti-TNF- α (*Infliximab*) apresentaram remissão dos sintomas clínicos e cicatrização da mucosa intestinal (THUKRAL et al., 2006). No entanto, o mecanismo de ação deste agente ainda não está completamente esclarecido

Os tratamentos clínicos para doenças inflamatórias intestinais podem ser iniciados com antibióticos, como a sulfasalazina e a mesalazina. Em caso dos pacientes não responderem a esses medicamentos, imunossupressores são administrados: a prednisona para colite ulcerativa, e azatioprina e 6-mercaptopurina para doença de Crohn. Combinados aos imunossupressores, o uso de anticorpos como o *Infliximab* (anti-TNF- α), como citado anteriormente, tem sido indicado para indução e manutenção da remissão da doença. Além disso, o tratamento cirúrgico por meio de ressecção ou enteroplastia são recomendados em pacientes com doença de Crohn que apresentam intratabilidade clínica ou doença refratária (HABR-GAMA et al., 2008).

Para auxiliar no entendimento dos mecanismos envolvidos nas doenças inflamatórias intestinais, existem entre trinta diferentes modelos experimentais desenvolvidos em camundongos e ratos, os quais são agrupados de acordo com a natureza da inflamação desenvolvida ou o método de indução da doença (ELSON et al., 2005). Dentre os modelos de estudo de doenças inflamatórias intestinais, existem os que utilizam animais com deleção de alguns genes como os de síntese de IL-2, IL-10, receptor para de IL-2, fatores de transcrição para diversas citocinas, mutações em genes do HLA ou animais transgênicos para alta expressão de RNA

mensageiro para IL-17. Há também modelos induzidos por transferências de células do sistema imune, como células T expressando altos níveis da molécula CD45RB (JURJUS et al., 2004). Em comum, todos esses modelos buscam contribuir para o entendimento do papel dos componentes imunes na regulação da colite ulcerativa e doença de Crohn (JURJUS et al., 2004).

Além dos modelos acima descritos, a indução por agente químico como a administração do hapteno ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) é bastante útil para o estudo da resposta inflamatória observada na doença intestinal. Este modelo caracteriza-se pela instilação retal do ácido TNBS combinado ao etanol, que é responsável por quebrar a barreira na mucosa intestinal permitindo, portanto que o TNBS combinado às proteínas autólogas ou aos antígenos provenientes da microbiota intestinal sejam reconhecidos pelo sistema imune (MORRIS et al., 1988; WIRTZ et al., 2007). Como resultado da instilação do hapteno, os camundongos desenvolvem reação de hipersensibilidade do tipo tardia que progride para colite crônica, a qual é caracterizada pela presença de granulomas com células inflamatórias em todas as camadas do intestino, macrófagos produtores de IL-12 e linfócitos secretores de altos níveis de IFN- γ e IL-2. Este mesmo padrão de resposta Th1 observado em camundongos BALB/c é relatado na doença de Crohn (JURJUS et al., 2004; NEURATH et al., 1995; NEURATH et al., 1996).

Neste modelo de administração do TNBS foi demonstrada a participação do *background* genético para o desenvolvimento da colite, ou seja, camundongos SJL/J são altamente suscetíveis, BALB/c são menos suscetíveis, enquanto que os da linhagem C57BL/6 são mais resistentes ao desenvolvimento da doença (VELDE et al., 2006). Neste sentido, foi mostrado que esta suscetibilidade dos camundongos SJL/J está associada à alta produção de IL-12 em relação aos camundongos C57BL/6 (BOUMA et al., 2002). No entanto, em camundongos BALB/c *wild type* observa-se que a colite induzida pelo TNBS é dependente da resposta inflamatória do tipo Th1, enquanto que em camundongos BALB/c deficientes em IFN- γ a inflamação intestinal está associada à resposta imune com o perfil Th2 (DOHI et al., 1999; NEURATH et al., 1995; NEURATH et al., 1996). Além da participação de citocinas do perfil Th1, Zhang et al. (2006) em modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS mostraram que há produção de IL-17 no colo intestinal após 24 e 48h da indução do modelo. Esses mesmos autores observaram que animais

deficientes para o receptor de IL-17 apresentaram maior proteção contra o desenvolvimento da inflamação intestinal em comparação aos animais *wild type*.

1.3 Espécies de serpentes e acidente ofídicos

Existem aproximadamente 3.000 espécies de serpentes e dentre elas 410 são consideradas peçonhentas. No Brasil 256 espécies estão catalogadas sendo 69 delas peçonhentas (FEITOSA et al., 1997; PINHO et al., 2000). Acidentes ofídicos representam um grave problema de saúde pública principalmente em regiões tropicais e subtropicais (ADUKAUSKIENÉ et al., 2011; KASTURIRATNE et al., 2008). Cerca de 420.000 mil a 2.280.00 milhões de pessoas por ano sofrem este tipo de acidente e aproximadamente 20.000 a 125.000 desses casos evoluem para óbito (HUANCAHIRE et al., 2011; WARRELL, 2010).

Na América do Sul, o Brasil é o país com maior número de acidentes ofídicos, sendo as regiões Centro-Oeste e Norte as mais notificadas em número de casos (LIMA et al., 2009; NADUR-ANDRADE et al., 2012). Registra-se por volta de 30.000 casos de envenenamentos ofídicos por ano decorrentes da atividade fisiológica das serpentes como defesa, busca de alimento e reprodução (BRASIL, 1998; CARDOSO et al., 2003).

Dentre os acidentes ofídicos observados, quatro tipos estão em destaque pela sua frequência e/ou quadro clínico: botrópico, crotálico, laquético e elapídico. Portanto, as serpentes cujos envenenamentos desencadeiam quadros de interesse clínico no Brasil pertencem à família *Viperidae*, subfamília *Crotalinae*, gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* (conhecidas vulgarmente como jararaca e/ou urutu, cascavel e surucucu, respectivamente) e à família *Elapidae* da espécie *Micrurus*, conhecida popularmente como coral verdadeira (NOGUEIRA, 2004). A epidemiologia dos acidentes ofídicos aponta para um perfil que se mantém inalterado ao longo dos últimos 100 anos no Brasil, sendo a maioria deles atribuída ao gênero *Bothrops*. Entretanto, na ausência de soroterapia a maior letalidade observada é resultante dos acidentes com serpentes do gênero *Crotalus* (BARRAVIERA, 1993; CARDOSO et al., 2003).

A incidência de acidentes por picadas de *Crotalus* perfaz cerca de 6 % dos casos registrados no Brasil com taxa de mortalidade estimada de 1,8 % por ano

(GUIDOLIN, et.al., 2013). Segundo o Sinan, no ano de 2013, foram notificados 1578 casos de indivíduos acidentados por serpentes do gênero *Crotalus* e 15 casos de pacientes que foram a óbito.

As serpentes desse gênero compreendem uma única espécie, *Crotalus durissus* (*C.d.*), que pode ser subdividida em seis subespécies de acordo com a sua coloração e distribuição geográfica (PINHO, 2001; CARDOSO et al., 2003). Essas serpentes são robustas, pouco ágeis e apresentam como característica mais evidente a presença de chocalho ou guizo na extremidade caudal (CARDOSO et al., 2003). As serpentes *Crotalus* estão distribuídas em regiões áridas e rochosas, de baixa vegetação, sendo raramente encontradas em floresta.

Os acidentes crotálicos podem ser classificados em leves, moderados e graves. Na forma leve há sinais e sintomas neurotóxicos discretos, o quadro moderado apresenta-se com manifestações neurotóxicas intensas, fâcies miastênica, mialgia espontânea discreta ou provocada ao exame. Já no quadro grave, a fâcies miastênica está sempre presente, a mialgia é intensa, a urina é escura, podendo haver oligúria ou anúria (SANTOS, 2004). Em qualquer um dos casos, o tratamento fundamental consiste na aplicação do soro antiveneno, por via venosa, o mais rapidamente possível. A evolução favorável do quadro depende da precocidade na instalação da soroterapia (AZEVEDO-MARQUES et al., 2003).

Os efeitos clínicos observados nos envenenamentos por *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus* e *C.d. cascavella* são causados devido a ação das toxinas presentes no veneno, sendo as principais: crotamina, convulxina, giroxina e crotoxina, além de peptídeos e outras enzimas, como L-aminoxidase, trombina-símile, fosfodiesterases, atividade de calicreína tipo tissular e NAD-hidrolase, que causam importantes efeitos bioquímicos, farmacológicos e imunológicos (BERCOVICI et al., 1987).

1.4 Características gerais da crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*

A elevada toxicidade do veneno de *C.d.terrificus* é atribuída à crotoxina (CTX), a qual representa cerca de 60% da composição do veneno. Esta toxina é responsável pelo bloqueio da transmissão neuromuscular, tem efeito miotóxico em altas concentrações, e ainda pode induzir letalidade *in vivo* (BON et al., 1989; GOPALAKRISHNAKONE; HAWGOOD, 1984). Além destes efeitos, a CTX

apresenta atividade anti-inflamatória, moduladora da resposta imunológica adaptativa, antitumoral, antimicrobiana e analgésica (CARDOSO et al., 2001; CARDOSO E MOTA, 1997; DA SILVA; SAMPAIO; GONÇALVES, 2013; GARCIA et al., 2003; FAVORETTO et al., 2011; LANDUCCI et al., 1995; SOUSA-E-SILVA et al., 1996; SAMPAIO et al., 2010).

A CTX é um heterodímero, de aproximadamente 24kDa, resultante da associação não-covalente de um polipeptídeo ácido a um polipeptídeo básico. O polipeptídeo ácido é conhecido como crotapotina (CA), com peso molecular entre 8,9 kDa, e não apresenta atividade tóxica ou enzimática. Já o polipeptídeo básico (CB) de 14 kDa, conhecido também por fosfolipase A₂ (PLA₂), possui toxicidade e uma forte atividade enzimática (FRAENKEL-CONRAT; HENDON, 1971; RUBSAMEN et al., 1971). A subunidade CA tem função de chaperona ao carrear a subunidade PLA₂ para seu receptor na membrana celular, onde há dissociação das subunidades e ação efetora desta segunda fração (BON et al., 1988; COSTA et al., 2001).

As PLA₂ são enzimas que participam de vários processos biológicos, incluindo a homeostasia das membranas celulares, digestão de lipídeos, transdução de sinais e produção de mediadores lipídicos, tais como eicosanoides e derivados de lisofosfolipídeos (VALENTIN; LAMBEAU, 2000). Os efeitos tóxicos das PLA₂ estão relacionados à sua ligação a sítios específicos localizados na superfície de células-alvo. Estudos utilizando PLA₂ neurotóxicas identificaram dois tipos de receptores, tipo-N e M (LAMBEAU; LAZDUNSKI, 1999).

Os primeiros a serem identificados foram os receptores do tipo-N presentes em maior nível em membranas do cérebro de ratos, sendo compostos de, pelo menos, dois sítios de ligação de alta afinidade. Estes receptores ligam com alta afinidade uma variedade de PLA₂ neurotóxicas, inclusive a CTX, sugerindo que esta ligação aos receptores tipo-N pode ser crucial para o efeito neurotóxico destas PLA₂ (LAMBEAU; LAZDUNSKI, 1999).

O receptor do tipo-M foi identificado em músculos esqueléticos de coelho e se liga com alta afinidade a PLA₂ não-neurotóxicas. Este receptor já foi clonado e sequenciados de várias espécies incluindo a humana (LAMBEAU et al., 1994), e apresentou uma organização estrutural semelhante aos receptores de manose localizados em macrófagos, aos receptores DEC-205, identificados em DCs e aos

receptores lâmbda para lectinas localizados em células endoteliais (LAMBEAU; LAZDUNSKI, 1999).

Segundo trabalhos revisados por Sampaio et al. (2010) a CTX liga-se à superfície celular via receptores específicos ou é internalizada via endocitose ou via reciclagem de vesículas sinápticas. A CTX pode também interagir diretamente com a membrana plasmática por hidrólise de fosfolipídeos, alterando a permeabilidade da membrana, perda de seletividade de íons e entrada de Ca^{+2} extracelular, o que aumenta a exocitose de acetilcolina nervo-terminal e a hipercontratura das fibras musculares. A ativação desses vários mecanismos resulta no bloqueio neuromuscular e dano tecidual por necrose.

Com relação à atividade imunomoduladora do veneno crotálico assim como de suas frações, Cardoso e Mota (1997) demonstraram que o veneno total e a CTX, porém não as subunidades CA ou CB isoladas, inibem a produção de IgG1 anti-ovalbumina (OVA), o que sugere que a integridade da toxina é necessária para sua atividade imunossupressora.

Em modelo experimental de neurite autoimune em ratos Lewis foi mostrado que tratamento com crotapotina (CA) resulta em diminuição de infiltrados inflamatórios no nervo ciático e proliferação de linfócitos quando comparados aos ratos controles (doentes), mostrando que esta substância pode modificar os eventos iniciais da indução da doença, atuando provavelmente na migração de células T auto-reativas para o sistema nervoso periférico (CASTRO et al., 2007). A terapia com a crotapotina reduziu marcadamente a resposta proliferativa de linfócitos T encefalitogênicos sem causar modificação na expressão de moléculas co-estimuladoras em macrófagos peritoneais murinos, resultando na redução da severidade da encefalomielite autoimune experimental (GARCIA et al., 2004).

Sampaio et al. (2003) observaram que a CTX inibiu o espriamento de macrófagos e sua atividade fagocítica *in vivo* e *in vitro*, os autores constataram que este fenômeno é mediado pela subunidade CB (PLA_2), e não pela CA (SAMPAIO et al., 2005). A inibição da função de macrófagos pela CTX envolve aumento de F-actina citoplasmática levando a anormal reorganização de actina (SAMPAIO et al., 2006a). Além disso, em uma série de trabalhos foi demonstrado que uma única injeção de CTX inibe o edema de pata, migração celular e interações entre os leucócitos e o endotélio após administração de carragenina. Esses efeitos foram

mediados pela ativação de receptores peptídeo-formil, diminuição da expressão de moléculas de adesão (P-selectina e ICAM-1) e inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias (NUNES et al., 2007; NUNES et al., 2010).

Cardoso et al. (2001) e Chisari et al. (1998) mostraram que a CTX aumentou a produção de acetilcolina e níveis de corticosterona no soro, assim pode-se considerar o envolvimento de glicocorticoides nos mecanismos mediados pela CTX.

Costa et al. (2013) mostraram que o co-cultivo de macrófagos pré-tratados com CTX com uma linhagem de células de carcinoma de ratos (LLC-WRC 256) reduziu o crescimento tumoral, além de aumentarem níveis de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) e NO (óxido nítrico) nas culturas, IL-1 β e do eicosanoide LXA₄. Os efeitos moduladores da CTX podem ser desempenhados pela ligação dessa toxina em receptores peptídeo-formil. Ao bloquear o sítio de ligação desses receptores com o uso do antagonista seletivo Boc-2 (butoxycarbonyl 2), a CTX teve prejudicada sua atividade inibitória da proliferação tumoral (COSTA et al., 2013).

Considerando todas essas informações e o desequilíbrio na resposta imunológica nas doenças inflamatórias como a colite ulcerativa e a doença de Crohn, novas terapias tem sido propostas para o tratamento destas desordens intestinais. Neste contexto, torna-se interessante o estudo da ação de substâncias como a crotoxina em modelos experimentais de doenças inflamatórias no intestino, visando compreender melhor suas propriedades imunomoduladoras bem como os mecanismos de regulação destas doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o efeito da CTX, isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, no modelo experimental de inflamação aguda no intestino induzida pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) combinado ao veículo (etanol) em camundongos BALB/c.

2.2 Objetivos específicos

Assim, tivemos como objetivos específicos deste trabalho:

1º) Purificação da CTX do veneno total de *C. d. terrificus* eliminando possíveis contaminações dessa amostra para futuro uso terapêutico no modelo experimental proposto;

2º) Estabelecimento da doença intestinal aguda em camundongos da linhagem BALB/c por meio da instilação intrarretal do ácido 2,4,6- trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) combinado ao etanol, acompanhando diariamente o peso e os sinais clínicos da doença;

3º) Estabelecimento da dose e tempo de administração da CTX nesta inflamação experimental do intestino;

4º) Estudo do efeito da crotoxina no modelo experimental proposto por meio de:

- a) Investigação da resposta imune nos intestinos dos animais por análises histopatológicas, dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO), determinação dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias, e de eicosanoides (PGE₂ e LXA₄);
- b) Análise da expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias nas células de linfonodos inguinais, periaórticos, mesentéricos e placas de Peyer;

- c) Estudo do fenótipo de linfócitos T provenientes dos linfonodos, placas de Peyer e da lâmina própria intestinal;
- d) Estudo do fenótipo de macrófagos provenientes da lâmina própria intestinal;
- e) Estudo da participação de TGF- β e IL-10 na modulação exercida pela CTX sobre a inflamação intestinal aguda *in vivo* com a utilização de anticorpos monoclonais anti-TGF- β e anti-IL10;
- f) Estudo do papel da LXA₄ e PGE₂ na modulação da inflamação intestinal aguda exercida pela CTX utilizando o inibidor não seletivo de lipoxigenase - NDGA (*Nordihydroguaiaretic acid*) e inibidor da cicloxigenase - Indometacina (INDO), respectivamente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Camundongos

De acordo com nossos protocolos experimentais foram usados camundongos machos com 7-8 semanas de idade com 22 a 24 gramas de peso corporal, da linhagem BALB/c provindos do Biotério Central do Instituto Butantan. O uso dos animais de experimentação foi aprovado no Instituto de Ciências Biomédicas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) protocolo nº 80 e pela Comissão de Ética no uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) protocolo nº 719/10. Os animais ficaram por 4 dias em período de aclimação no biotério da Laboratório de Imunopatologia antes de serem utilizados na experimentação.

3.2 Purificação da fração crotoxina do veneno de *C. d. terrificus*

A purificação da fração CTX do veneno de *C.d.terrificus* foi realizada segundo o método descrito por Faure e Bon (1987), com algumas modificações. Alíquotas de veneno diluídas em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) 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 proteica determinada pelo método de Bradford (1976).

3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Amostras de CTX foram analisadas por eletroforese. Para tanto, 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 2,0M 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. Foi utilizado o padrão molecular “*Trail Mix Protein Markes*” (Novagen). O tampão de corrida foi 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 hora 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.

3.4 Determinação e eliminação de endotoxinas nas amostras de crotoxina

Antes da realização dos experimentos, o conteúdo de endotoxinas bacterianas (LPS) presente nas amostras de CTX foi avaliado utilizando o ensaio imunoenzimático de *Limulus amoebocyte lysate* (LAL) (Cambrex/Lonza), realizado no laboratório de Microbiologia do Controle de Qualidade da Divisão de Produção, do Instituto Butantan. O laudo técnico fornece a quantidade de endotoxinas presente em cada amostra e seu diluente com limite mínimo de detecção de 0,125 EU/mL. Quando as amostras apresentaram níveis de endotoxinas acima deste limite de detecção, estas foram submetidas à coluna de polimixina para a retirada destes contaminantes seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante (Thermo-Scientific, USA). Em seguida, as amostras foram novamente avaliadas em ensaio de LAL. Na ausência de endotoxinas, estas foram utilizadas nos ensaios experimentais.

3.5 Determinação da concentração proteica das amostras

A concentração proteica das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976). Para isto, as amostras foram diluídas em PBS e distribuídas em placas de 96 poços (Costar) em volume de 50 µL. Como curva padrão foi utilizada solução de soro albumina bovina (BSA) na concentração de 500 µg/mL diluída na razão 1:2 (50 µL/poço). Após a distribuição das amostras e da curva-padrão foram acrescentados 150 µL/poço do reagente de Bradford previamente diluído em água destilada (1:5).

A placa foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. O cálculo da concentração das amostras foi feito utilizando o programa INSTAT tendo

como referência as densidades ópticas obtidas das amostras em relação à curva-padrão de BSA.

3.6 Indução da inflamação intestinal aguda em camundongos BALB/c

A fim de estabelecer o modelo de inflamação intestinal no maior número de camundongos/grupo (n=4-6) e menor índice de mortalidade, a indução da inflamação foi padronizada com a instilação retal de 2,5 mg do reagente TNBS dissolvido nas seguintes concentrações de etanol: 35, 40, 45 ou 50% (ZHANG et al., 2006). Para tanto, os grupos de camundongos foram anestesiados com solução fisiológica contendo quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Os animais receberam lentamente 100 µL da solução TNBS por meio de um cateter de 3,5 F acoplado à seringa de 1 mL (FIORUCCI et al., 2002). Para controle da indução, um grupo de camundongos recebeu 100 µL de solução contendo apenas etanol (35% a 50%). Os animais permaneceram em decúbito dorsal até a recuperação anestésica para evitar retorno do reagente aplicado na indução. O protocolo de indução da inflamação intestinal aguda foi estabelecido pela instilação retal de 2,5 mg de TNBS dissolvido em 45% de etanol e utilizado nos demais experimentos.

3.7 Determinação da dose e tempo de administração da crotoxina

Após a padronização da indução da inflamação intestinal, 300 µL da CTX foram administrados via intraperitoneal (ip.) de acordo com o esquema experimental abaixo (Figura 2). Foram testadas três concentrações de CTX (0,090; 0,070 e 0,045 mg/Kg). A escolha das doses de CTX foi baseada na DL50 de $0,095 \pm 0,015$ mg/Kg ip. administrada em camundongos CD-1 descrita por Okamoto et al. (1992) e em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório. Como controle do tratamento, grupos de camundongos receberam apenas 300 µL de PBS (ip).

Determinada a dose adequada para o modelo, foi testada a influência do tempo de administração da CTX. Desta forma, a CTX foi injetada 18 h antes ou após a indução do modelo de inflamação intestinal aguda.

Figura 2 - Esquema representativo dos grupos usados no protocolo experimental quanto à indução do modelo de inflamação e tratamento com CTX.

3.8 Avaliação clínica dos camundongos e coleta das amostras

A avaliação clínica dos camundongos foi realizada diariamente após a indução da inflamação aguda e administração da CTX, tendo como exemplo o CDAI (*Crohn's Disease Activity Index*) utilizado para os pacientes com doença de Crohn. Os seguintes parâmetros foram usados para cálculo: a) perda de peso (nenhuma = 0 pontos; de 1 a 5% = 1 pt.; de 5 a 10% = 2 pts; de 10 a 15% = 3 pts; acima de 15% = 4 pts.); b) consistência das fezes/diarreia (normal = 0 pontos; fezes moles = 2 pts.; muco perianal excretado, prolapso retal e/ou diarreia = 4 pts). A soma dos parâmetros perda de peso e consistência das fezes resultou em um CDAI de score variável entre 0 (não afetado) e 8 pontos (doença severa), adaptado de ALEX et al. (2009).

Ao término de 4 dias da indução da doença inflamatória intestinal aguda, os animais foram sacrificados e o colo intestinal coletado e segmentado para a realização de diversas análises, como descrito abaixo. Também foram extraídos os linfonodos inguinais, mesentéricos, periaórticos e as placas de Peyer dos diferentes grupos experimentais.

3.9 Histologia

O segmento perirretal (0,5 cm) foi destinado às análises histopatológicas. Esse tecido foi fixado em formalina neutra 10%, desidratado, embebido em parafina e seccionado (4 μ m de espessura). Os cortes obtidos foram corados com hematoxilina-eosina e avaliados em microscópio de luz para estudo da inflamação tecidual de acordo com um score histológico. Os seguintes parâmetros foram

usados para cálculo: a) dano epitelial (nenhum = 0 pts; mínima perda de células caliciformes = 1pt; extensiva perda de células caliciformes = 2 pts; mínima perda de criptas e extensiva perda de células caliciformes = 3 pts; extensiva perda de criptas = 4 pts); b) infiltrado inflamatório (nenhum= 0; infiltrado em torno das criptas = 1 pt; presença de infiltrado na mucosa = 2 pts; infiltrado extensivo na mucosa com edema= 3 pts; infiltrado na submucosa = 4 pts). O index de atividade histológica foi calculado através da soma dos score de dano tecidual e infiltrado inflamatório variando entre 0 pontos (não afetado) a 8 pts (doença severa), adaptado de Alex et al.(2009).

3.10 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de IL-1 β , IL-6, IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-10 e TGF- β

A porção colônica do trato intestinal foi dividida em partes iguais longitudinalmente, e uma delas foi destinada a avaliar a produção de citocinas pelo método de ELISA. Logo após a coleta, essas amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido, acondicionadas em freezer -80°C para posterior análise das citocinas.

Os colos intestinais descongelados de cada grupo foram homogeneizados em solução contendo 10 mM de Tris-HCL, 1mM de EDTA, 1% de Triton X-100 e 2mM de PMSF (*PhenylmethylsulfonylFluoride* - Sigma, St. Louis, USA). Foi adicionado à solução 1 μ L/mL de coquetel inibidor de protease (Sigma, St. Louis, USA). Os tecidos homogeneizados foram centrifugados a 11.000 x g por 10 min/4 °C, e os sobrenadantes foram coletados para dosagem de citocinas, adaptado de Zhang et al. (2006).

Placas de ELISA (Costar, Reino Unido) foram sensibilizadas com anticorpo anti-IL-1 β , anti-IL-6, anti-IL17, anti-IFN- γ , anti-TNF- α , anti-IL-10 e anti-TGF- β em PBS (100 μ L/poço) e incubadas por 18 h/temperatura ambiente (TA). Após esse período, as placas foram lavadas com solução PBS+0,05% Tween 20 (PBST; Sigma, St. Louis, USA) e bloqueadas com 200 μ L/poço de solução de PBST contendo 10 % de soro fetal bovino (SFB) para dosagem de TGF- β . Para dosagem das demais citocinas a solução de PBS contendo 1% de Soro Albumina Bovina (Sigma, St. Louis, USA) foi empregada como bloqueio por 1 hora. Ao final da incubação, foram realizadas 3 lavagens com PBST e adicionados 100 μ L/poço das

citocinas recombinantes diluídas na razão 1:2 em reagente diluente assim como as amostras de sobrenadantes.

Para a ativação do TGF- β presente nos sobrenadantes, 100 μ L das amostras foram incubadas com 20 μ L de solução de HCl (1N) por 10 minutos e, em seguida, foram adicionados 20 μ L de solução de NaOH 1,2 N/0,5 M de Hepes, conforme orientações do fabricante do “kit” (R&D Systems, Minneapolis, USA).

As placas foram incubadas com as amostras e citocinas recombinantes por 2 h/TA e em seguida, foram lavadas em PBST. Anticorpos biotinilados anti-IL-1 β , anti-IL-6, anti-IL17, anti-IFN- γ , anti-TNF- α , anti-IL-10 e anti-TGF- β foram adicionados às placas (100 μ L/poço) e realizada nova incubação de 2 h/TA. Outras três lavagens em PBST foram feitas e adicionados 100 μ L/poço do conjugado estreptoavidina-peroxidase. As placas foram novamente incubadas por 30 min/TA.

Em seguida, outro ciclo de 3 lavagens foi realizado e a reação revelada pela adição de 100 μ L/poço do substrato contendo o cromógeno TMB (3,3',5,5' *tetramethylbenzidine* - eBioscience San Diego, CA, USA). A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 0,2 M e a leitura feita em leitor de ELISA a 450 nm. O cálculo da concentração das citocinas presentes nas amostras foi realizado a partir da curva-padrão obtida com as concentrações conhecidas das citocinas recombinantes. Os resultados foram expressos como a média da concentração das citocinas obtidas nas amostras individuais de cada grupo $\pm$ desvio padrão.

3.11 Dosagem da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)

A MPO foi determinada utilizando-se o método descrito por Bradley et al. (1982) com modificações. A porção colônica intestinal foi homogeneizada em solução de 0,5% de *hexadecyl trimethyl ammonium bromide* (HTAB) (Sigma, St. Louis, USA) contendo 50 mM de tampão de fosfato de potássio (pH 6,0). As amostras foram congeladas rapidamente em nitrogênio líquido. Em seguida, estas foram incubadas a 37 °C/2 min em banho-maria e ultrassonicadas por 1 min. Após a repetição deste processo, as amostras foram centrifugadas a 11000 x g/10 min/ 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados e utilizados (50 μ L) para determinação da atividade da enzima em solução de tampão de fosfato de potássio, contendo 20 mg/mL de o-dionisidinadiidroclorido e 20 mM de peróxido de hidrogênio 30%. A

concentração proteica do tecido também foi medida para ajuste dos valores de MPO utilizando o “*Kit BCA protein assay reagent A and B*” (Thermo Scientific, USA). A absorbância da reação foi mensurada através de espectrofotômetro e a leitura realizada a 460 nm para MPO e a 562 nm para dosagem de proteína. Os resultados foram expressos em unidades de MPO/mg de proteína.

3.12 Extração de eicosanoides e ensaio competitivo de detecção de Prostaglandina E₂ e Lipoxina A₄

As porções colônicas de tecido intestinal foram maceradas e homogeneizadas em reagente diluente fornecido por cada kit (R&D Systems, Minneapolis, USA- para detecção de PGE₂; Neogen, USA - para detecção de LXA₄). Em seguida essas amostras foram centrifugadas a 11.000 x g/10 min/ 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados e destinados a extração desses eicosanoides utilizando as colunas *C₁₈Sep-Pak light column* (Waters Corporation, Massachusetts, USA). As colunas foram lavadas primeiramente com 10 mL etanol (P.A.), seguida de 20 mL de água ultrapura. Os sobrenadantes foram normalizados para pH 3,5 com HCL 0,1N e aplicados nas colunas. Para retirada de impurezas e substâncias que não apresentavam afinidade com as colunas C₁₈ procedemos com a lavagem das mesmas com 10 mL de água ultrapura, seguida de 1 mL de etanol 35%. Os eicosanoides foram eluídos através da passagem de 1 mL de etanol P.A. pelas colunas e coletados em microtubos através do sistema MANIFOLD. Essas amostras foram liofilizados à vácuo em banho de nitrogênio e posteriormente ressuspensas em 250 µL de reagente diluente específico para cada “kit”. Em seguida, ensaios foram realizados para determinar as diluições apropriadas das amostras que estariam com as densidades ópticas adequadas para os cálculos de concentração de acordo com a curva-padrão. A partir desses resultados, as amostras foram aliqüotadas na diluição de 1:500 e 1:1000 em freezer -80 °C para futuro uso nos ensaios de ELISA competitivo.

A dosagem de PGE₂ e LXA₄ foram realizadas em placa de 96 poços pré-sensibilizada com anticorpos IgG anti-PGE₂ ou anti-LXA₄, nas quais foram adicionadas as amostras ou os padrões contendo PGE₂ ou LXA₄ (50 µL/poço). Para a quantificação de PGE₂, após a incubação, foram adicionados 50 µL/poço de anticorpo primário anti-PGE₂ e o mesmo volume do conjugado de PGE₂-

estreptoavidina-peroxidase em cada poço, exceto em uma fileira (branco da reação) e realizada incubação de 2 h/TA. Na detecção de LXA₄ foi adicionado apenas 50 µL/poço do conjugado de LXA₄-peroxidase de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram incubadas durante 2h/TA.

Após as incubações, as placas foram lavadas 4 vezes com 300 µL/poço com o tampão de lavagem específico de cada “kit”. O substrato contendo a mistura dos reagentes A e B (vol/vol), fornecidos nos “kits”, foi adicionado (150 µL/poço) e as placas incubadas por 30 min/TA. Ao final, a reação foi interrompida com a adição de 50 µL/poço da solução *stop* (proveniente dos “kits”) e a leitura das placas realizadas em 450 nm em espectrofotômetro. O cálculo da concentração dos eicosanóides nas amostras foi realizado a partir da curva padrão de PGE₂ (1250 a 19,5 pg/mL) e de LXA₄ (2000 a 20 pg/mL).

3.13 Expressão gênica de citocinas

3.13.1 Extração de RNA total

Suspensões celulares preparadas a partir dos linfonodos mesentéricos, periaórticos, inguinais e placas de Peyer foram ajustadas para 1×10^7 e centrifugadas por 8 min/500 x g/4 °C. Os sobrenadantes foram removidos e as células ressuspensas em 1,0 mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), transferidas para um microtubo livre de RNase e centrifugadas por 10 min/13500 x g/4 °C. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio para cada 1,0 mL de reagente utilizado, estes foram agitados vigorosamente por 15 segundos e mantidos por 2-3 min/TA. Após este período, as amostras foram centrifugadas novamente por 10 min/13500 x g. A fase aquosa (superior) resultante foi transferida para um microtubo novo e a este foram adicionados 250 µL de isopropanol. Após 10 minutos, as amostras foram centrifugadas (10 min/13500 x g) e o sobrenadante descartado. O precipitado (RNA) foi lavado com 1,0 mL de etanol 75% e centrifugado (10 min/13500 x g). O sobrenadante foi descartado novamente, o tubo contendo o precipitado foi mantido aberto em fluxo laminar por 1 hora (secagem) e, em seguida, o precipitado foi ressuspenso em 30 µL de água livre de RNase (Promega, Brasil). A concentração de RNA foi quantificada conforme procedimento descrito por

Sambrook et al. (1989), onde a absorbância em 260 nm = 1 significa uma solução contendo 40 µg de RNA. A pureza do RNA foi determinada através da razão entre as absorbâncias obtidas em 260 e 280 nm (razão entre 260/280 maior que 1,7). Todo o material utilizado foi manipulado em um ambiente livre de RNase.

3.13.2 Reação de Transcrição Reversa (RT)

A reação de transcrição reversa do RNA mensageiro (mRNA) para DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando-se o *Kit-Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para cada reação foi realizada uma mistura dos seguintes reagentes: 1 µg de RNA, 1 µL de oligo (dT)₂₀ 50 µM; 1 µL de dNTP Mix (10 mM) e completado o volume final para 13 µL com água destilada estéril. Esta mistura foi aquecida a 65 °C/5 min e resfriada em banho de gelo por mais 5 min. Ao conteúdo do tubo, foi acrescentado: 4 µL de 5x *First-Strand buffer*; 1 µL DTT 0,1M; 1 µL *Rnase OUT* (40 U/µL) e 1 µL de *Superscript III* (200 U/µL). A mistura foi incubada por 50°C durante 60 minutos e depois a 70 °C por 15 minutos para inativar a reação. Após a reação de transcrição reversa, o cDNA obtido foi estocado em freezer -80 °C.

3.13.3 PCR em Tempo Real

A expressão gênica de IL-1, IL-6, IFN-γ, TGF-β e IL-10 foi realizada utilizando o *kit* qPCR – *Sybr Green Rox Plus* - (LGC Biotecnologia, Teddington, Middlesex, UK.) nas seguintes condições: 6,5 µL de solução Sybr Green SuperMix; 1 µL primer anti-senso (5 pM); 1 µL primer senso (5pM); 0,25 µL de ROX *Reference Dye*; 2,25 µL água livre de RNase e 1µL cDNA (500ng) para um volume final de 12 µL de reação. As condições das corridas foram: 95 °C – 15 min (temperatura de ativação da enzima TaqStart – DNA Polimerase), 95 °C- 15 s (temperatura de desnaturação), 58°C- 30 s (temperatura de anelamento), 72 °C- 30 s (temperatura de extensão), seguida por um ciclo para detecção da Curva de *melting* de cada produto amplificado, de 95 °C a 65 °C diminuindo 0,5 °C a cada 20 s.

Foi empregado o sistema *Taqman® Gene Expression Assay* (Applied Biosystems) para avaliar a expressão gênica da IL-17 e IL-23. Para tanto, as

condições experimentais foram as seguintes: 6 µL de solução de Master Mix; 1 µL primer; 12 µL água livre de RNase e 1µL cDNA (500 ng) para um volume final de 20 µL de reação. As condições das corridas foram: 1º ciclo 50 °C – 2 min (1 repetição), 95 °C – 10 min (1 repetição), 95 °C- 15 s (40 repetições), 60 °C – 1 min (40 repetições). As reações de PCR em tempo real foram realizadas em termociclador da marca *BioErLine Gene K*.

A técnica de PCR em tempo real possibilita a quantificação do produto durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *CycleThreshold* (C_T). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseada na fluorescência. Para quantificar os resultados obtidos por PCR em tempo real, 2 métodos diferentes têm sido descritos na literatura: o método da curva padrão e o método de comparação do C_T . Nossos resultados foram avaliados pelo método de comparação do C_T pela equação: $2^{-\Delta\Delta C_T}$, onde $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (amostra) - ΔC_T (calibrador ou controle/PBS), e ΔC_T é o C_T do gene alvo subtraído do C_T do gene constitutivo (LIVAK et al., 2001) nas mesmas condições experimentais. Nos nossos experimentos utilizamos como gene constitutivo o *β-actin* (Sybr Green) ou *gapdh* (Taqman). A partir dos resultados de amplificação deste gene, foi realizada a normalização para minimizar os erros nas variações da quantidade de RNA e eficiência da transcrição reversa (GIULIETTI et al., 2001).

Os resultados foram expressos em “*Expressão Relativa de RNAm*”, que significa o número de vezes a mais que um determinado gene foi expresso em relação às respectivas amostras controles.

3.14 Obtenção e preparo de suspensões celulares a partir de órgãos linfoides de camundongos

Os diferentes grupos experimentais foram sacrificados e os linfonodos inguinais, mesentéricos, periaórticos e as placas de Peyer retirados, colocados em placas de Petri contendo Colagenase tipo IV (2 mg/mL-Sigma, St. Louis, USA) em meio de cultura RPMI1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e mantidos por 30 min/37°C em estufa com 5% de CO₂ umidificada. Após a incubação, as suspensões de células foram preparadas com o auxílio de homogeneizador em meio de cultura RPMI 1640, centrifugadas por 8 min/500 x g/4º C e ressuspensas em 10,5 mL de

meio RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 2mM de L-glutamina, 50 μ M de 2-mercaptoetanol, 1% de penicilina-estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB). A contagem e determinação da viabilidade celular foram realizadas em câmara de Neubauer utilizando Azul de Trypan 0,2 %. As células obtidas foram destinadas a posterior marcação com anticorpos fluorescentes para análises de citometria de fluxo.

3.15 Separação de linfócitos da lâmina própria intestinal

Baseados nos trabalhos de Davies e Parrot (1981), Sheifelle e Fuss (2001) e Weigman et al. (2007), as amostras de colo intestinal foram coletadas e lavadas em meio HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution* - Gibco, Carlsbad, CA, USA) livre de cálcio e magnésio. Em seguida foram cortadas em pedaços de aproximadamente 5 mm e incubadas em meio HBSS com 1 mM de EDTA (Sigma, St. Louis, USA) e DTT 1 mM (Sigma, St. Louis, USA) a 37 °C, em agitação constante, por 30 minutos. A digestão do tecido foi realizada através de uma segunda incubação em meio RPMI1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contendo 400 U/mL de collagenase IV (Gibco, Carlsbad, CA, USA) e este submetido à agitação constante, a 37 °C/ 1 hora. O sobrenadante resultante da incubação foi filtrado em rede de metal (100 μ m de espessura) para separação de impurezas. As células obtidas foram centrifugadas (600 x g/ 20 min/25 °C) em gradiente de Percoll (Sigma, St. Louis, USA) e coletada a camada presente na interface 30-70%. A contagem e determinação da viabilidade celular foram realizadas em câmara de Neubauer utilizando Azul de Trypan 0,2%, e o total de 10^6 células foram destinados à marcação com anticorpos fluorescentes para análise de citometria de fluxo.

3.16 Citometria de fluxo

3.16.1 Marcação das células provenientes dos linfonodos, placas de Peyer e lâmina própria com anticorpos fluorescentes para análise de populações linfocíticas em citômetro de fluxo

Suspensões celulares provenientes de linfonodos e placas de Peyer, e de linfócitos da lâmina própria, previamente obtidas foram distribuídas em placas de 96

poços na concentração de 10^6 células. Todas as suspensões foram incubadas com anticorpo anti-receptor Fc γ RII/RIII (1 μ g/ 10^6 células) por 15 min/4 °C seguida de lavagem com PBS contendo 0,5% de soro albumina bovina (BSA), 2 mM de EDTA, e centrifugação (500 x g/ 5 min/ 4 °C).

Inicialmente as células foram incubadas com anticorpos anti-CD4-FITC (1:20) (BD, Pharmingen) por 30 min/4 °C. Após este período, foram adicionados 100 μ L de PBS/ 0,5%BSA/2 mM EDTA (tampão de lavagem) e as células centrifugadas por 5 min/500x g/4 °C. Para realizar a marcação intracelular, as células foram fixadas em 100 μ L paraformaldeído (PFA - Merck, Darmstadt, Alemanha) 1% por 15 min/T.A. e lavadas a 500 x g/5min/4 °C com solução permeabilizante (*Perm/Wash*, Becton Dickinson), diluída de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram ressuspensas novamente em 200 μ L na solução permeabilizante e incubadas por 20min/T.A. Após incubação foram adicionados 200 μ L de tampão de lavagem às amostras e foram centrifugadas por 5 min/500 x g/4 °C. Para avaliação de células com perfil regulador, foi adicionado o anticorpo anti-FoxP3-PE (1:40), e a fim de se estudar o perfil de células dos tipos Th17 e Th1 foram adicionados anticorpos anti-ROR γ t-PE (1:40) ou T-bet-PE (1:40), àquelas previamente incubadas com anticorpo anti-CD4. Assim, nova incubação foi realizada por 40 min/4 °C. Tampão de lavagem foi adicionado a todas as amostras e estas foram centrifugadas por 500 x g/5 min/ 4° C. Por fim, as amostras foram fixadas em 150 μ L de PBS contendo 1% PFA.

Todas as marcações foram realizadas em duplicata e as amostras analisadas em citômetro de fluxo (20.000 eventos foram adquiridos por amostra em FACSCanto II, Becton Dickinson). Os dados foram analisados no programa FlowJo 7.5.

Como estratégias de análise das populações de linfócitos foram utilizados os parâmetros iniciais de exclusão de células mortas e debris, e de tamanho e granulosidade. Deste “gate” foram marcadas as populações positivas para expressão de CD4. Em seguida ocorreu a análise da população duplo-positiva, delimitando os linfócitos CD4 positivos para os fatores de transcrição FoxP3⁺, ROR γ t⁺ ou Tbet⁺. Essas marcações foram definidas igualmente para todos os grupos de acordo com a análise das populações linfoides não marcadas com anticorpos fluorescentes e aquelas duplamente marcadas com anticorpos controle isotípicos FITC e PE.

3.16.2 Marcação com anticorpos fluorescente para análise de neutrófilos e subtipos de macrófagos da lâmina própria por citometria de fluxo

As suspensões celulares provenientes da lâmina própria foram distribuídas em placas de 96 poços na concentração de 10^6 células. Todas as suspensões foram incubadas com anticorpo anti-receptor Fc γ RII/RIII (1 μ g/ 10^6 células) por 15 min/4 °C seguida de centrifugação (500 x g/ 5 min/ 4 °C) com tampão de lavagem constituído por PBS contendo 0,5% de soro albumina bovina (BSA), 2 mM de EDTA.

As células foram incubadas com anticorpos anti-CD11b FITC (1:20) e anti-CD68-PE (1:20) ou anti-CD206-PE (1:20) (BD Pharmingen) por 40 min/4 °C para marcação de subtipos de macrófagos e com anticorpos anti-Ly6G-Gr1- PE (1:40) para marcação de neutrófilos. Após este período, foram adicionados 100 μ L de tampão de lavagem e as células centrifugadas por 5min/500 x g/4 °C. Por fim, as amostras foram fixadas em 150 μ L de PBS contendo 1% PFA.

Todas as marcações foram realizadas em duplicata e as amostras analisadas em citômetro de fluxo (20.000 eventos foram adquiridos por amostra em FACSCanto II, Becton Dickinson). Os dados foram analisados utilizando o programa FlowJo 7.5.

Como estratégia para a análise das populações de macrófagos e neutrófilos utilizamos como parâmetros iniciais a avaliação de tamanho das células (FSC) e a complexidade interna ou granulosidade (SSC), excluindo células potencialmente mortas e debris celulares que aparecem predominantemente na região inferior esquerda da representação gráfica. Em seguida à marcação da população de macrófagos analisamos as populações fluorescentes para FITC/PE, a fim de se definir as populações duplo-positivas e para neutrófilos foram marcadas as populações fluorescentes para PE simples-positivas. Essas marcações foram definidas igualmente para todos os grupos de acordo com a análise das populações não marcadas com anticorpos fluorescentes e aquelas duplamente marcadas com anticorpos controle isotípicos FITC e PE.

3.17 Tratamento *in vivo* dos camundongos com anticorpos anti-TGF- β , anti-IL-10 e anti- β -galactosidase

Grupos de 20 animais receberam via intraperitoneal 4mg/animal de anticorpo anti-TGF- β (provenientes do cultivo do hibridoma HB9849) ou de anticorpo anti-IL-10 (hibridoma 1B1.3A). Outros 20 camundongos receberam anticorpo controle isotípico

IgG1 anti- β -galactosidase (hibridoma GL113) na mesma concentração. Após 24 h, os animais foram induzidos para inflamação intestinal aguda e posteriormente tratados com a CTX, formando os grupos listados no quadro 1 a seguir.

Quadro 1 - Grupos de animais utilizados nos ensaios de neutralização *in vivo* de TGF- β ou IL-10

Grupo de animais tratados com anticorpos anti-TGF-β (n=20) ou anti-IL-10 (n=20)	Grupo de animais tratados com anticorpos anti-β-galactosidase (n=20)
4 animais receberam etanol 45% (ETOH)	4 animais receberam etanol 45% (ETOH)
4 animais receberam etanol 45% e 0,035mg/Kg de CTX (ETOH+CTX)	4 animais receberam etanol 45% e 0,035mg/Kg de CTX (ETOH+CTX)
6 animais receberam TNBS em etanol 45% (TNBS)	6 animais receberam TNBS em etanol 45% (TNBS)
6 animais receberam TNBS em etanol 45% e 0,035mg/Kg de CTX (TNBS+CTX)	6 animais receberam TNBS em etanol 45% e 0,035mg/Kg de CTX (TNBS+CTX)

Os animais foram acompanhados diariamente para análise da perda de peso e sinais clínicos da doença. Após 4 dias de indução da inflamação intestinal os animais foram sacrificados. Os intestinos foram coletados para análises histológicas e dosagem da atividade da MPO de acordo com os protocolos anteriormente descritos.

3.18 Tratamento dos animais com inibidores da produção de eicosanoides

Para bloqueio da produção de eicosanoides *in vivo* foi utilizado o inibidor não seletivo de lipoxigenase - NDGA (*Nordihydroguaiaretic acid*), o qual bloqueia a síntese de cisteinil leucotrienos, incluindo a LXA₄; e a Indometacina (anti-inflamatório não esteroide derivado do ácido indolacético), a qual inibe a atividade da enzima ciclooxigenase e assim a formação de precursores de prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico.

Camundongos BALB/c (n=20 para cada inibidor) foram induzidos à inflamação intestinal com TNBS, assim como os grupos controles receberam ETOH, e após 17 horas receberam via ip os inibidores. Após 1 hora, os camundongos foram administrados via ip. com CTX ou PBS. Outro grupo de camundongos (n=20)

recebeu a instilação intrarretal de TNBS ou somente ETOH e após 17 horas receberam via ip PBS (controle para administração dos inibidores). Após 1 hora esses camundongos receberam CTX ou PBS via ip.

O NDGA (Cayman Chemical, Michigan, USA) foi administrado na concentração de 30 mg/kg (NUNES et al., 2010) diluído segundo as recomendações do fabricante, enquanto que a INDO (Sigma, St. Louis, USA, St. Louis, USA) foi administrada na concentração de 3mg/kg (SILVA et al., 2013).

Os animais foram acompanhados diariamente para análise da perda de peso e sinais clínicos da doença. Após 4 dias de indução da inflamação intestinal os animais foram sacrificados. Os intestinos foram coletados para análises histológicas e dosagem da atividade da MPO de acordo com os protocolos anteriormente descritos.

3.19 Análise estatística

Os grupos de dados foram comparados através do teste de ANOVA (sendo usado em seguida o teste de Tukey ou Dunn) (ZAR, 1984). Valores de $p < 0,05$ foram considerados indicativos de diferença estatística entre os grupos estudados. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPadPrism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Para elaboração da análise estatística dos resultados obtidos em citometria de fluxo, foi realizada a conversão das porcentagens obtidas nos diferentes grupos experimentais para o número absoluto de células positivamente marcada para cada molécula estudada, utilizando a seguinte fórmula: $(n^{\circ} \text{ de células/animal} \times \text{porcentagem obtida na análise por FACs}) \div 100$.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção da fração crotoxina do veneno de *C.d.terrificus*

A CTX foi isolada por cromatografia de troca aniônica em sistema FPLC. Como descrito na literatura, proteínas presentes nos picos representados pelas setas 2, 3 e 4 e eluídos no gradiente de NaCl (Figura 3) correspondem a fração CTX do veneno de *C.d.terrificus* (FRAENKEL-CONRAT et al., 1971; SLOTTA; FRAENKEL, 1938). Em seguida, os tubos correspondentes a estes picos foram submetidos à eletroforese em gel de poliácridamida 15% para verificar a pureza da toxina obtida.

Figura 3 - Perfil cromatográfico do veneno de *C.d.terrificus* submetido à cromatografia de troca aniônica em coluna MONO-Q

O veneno total de *C. d. terrificus* (15mg) foi submetido à cromatografia de troca aniônica em coluna MONO- Q HR 5/5 por sistema FPLC. O gráfico representa a eluição dos componentes do veneno quando submetidos a um gradiente linear de NaCl (0 a 1M) em tampão fosfato 50 mM em fluxo de 1,0 ml/minuto.

Notamos na figura 4, a presença de uma banda proteica com massa molecular de aproximadamente 24 kDa que corresponde à da CTX nas amostras referentes aos picos 2, 3 e 4 obtidas da cromatografia assim como na amostra de veneno total. Além disso, não foi observada contaminação nas amostras evidenciando a eficiência da metodologia de purificação. A partir desses resultados,

as amostras foram agrupadas, dialisadas em PBS e a concentração proteica determinada pelo método de Bradford.

Figura 4 – Perfil eletroforético do veneno de *C.d. terrificus* e dos picos obtidos em cromatografia de troca aniônica

As proteínas separadas em gel de poliácridamida 15% sob condições redutoras. **P** - Padrão de massa Molecular ((TrailMix™- Novagen 10-255 kDa); **1**- veneno total de *C.d. terrificus*; **2-4** picos 2, 3 e 4 da CTX. Perfil eletroforético do veneno total (1,4 mg/mL) e as amostras (Pico 2 da CTX- 0,685 mg/mL; pico 3 da CTX- 0,932 mg/mL; pico 4 da CTX- 0,874 mg/mL). As amostras foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,625 mM pH 6,8; 10% glicerol (v/v); 5% β-mercaptoetanol (v/v); 2 % de SDS e 0,001 % de azul de bromofenol na proporção de 1:5 e aquecidas por 5min/ 100°C. Em seguida, foram aplicadas no gel e submetidas a uma corrente elétrica de 110 V e 55 mA por 2 horas. As proteínas contidas no gel foram coradas com solução de Coomassie Blue.

4.2 Estabelecimento da colite experimental aguda e tratamento com a CTX em camundongos BALB/c

O modelo experimental de doença inflamatória no intestino induzida pelo ácido TNBS foi estabelecido com eficiência quando diluído em etanol 45% nos camundongos BALB/c, assim esta concentração de etanol foi utilizada nos demais experimentos. Este fato pôde ser confirmado através da avaliação da mudança de peso, do *score* clínico desenvolvido pelos animais e pela análise macroscópica do aspecto dos intestinos após a realização do experimento. Vale ressaltar que ao longo dos experimentos observamos sobrevivência de 83% no grupo de animais que receberam a instilação do TNBS (n=6).

Como mencionado, para determinar a concentração de CTX administrada via intraperitoneal, grupos de camundongos (n=4) receberam três doses diferentes da toxina após a administração do TNBS, baseadas na DL50 via ip. previamente descrita da CTX (OKAMOTO et al., 1992). Verificamos que dentre as três doses de CTX utilizadas, a menor dose (0,045 mg/Kg) foi capaz de reverter a perda de peso dos animais que receberam o TNBS além de não alterar o perfil de sobrevivência do grupo experimental (dados não-mostrados). A partir desses resultados e com a finalidade de administrar uma dose ainda menor da toxina, foi estabelecida a concentração de CTX de 0,035 mg/Kg para a realização dos demais experimentos.

Além da concentração da CTX a ser usada, experimentos foram realizados para estabelecer o tempo de administração da toxina. Os resultados permitiram observar que tanto a administração preventiva da CTX, ou seja, 18h antes da indução da inflamação (Tabela 1) quanto a terapêutica, feita 18h após a indução (Tabela 2) proporcionaram menor perda de peso nos animais TNBS+CTX em relação aos que receberam apenas TNBS. A partir desses resultados, decidimos priorizar a realização dos experimentos com a administração terapêutica da CTX em relação à preventiva no modelo de inflamação proposto.

Tabela 1 - Porcentagem de peso corporal diária dos camundongos BALB/c submetidos aos tratamento com CTX 18h pré-indução com TNBS

Dias	ETOH	ETOH+CTX	TNBS	TNBS+CTX
0 (CTX)	100%	100%	100%	100%
1 (Indução)	101% ± 1,1%	97,3% ± 3,2%	101,8% ± 1,8%	98,8% ± 3,5%
2	98,2% ± 1,7%	94,3% ± 0,6%	91,2% ± 4,4%	91% ± 3,7%
3	98,2% ± 2,7%	98,3% ± 0,6%	86% ± 4,9%	89,8% ± 6,3%
4	99,3% ± 4,7%	100,7% ± 2,1%	86,2% ± 3,3%	93% ± 4,7%

Os resultados são apresentados como média das porcentagens ± desvio padrão.

Tabela 2 - Porcentagem de peso corporal diária dos camundongos BALB/c submetidos aos tratamento com CTX 18h pós-indução com TNBS

Dias	ETOH	ETOH+CTX	TNBS	TNBS+CTX
1 (Indução)	100%	100%	100%	100%
2 (CTX)	99,3% $\pm$ 0,8%	98,8% $\pm$ 0,4%	85,66% $\pm$ 0,3%	91,9% $\pm$ 0,8%
3	100% $\pm$ 1,1%	97,2% $\pm$ 1,3%	80,9% $\pm$ 1%	87,56% $\pm$ 4,2%
4	100,1% $\pm$ 1,5%	96,9% $\pm$ 2,6%	76,3% $\pm$ 2,7%	89,0% $\pm$ 3,4%

Os resultados são apresentados como média das porcentagens $\pm$ desvio padrão.

Como mostrado na figura 5, pode ser observado que o grupo TNBS apresentou maior *score* clínico (Fig. 5B) além dos animais apresentarem intestinos com grande área de necrose (Fig. 5C) devido ao desenvolvimento da inflamação quando comparado aos grupos controles (ETOH e ETOH+CTX). Em contraste, observamos que o grupo TNBS que recebeu a CTX teve perda de peso e *score* clínico menores que o grupo TNBS (Fig. 5A e Fig. 5B, respectivamente). Verificamos ainda, menor área de necrose (Fig. 5C) nos intestinos dos camundongos TNBS+CTX, sugerindo que a administração desta substância atua na melhora dos sinais clínicos dos animais induzidos a desenvolver a doença inflamatória intestinal.

Figura 5 - Pesos e score clínico de camundongos BALB/c após indução experimental da inflamação no intestino

(A) Mudança de peso (gramas) em camundongos BALB/c após indução experimental da inflamação no intestino; o tratamento com a CTX foi realizado 18h pós-indução do modelo experimental (entre os dias 1 e 2); (B) Cálculo do "Score" clínico dos camundongos realizado pela soma dos pontos correspondente a perda de peso e consistência das fezes de cada animal ($n = 6$ animais/grupo); (C) Aspecto macroscópico da porção final dos intestinos grossos (4cm) de animais representativos de cada grupo experimental. Grupos: ETOH (grupo que recebeu somente etanol 45%); ETOH+CTX (grupo etanol 45% que recebeu CTX); TNBS (grupo com doença inflamatória intestinal) e TNBS+CTX (grupo com doença inflamatória intestinal tratado com CTX). $\alpha p < 0,05$ TNBS comparado ao grupo ETOH, $\# p < 0,05$ TNBS comparado ao grupo ETOH+CTX; $* p < 0,05$ TNBS comparado a todos os grupos.

4.3 Análise histológica de cortes de intestino dos diferentes grupos experimentais

O exame histológico da porção perirretal dos camundongos pertencentes ao grupo TNBS mostrou perda de células epiteliais, redução na densidade de glândulas tubulares, perda de criptas, grande infiltrado de células inflamatórias na mucosa intestinal e ainda inflamação transmural envolvendo várias camadas da parede intestinal (Fig. 6A). Por outro lado, nos camundongos TNBS que receberam a CTX

foi observada melhora nos sinais histológicos acima descritos, sendo que o *score* deste grupo foi significativamente menor comparado ao do grupo TNBS (Fig. 6B) apresentando, portanto histologia semelhante aos grupos controles (ETOH e ETOH+CTX).

Figura 6 - Histologia da porção perirretal em camundongos BALB/c

(A) Coloração com hematoxilina-eosina do tecido intestinal dos quatro grupos de camundongos BALB/c, as setas indicam acentuado infiltrado inflamatório na mucosa intestinal (aumento de 10x); (B) “Score” histológico da reação inflamatória no tecido intestinal obtido quatro dias após a indução da doença (n=5 animais/grupo). Grupos: ETOH (Controle administrado com etanol 45%); ETOH+CTX (grupo etanol 45% tratado com CTX); TNBS (grupo com doença inflamatória intestinal) e TNBS+ CTX (grupo com doença inflamatória intestinal e tratado com CTX). * $p < 0,05$ demais grupos comparados ao TNBS.

4.4 Perfil de citocinas inflamatórias e dosagem da atividade da MPO na porção colônica dos intestinos de animais BALB/c após indução da doença inflamatória intestinal

A produção de citocinas no intestino (Fig. 7) foi avaliada após realização do protocolo de extração das mesmas e quantificada pelo método de ELISA. As secreções de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-17, encontraram-se significativamente elevadas nos intestinos dos animais do grupo TNBS em relação aos grupos controles (ETOH e ETOH+CTX), refletindo o estado da inflamação intestinal aguda desenvolvida por aquele grupo. No grupo dos animais doentes e que receberam a CTX, estas citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α , e IL-17 estiveram significativamente diminuídas em relação ao grupo TNBS. Quanto à secreção de IFN- γ , verificamos que a administração da CTX induziu diminuição desta citocina no grupo TNBS+CTX em relação ao grupo TNBS, apesar dessa diferença não ser significativa. Além disso, pudemos observar que os níveis de IL-6 e IL-17 no grupo TNBS+CTX foram semelhantes aos dos grupos controles (ETOH e ETOH+CTX).

Figura 7 – Secreção das citocinas pró-inflamatórias nos sobrenadantes de macerados dos intestinos

Níveis de IL-6, TNF- α , IL-17, IL-1 e IFN- γ em macerados de intestinos determinados por ELISA (A-E). Os resultados representam a média da produção de cada citocina obtida nas amostras individuais/grupo $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Com o intuito de analisar ainda a inflamação intestinal induzida pelo TNBS nos diferentes grupos experimentais, na outra metade da porção colônica foi determinada a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Assim como as citocinas pró-inflamatórias, a atividade da MPO (Fig. 8A) esteve significativamente elevada no grupo TNBS em comparação aos grupos controles e ao grupo TNBS que recebeu a CTX. Considerando que a MPO é encontrada em neutrófilos e apresenta-se como um bom marcador de inflamação tecidual foi avaliada a presença desta população celular na lâmina própria apenas nos grupos doentes utilizando a marcação com anticorpo anti- Ly6G-Gr1 (Fig. 8B). Os resultados de citometria de fluxo permitiram verificar a presença de células Ly6G-Gr1⁺ no grupo TNBS e diminuição significativa desta população celular no grupo TNBS que recebeu a CTX.

Figura 8 – Determinação da atividade enzimática da MPO nos macerados de intestinos e número absoluto de células Ly6G-Gr1⁺

(A) Concentração de MPO U/mg de proteína dosada por método colorimétrico na porção colônica intestinal de camundongos. Os resultados representam a média da produção de MPO obtida nas amostras individuais/grupo $\pm$ desvio padrão. (B) Número absoluto de células Ly6G-Gr1⁺ na lâmina própria nos grupos TNBS e TNBS+CTX obtido por citometria de fluxo. Os resultados representam a média do número absoluto de células analisadas individualmente/grupo $\pm$ desvio padrão. * p < 0,05 e *** p < 0,001.

4.5 Análise dos subtipos de macrófagos na lâmina própria dos animais com inflamação aguda experimental no intestino

Considerando a inflamação induzida pelo TNBS e o efeito da CTX sobre esse processo, realizamos a marcação das células com anticorpos fluorescentes para macrófagos com fenótipo inflamatório CD11b⁺CD68⁺ (M1) ou com fenótipo regulador CD11b⁺CD206⁺ (M2) na lâmina própria obtida dos diferentes grupos experimentais. Os resultados mostraram aumento no número absoluto tanto de macrófagos do tipo M1 quanto do tipo M2 no grupo TNBS na lâmina própria (Fig. 9) em relação aos grupos controles. Além disso, verificamos que a administração da CTX no grupo que recebeu TNBS resultou em inibição dessas populações celulares em relação ao grupo TNBS.

Figura 9 - Análise da presença de macrófagos da lâmina própria nos diferentes grupos experimentais

Porcentagem de células M1-CD11b⁺CD68⁺ (A) e M2-CD11b⁺CD206⁺ (B) na lâmina própria obtidas dos diferentes grupos experimentais e analisadas por citometria de fluxo. (C) e (D) Representação gráfica do número absoluto de células CD11b⁺CD68⁺ ou CD11b⁺CD206⁺ calculado como descrito em material e métodos. Todas as amostras foram feitas em duplicata e analisadas considerando tamanho/granulosidade. A partir desta aquisição foi feita a janela na região macrófagos CD11b⁺ e então, as células foram analisadas para a dupla marcação por CD11b/CD68 ou CD11b/CD206. O “Controle Isotópico FITC/PE” mostrado em (B) foi utilizado para determinação das populações duplo positivas, correspondendo às células incubadas com anticorpos isotípicos. As amostras foram preparadas a partir de um pool de células de 4-6 animais/grupo realizadas em duplicatas. O gráfico representa a média dos resultados obtidos em dois experimentos $\pm$ desvio padrão. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

4.6 Secreção de citocinas moduladoras e eicosanoides em camundongos BALB/c com doença inflamatória intestinal e que receberam ou não a CTX

Além das citocinas citadas acima, foi determinada a presença de TGF- β e IL-10 nos homogeneizados da porção colônica intestinal dos diferentes grupos experimentais. Como mostra a figura 10 (A e B), a administração da CTX induziu maior secreção tanto de TGF- β como de IL-10 em relação ao grupo que recebeu somente TNBS. Estes resultados em adição aos já mencionados, que demonstram diminuição da síntese de citocinas pró-inflamatórias, confirmam o perfil modulador da CTX sobre a inflamação intestinal.

A dosagem de eicosanoides, como a PGE_2 e a LXA_4 , na porção intestinal dos animais estudados, permitiu verificar que após a administração da CTX nos animais com doença inflamatória intestinal, estes mediadores estavam elevados em relação ao grupo TNBS. Os resultados (Fig. 10 C e D) sugerem que a CTX também foi capaz de modular a produção desses mediadores anti-inflamatórios na doença inflamatória intestinal.

Figura 10 - Produção de citocinas anti-inflamatórias e eicosanoides na porção colônica intestinal de camundongos BALB/c

Secreção de IL-10 (A) e TGF- β (B) na porção colônica intestinal dos diferentes grupos de camundongos controles (ETOH e ETOH+CTX) ou com inflamação intestinal aguda e que foram injetados ou não com CTX (TNBS ou TNBS+CTX). A secreção das citocinas foi determinada por ELISA 4 dias após a indução da doença. Produção de PGE₂ (C) e LXA₄ (D) na porção colônica intestinal dos diferentes grupos. A secreção dos eicosanoides foi determinada por ELISA em sobrenadantes dos macerados de intestinos após a extração em coluna C₁₈ Sep-Pak. Os resultados foram expressos como a média da produção de cada citocina ou eicosanoide obtido nas amostras individuais $\pm$ desvio padrão. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

4.7 Expressão gênica de citocinas em células linfóides dos camundongos BALB/c dos diferentes grupos experimentais

Para análise da expressão gênica das citocinas pró- ou anti-inflamatórias utilizamos as suspensões celulares obtidas dos linfonodos inguinais, mesentéricos, periaórticos e das placas de Peyer. Na figura 11 é possível verificar aumento da expressão de RNAm para IL-1, IL-6, IL-17, IL-23 e IFN- γ nas células linfóides de camundongos TNBS em relação aos grupos controles. Em relação ao grupo tratado com CTX (TNBS+CTX) a expressão de IL-17 e IL-23 encontraram-se significativamente diminuídas em relação ao grupo TNBS. Menores níveis de expressão de RNAm para IL-6, IL-1 e IFN- γ também foram observados no grupo

TNBS que recebeu CTX em relação ao grupo TNBS, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Figura 11 - Expressão relativa de RNA mensageiro para as citocinas pró-inflamatórias em linfonodos e placas de Peyer de camundongos BALB/c

A expressão do RNA mensageiro para as diferentes citocinas foi determinada em reações de PCR em Tempo Real. Os resultados foram expressos como a média da expressão relativa de cada citocina nas amostras individuais $\pm$ desvio padrão. * $p < 0.05$. Grupos de camundongos controles (ETOH e ETOH+CTX) ou com inflamação intestinal aguda e que foram injetados ou não com CTX (TNBS ou TNBS+CTX) (n=6 animais/grupo).

A expressão de RNAm para TGF- β e IL-10 (Fig. 12) esteve aumentada no grupo TNBS+CTX comparado aos demais grupos. Estes resultados foram, portanto semelhantes aos obtidos nos ensaios de ELISA para determinação da secreção das citocinas nos sobrenadantes da porção intestinal dos diferentes grupos experimentais.

Figura 12- Expressão relativa de RNA mensageiro para as citocinas anti-inflamatórias em células de linfonodos e placas de Peyer de camundongos BALB/c

A expressão do RNA mensageiro para as diferentes citocinas foi determinada em reações de PCR em Tempo Real. Os resultados foram expressos como a média da expressão relativa de cada citocina nas amostras individuais $\pm$ desvio padrão. $*p < 0,05$. Grupos controles (ETOH e ETOH+CTX) ou TNBS que receberam ou não CTX (TNBS e TNBS+CTX) ($n=6$ animais/grupo).

4.8 Análise da expressão de fatores de transcrição em células dos diferentes grupos experimentais

As suspensões celulares obtidas da lâmina própria intestinal e dos linfonodos inguinais, mesentéricos e periaórticos, assim como das placas de Peyer foram marcadas com anticorpos fluorescentes para análise da expressão de fatores de transcrição e em seguida analisadas em citômetro de fluxo.

Para a análise das populações de células Th17 e Th1 presentes na lâmina própria, as diferentes suspensões celulares foram incubadas com anticorpos anti-CD4 e com os anti-fatores de transcrição ROR γ t ou Tbet e analisadas em citômetro de fluxo. Na lâmina própria, o número absoluto de células CD4⁺ROR γ t⁺ (Fig. 13C) e CD4⁺Tbet⁺ (Fig. 13D) mostrou-se aumentado no grupo TNBS em relação aos demais grupos. No grupo TNBS que recebeu a CTX o número de células CD4⁺ROR γ t⁺ esteve significativamente reduzido, indicando que o tratamento com a CTX inibe o desenvolvimento de células com perfil Th17. Já em relação ao número de células CD4⁺Tbet⁺ ocorreu discreta diminuição no grupo TNBS+CTX comparado ao grupo TNBS.

Figura 13 - Análise de células $CD4^+ROR\gamma t^+$ e $CD4^+Tbet^+$ provenientes da lâmina própria (LP) dos diferentes grupos experimentais

Representação das análises em porcentagens de células $CD4^+ROR\gamma t^+$ (A) e $CD4^+Tbet^+$ (B) na lâmina própria dos diferentes grupos experimentais por citometria de fluxo. Todas as amostras foram inicialmente analisadas considerando tamanho /granulosidade. A partir desta aquisição foi feita a janela na região dos linfócitos $CD4^+$ e então, as células foram analisadas para a dupla marcação por $CD4/ROR\gamma t$ ou $CD4/Tbet$. O “controle $CD4^+$ ” mostrado em (B) foi utilizado para determinação das populações duplo-positivas, correspondendo à amostra de células somente incubada com o anticorpo anti- $CD4$. As amostras foram preparadas a partir de um *pool* de células de 4-6 animais/grupo realizadas em duplicatas. (C) e (D) Número absoluto de células $CD4^+ROR\gamma t^+$ e $CD4^+Tbet^+$ calculado a partir das amostras em duplicata, conforme descrito em material e métodos. O gráfico representa a média dos resultados obtidos em dois experimentos $\pm$ desvio padrão. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

Nos linfonodos e placas de Peyer, observamos o mesmo perfil encontrado na lâmina própria. Foi observado aumento no número de células $CD4^+ROR\gamma t^+$ (Fig. 14C), as quais representam células com fenótipo Th17, no grupo TNBS em relação aos grupos controles. Também foi encontrada diminuição no número dessas células no grupo TNBS tratado com CTX em relação ao grupo TNBS. Apesar de ocorrer diminuição no número absoluto de células $CD4^+Tbet^+$ (Fig. 14D) no grupo TNBS tratado com CTX em relação ao grupo TNBS, não ocorreu diferença estatística entre os grupos estudados.

Figura 14 - Análise de células $CD4^+ROR\gamma t^+$ e $CD4^+Tbet$ provenientes dos linfonodos e placas de Peyer (LN) dos diferentes grupos experimentais

Porcentagem de células $CD4^+ROR\gamma t^+$ (A) e $CD4^+Tbet^+$ (B) nos linfonodos e placas de Peyer dos diferentes grupos experimentais determinadas por citometria de fluxo. (C) e (D) Representação gráfica do número absoluto de células $CD4^+ROR\gamma t^+$ e $CD4^+Tbet^+$ calculado a partir das amostras em duplicata dos linfonodos e placas de Peyer dos diferentes grupos experimentais, conforme descrito em material e métodos. Todas as amostras foram inicialmente analisadas considerando tamanho/granulosidade. A partir desta aquisição foi feita a janela na região dos linfócitos $CD4^+$ e então, as células foram analisadas para a dupla marcação por $CD4/ROR\gamma t$ ou $CD4/Tbet$. O “controle $CD4^+$ ” mostrado em (B) foi utilizado para determinação das populações duplo positivas, correspondendo ao tubo onde foi adicionado somente o anticorpo anti- $CD4$. As amostras foram preparadas a partir de um *pool* de células de 4-6 animais/grupo realizadas em duplicatas. O gráfico representa a média dos resultados obtidos em dois experimentos $\pm$ desvio padrão. * $p < 0.05$

A figura 15 representa os resultados obtidos quanto à presença de células $CD4^+FoxP3^+$ na lâmina própria ou nos linfonodos e placas de Peyer obtidos dos diferentes grupos experimentais. Verificamos aumento no número absoluto de células reguladoras $CD4^+FoxP3^+$ nos grupos de animais com doença inflamatória

intestinal que receberam a CTX em relação aos demais grupos, o que sugere a participação dessas células no efeito modulador da CTX.

Figura 15 - Análise de células CD4⁺FoxP3⁺ reguladoras na lâmina própria (LP) e nos linfonodos e placas de Peyer (LN)

Porcentagem de células CD4⁺FoxP3⁺ na lâmina própria (A), nos linfonodos e placas de Peyer (B) em amostras obtidas dos diferentes grupos e analisadas por citometria de fluxo. (C) e (D) Representação gráfica do número absoluto de células CD4⁺FoxP3⁺ calculado a partir das amostras da lamina própria ou linfonodos e placas de Peyer dos diferentes grupos experimentais, conforme descrito em material e métodos. Todas as amostras foram analisadas considerando tamanho /granulosidade. A partir desta aquisição foi feita a janela na região dos linfócitos CD4⁺ e então, as células foram analisadas para a dupla marcação por CD4/FoxP3. O “controle CD4⁺” mostrado em (B) foi utilizado para determinação das populações duplo positivas, correspondendo ao tubo onde foi adicionado somente o anticorpo anti-CD4. As amostras foram comparadas a partir de uma *pool* de células de 4-6 animais/grupo realizadas em duplicatas. O gráfico representa a média dos resultados obtidos em dois experimentos $\pm$ desvio padrão. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.9 Participação do TGF- β e IL-10 no efeito modulador da CTX sobre a colite experimental aguda

Considerando que a CTX é capaz de atenuar a inflamação intestinal aguda induzida pelo ácido TNBS e que estimula a secreção de citocinas imunomoduladoras, estudamos a possível participação do TGF- β e da IL-10 nesse efeito da toxina. Para tanto, foram produzidos anticorpos monoclonais anti-TGF- β ,

anti-IL-10 e anticorpo controle isotípico (anti- β -galactosidase) e estes foram administrados *in vivo* para avaliar o efeito da CTX na inflamação intestinal.

Os animais que receberam anticorpos anti- β -gal. apresentaram perfil de perda de peso, *score* clínico e análise macroscópica dos intestinos semelhantes aos animais do modelo experimental de inflamação intestinal aguda que não receberam tratamento com nenhum anticorpo bloqueador (dados relatados anteriormente, Fig. 5). Este perfil se caracteriza por perda acentuada de peso nos animais do grupo TNBS, elevado *score* clínico além de intestinos com grande área de necrose devido ao desenvolvimento da inflamação quando comparado aos demais grupos (ETOH, ETOH+CTX e TNBS+CTX).

Em contraste, o grupo que recebeu a CTX, teve perda de peso e *score* clínico menores que o grupo TNBS (Fig. 16 A e B). Verificamos ainda, menor área de necrose nos intestinos dos camundongos TNBS+CTX (Fig. 16C), sugerindo novamente que esta toxina atua na melhora dos sinais clínicos dos animais induzidos à doença inflamatória intestinal. Em conjunto, esses dados mostram que a administração do anticorpo controle isotípico não exerceu qualquer ação sobre o perfil de inflamação avaliado e tão pouco sobre o efeito modulador da CTX.

No entanto, foi possível notar que após o tratamento com anticorpos anti-TGF- β ou anti-IL-10 o perfil acima foi alterado (Fig. 16D-I). Os grupos TNBS e TNBS+CTX foram semelhantes quanto aos resultados de perda de peso e *score* clínico e apresentaram maior área de necrose nos intestinos dos camundongos quando comparados aos camundongos TNBS+CTX que receberam o anticorpo isotípico. Do mesmo modo, pudemos verificar nos grupos controles (ETOH e ETOH+CTX) acentuada perda de peso e aumento no *score* clínico nos animais tratados os anticorpos bloqueadores das citocinas em questão. Além disso, os animais ETOH que receberam anticorpos anti-IL-10 apresentaram áreas de necrose nos intestinos (Fig. 16I), fato que não foi observado anteriormente em nenhum dos experimentos realizados.

Com base nesses resultados, a neutralização dessas citocinas *in vivo* permitiu verificar que tanto a IL-10 como o TGF- β participam do efeito modulador da CTX sobre a inflamação intestinal, uma vez que na ausência destas citocinas o efeito terapêutico da CTX mostrado acima foi atenuado (Fig. 16).

Figura 16 - Efeito da neutralização in vivo da IL-10 ou TGF- β sobre a variação de peso corporal, score clínico e aspecto macroscópico dos intestinos de camundongos injetados com TNBS e que receberam ou não CTX

(A, D e G) Variação de peso durante 4 dias pós-indução da inflamação intestinal aguda pela administração do TNBS em camundongos. Grupos de camundongos BALB/c receberam via ip anticorpos anti- β gal, anti-TGF- β ou anti-IL-10 no dia 1; A inflamação intestinal induzida pela instilação do TNBS via intrarretal ocorreu no dia 2, e após 18 horas, os camundongos receberam via ip CTX ou PBS. (B, E e H) Cálculo do Score clínico desses grupos experimentais realizado pela soma dos pontos correspondentes a perda de peso e consistência das fezes de cada animal/grupo. (C, F e I) Aspecto macroscópico dos intestinos após 4 dias da indução da inflamação. Os resultados foram expressos como a média dos animais individuais/grupo $\pm$ desvio padrão. Em (A), (D) e (G) α $p < 0,05$ TNBS comparado ao grupo ETOH; # $p < 0,05$ TNBS comparado ao grupo ETOH+CTX; * $p < 0,05$ TNBS comparado a todos os grupos. Em (B), (E) e (H) α $p < 0,05$ comparado ao grupo ETOH; # $p < 0,05$ comparado ao grupo ETOH+CTX; * $p < 0,05$ TNBS comparado a todos os grupos.

Somado aos resultados acima descritos, o exame histológico da porção perirretal dos camundongos pertencentes ao grupo TNBS, que receberam os anticorpos anti- β -gal., anti-TGF- β ou anti-IL-10 mostrou perda de células epiteliais, redução na densidade de glândulas tubulares, perda de criptas, grande infiltrado de células inflamatórias na mucosa intestinal e ainda inflamação transmural envolvendo

várias camadas da parede intestinal (Fig. 17). Entretanto, foi observada melhora significativa nos sinais histológicos acima descritos apenas nos camundongos TNBS que receberam a CTX e que foram injetados com anticorpo controle isotípico (anti- β -gal.) comparado ao grupo TNBS (anti- β -gal.).

Os animais TNBS tratados com CTX, os quais receberam previamente anti-TGF- β ou anti-IL-10 não apresentaram essa recuperação tecidual mostrada pela análise do *score* histológico (Fig. 17). Além disso, os animais controles (ETOH) tratados com anti-TGF- β ou IL-10 apresentaram aumento do *score* histológico quando comparados ao grupo ETOH que recebeu anti- β -gal.

Os dados da análise histológica corroboram os demais, sugerindo que produção de TGF- β e de IL-10 induzida pela CTX é importante para a melhora do quadro clínico e restauração tecidual dos animais estudados.

Figura 17 – Histologia da porção perirretal de camundongos BALB/c submetidos ao tratamento com anticorpos anti- β -gal., anti-TGF- β ou anti-IL10 seguida de indução de inflamação intestinal aguda com TNBS e administração ou não com CTX

Coloração com hematoxilina-eosina do tecido intestinal (porção perirretal) de camundongos BALB/c após administração de anticorpos anti- β -galactosidase, anti-TGF- β ou IL-10 e induzidos à inflamação intestinal aguda pela instilação do TNBS e que receberam ou não CTX; Score histológico da reação inflamatória no tecido intestinal obtido quatro dias após a indução da doença. Os resultados representam a média do score histológico obtido nas análises individuais dos camundongos/grupo $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$. (Aumento microscópico de 10x).

Na porção colônica dos animais submetidos ao tratamento com os diferentes anticorpos foi determinada a atividade da enzima MPO. Na figura 18 é possível verificar que a administração do anticorpo anti- β gal não alterou o perfil de liberação de MPO nos grupos experimentais, ou seja, alta liberação desta enzima foi detectada no grupo TNBS em comparação aos grupos controles ou ao grupo TNBS que recebeu a CTX. Por outro lado, nos camundongos TNBS ou TNBS+CTX que receberam anticorpos anti-TGF- β , os níveis de MPO estiveram elevados e semelhantes quando comparados aos obtidos nos grupos ETOH ou ETOH+CTX. Em relação aos grupos tratados com anticorpo anti-IL-10, não verificamos diferença significativa na atividade de MPO entre os grupos experimentais. Estes resultados demonstraram que ao ocorrer bloqueio do TGF- β o efeito modulador da CTX sobre a produção de MPO é abolido.

Figura 18 - Determinação da atividade enzimática da MPO nos macerados de intestinos dos animais que receberam tratamento com anticorpos seguida de indução da inflamação intestinal aguda com TNBS e administração ou não de CTX

Concentração de MPO U/mg de proteína dosada por método colorimétrico na porção colônica intestinal de camundongos dos diferentes grupos experimentais. Camundongos BALB/c receberam via ip anticorpos anti- β gal, anti-TGF- β ou anti-IL-10 e passados após 24h foi induzida a inflamação intestinal pela instilação do TNBS via intrarretal e após 18 horas, os camundongos receberam via ip CTX ou PBS. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$.

4.10 Envolvimento dos eicosanoides PGE₂ e LXA₄ no efeito modulador da CTX sobre a inflamação experimental aguda em camundongos BALB/c

Como visto anteriormente, a CTX induz a síntese de eicosanoides como PGE₂ e LXA₄ os quais podem apresentar propriedades moduladoras sobre a resposta imune. Considerando essas observações, avaliamos a participação desses mediadores no efeito modulador da CTX sobre a inflamação intestinal. Para tanto, camundongos foram injetados com o NDGA e a Indometacina, os quais inibem a produção de lipoxinas e prostaglandinas, respectivamente. Em seguida, foi induzida a inflamação intestinal pela administração do TNBS nos camundongos e ainda, foram tratados ou não com a CTX. Estes grupos experimentais foram acompanhados com relação à perda de peso, score clínico durante 4 dias após a indução da inflamação. Ao final do 4º dia, os camundongos foram sacrificados e a região colônica foi coletada para análise histológica e atividade de MPO.

Na figura 19 podemos verificar que a administração da INDO e NDGA, bloqueadores de PGE₂ e LXA₄ respectivamente, aboliu o efeito terapêutico da CTX sobre a perda de peso e score clínico dos camundongos induzidos com TNBS, uma vez que estes parâmetros analisados estiveram semelhantes aos animais TNBS. Verificamos ainda, intensa área de necrose nos intestinos dos animais TNBS+CTX tratados com INDO ou NDGA também comparável aos animais do grupo TNBS da mesma forma injetados com INDO e NDGA (Fig. 19). Esses dados sugerem que o papel modulador da CTX está relacionado a produção desses mediadores da inflamação.

Figura 19 – Variação de peso corporal, score clínico e aspecto macroscópico dos intestinos de camundongos após administração de inibidores da produção de eicosanoides seguida de indução de inflamação intestinal aguda e administração ou não de CTX

(A, D e G) Variação de peso durante 4 dias pós-indução do modelo experimental de inflamação aguda no intestino dos diferentes grupos experimentais. (B, E e H) Cálculo do Score clínico desses camundongos realizado pela soma dos pontos correspondentes a perda de peso e consistência das fezes de cada animal/grupo. (C, F e I) Aspecto macroscópico dos intestinos após 4 dias da indução da inflamação. Os inibidores foram administrados 1h antes do tratamento com a CTX (de acordo com a literatura). Resultados representam a média $\pm$ desvio padrão. α ETOH comparado ao TNBS; # ETOH comparado ao TNBS+CTX; ° ETOH+CTX comparado ao TNBS; ϵ ETOH+CTX comparado ao TNBS+CTX; * TNBS comparado ao TNBS+CTX; * α , $\circ$, ϵ e # $p < 0,05$.

As análises histológicas do segmento perirretal dos animais dos diferentes grupos experimentais mostrou que os inibidores INDO e NDGA aboliram o efeito terapêutico da CTX sobre a inflamação observada no grupo TNBS (Fig. 20). Assim, os animais do grupo TNBS apresentaram severa inflamação da mucosa intestinal com presença de intenso infiltrado inflamatório, perda severa de células caliciformes e das criptas intestinais, além de maior score histológico nos 3 tipos de tratamento

(salina, NDGA e INDO). Este perfil se manteve nos grupos TNBS+CTX que receberam os inibidores da produção de eicosanoides (NDGA e INDO). Em contrapartida, verificamos novamente que o grupo TNBS+CTX que recebeu apenas salina mostrou-se com inflamação intestinal menos severa que a observada no grupo TNBS.

Figura 20 - Histologia da porção perirretal de camundongos BALB/c submetidos a administração de inibidores NDGA e INDO seguida de indução da inflamação aguda com TNBS e que receberam ou não CTX

Coloração com hematoxilina-eosina do tecido intestinal (porção perirretal) de camundongos BALB/c após administração dos inibidores da produção de eicosanoides, NDGA e INDO, e controle salina (PBS). Score histológico da reação inflamatória no tecido intestinal obtido quatro dias após a indução da doença * $p < 0,05$. (Aumento microscópico de 10x).

A atividade da enzima MPO foi avaliada nesses grupos como marcador da resposta inflamatória intestinal (Fig. 21). Assim como observado nos resultados anteriores a atividade da enzima esteve aumentada nos grupos TNBS, porém não apresentou diminuição após o tratamento com a CTX nos grupos administrados com os inibidores NDGA e INDO, corroborando os resultados os quais sugerem que a ação moduladora da CTX está relacionada ao aumento da produção de eicosanóides.

Figura 21 - Dosagem da atividade enzimática da MPO nos macerados de intestinos dos animais que receberam inibidores da produção de eicosanóides

Concentração de MPO U/mg de proteína dosada por método colorimétrico (A) na porção colônica intestinal de camundongos após administração de inibidores como, NDGA e INDO, além do controles que receberam salina (PBS). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

As doenças inflamatórias intestinais estão se tornando uma epidemia mundial, com prevalência de 1% na América do Norte e em alguns países da Europa, além de relatos de aumento de incidência na Ásia e Austrália (MOLODECKY et al., 2012). Acredita-se que essas doenças estão relacionadas a industrialização das nações. De acordo com o Brasil (2002) a prevalência e a incidência em países desenvolvidos situa-se em torno de 5:100.000 e 50:100.000 casos, respectivamente. No Brasil sabe-se que a incidência da doença vem aumentando.

Essas doenças são mais frequentemente na segunda e terceira décadas de vida, mas pode afetar qualquer faixa etária. As doenças inflamatórias intestinais não são clínica ou cirurgicamente curáveis e são comumente marcadas por fases agudas e remissões. Além dos sintomas gastrointestinais típicos (diarreia, hematoquezia, cólicas abdominais entre outros), essas doenças podem apresentar manifestações extraintestinais devido ao acometimento de outros órgãos (GRINMAN, 2012). Podem ser encontradas diferenças quanto ao tipo de manifestação e sua frequência e os órgãos mais afetados são a pele, articulações, olhos e o fígado (GRINMAN, 2012).

A inapropriada e continua ativação do sistema imunológico de mucosa contra a flora normal pode estar relacionada com a causa das doenças inflamatórias intestinais. Fatores genéticos, desequilíbrio na dieta alimentar, uso de drogas e tabagismo também são listados como possíveis causas dessa exacerbada resposta imune intestinal (PODOLSKY, 2002).

Durante vários anos, o tratamento inicial para doenças inflamatórias intestinais consistiu de administração de corticosteroides, tipicamente metilprednisolona e hidrocortisona. Os corticosteroides são excelentes para induzir remissão, porém a manutenção deste terapia é problemática causando muitos efeitos colaterais (RIETDIJK; D' HAENS, 2013). A 5-ASA (ácido 5-aminosalicílico) é um anti-inflamatório bastante eficiente na manutenção da remissão na colite ulcerativa, porém na doença de Crohn é raramente recomendado devido à limitada eficácia (TALLEY et al., 2011). A introdução de anticorpos anti-citocinas inflamatórias, como o anti-TNF- α , tem sido um marco no tratamento das doenças inflamatórias intestinais. O Infliximab foi o primeiro anticorpo anti-TNF- α disponível para o

tratamento e mostrou-se eficiente na indução e manutenção da remissão dessas doenças, e também foi promissor no tratamento da fistulização na Doença de Crohn (FORD et al., 2011).

Apesar de existirem e surgirem várias terapias para essas enfermidades, as doenças inflamatórias intestinais apresentam mecanismos complexos ainda desconhecidos. A busca por substâncias com potencial modulador que tragam melhora na qualidade de vida dos pacientes, minimizando efeitos colaterais e prolongando o tempo de remissão da doença, tem sido alvo de inúmeros estudos.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar o potencial supressor e os mecanismos de ação da crotoxina (CTX) isolada do veneno da cascavel *C.d.terrificus* no modelo de inflamação intestinal aguda em camundongos. Em nosso trabalho, após estabelecimento da colite experimental aguda em animais BALB/c foi observado que a administração da CTX diminuiu o *score* clínico, a perda de peso e os sinais macroscópicos de inflamação intestinal. Além disso, por meio das análises histológicas foi possível verificar o efeito protetor da CTX contra o intenso dano tecidual no intestino dos animais que foram induzidos à desenvolver a doença.

De acordo com a literatura, semelhante ao observado no nosso modelo, o tratamento com a subunidade CA da CTX também se mostrou eficiente na melhora de doenças autoimunes. Nesses trabalhos foi descrito que a administração de várias doses consecutivas de CA, logo após a indução experimental de neurite e encefalomielite autoimunes em ratos resultou na diminuição do *score* clínico observado nessas doenças (CASTRO et al., 2007; GARCIA, 2003), porém não ocorreu reversão completa do quadro clínico em ambos os modelos experimentais, assim como observado em nossos resultados. Em contraste apesar dos trabalhos observarem o efeito modulador da subunidade CA, Freitas (2014) observou que a CTX e apenas a subunidade CB, foram capazes de modular a expressão de moléculas co-estimulatórias e a produção de citocinas pró-inflamatórias em DCs *in vitro*, já a CA não foi capaz de exercer esta função. Portanto, nesses trabalhos pode ser observado que a CTX exerce potente efeito modulador nas respostas imunológicas, porém o papel de cada subunidade (CA e CB) ainda não está bem estabelecido.

Células apresentadoras de antígenos secretam várias citocinas que determinam a diferenciação e ativação de células T. Na doença inflamatória intestinal ocorre

extensa ativação de linfócitos T auto-reativos e específicos contra antígenos microbianos levando ao desequilíbrio das populações de linfócitos Tregs, Th1, Th2, Th17 e assim, ao distúrbio da homeostasia local (SANCHEZ-MUNÓZ et al., 2008). Portanto, as citocinas secretadas pelos linfócitos T e por outras populações celulares no microambiente intestinal atuam como mediadores inflamatórios promovendo influxo celular, influenciando na produção de espécies reativas de oxigênio, síntese de PAF, de mediadores lipídicos, ativação de NF- κ B e apoptose (INCE; ELLIOT, 2007).

A fim de entender os mecanismos desencadeados pela CTX na melhora do quadro clínico e inflamatório nos animais com doença intestinal, realizamos a quantificação de citocinas e da atividade enzimática da MPO no tecido intestinal. Neste local foi encontrada alta produção IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-17 e elevada atividade da enzima MPO no grupo de animais com doença inflamatória intestinal (grupo TNBS). Por outro lado, observamos que a produção destas citocinas e a atividade da MPO estiveram diminuídas nos animais que receberam a CTX (TNBS+CTX).

Trabalhos descrevem que linfócitos e APCs atuam nas doenças inflamatórias intestinais produzindo elevadas quantidades de TNF- α que, por sua vez, exerce efeitos pró-inflamatórios como a indução da produção de IL-6 e IL-1 β , expressão de moléculas de adesão, proliferação de fibroblastos e fatores pró-coagulantes, além de atuar na iniciação da citotoxicidade celular e apoptose (BAUMANN; GAULDIE, 1994; BEGUE et al., 2006). Além dessas ações, Baert e Rutgeerts (1999) demonstraram que o TNF- α induz a produção de IFN- γ . Estes autores verificaram que o tratamento com anticorpos anti-TNF- α resultou na redução do número de células mononucleares produtoras de IFN- γ na lâmina própria de biópsias dos pacientes com doença de Crohn.

O papel pró-inflamatório da IL-6 como indutora da síntese de outras citocinas também está bem estabelecido. Yamamoto et al. (2000) verificaram que a administração de anticorpos anti-receptor de IL-6 em camundongos com colite experimental resultou em diminuição de RNAm para IFN- γ , IL1- β e até mesmo TNF- α . Além disso, foi verificado que a sinalização via IL-6 ativa o fator de transcrição STAT3, o qual induz fatores que previnem a morte celular como Bcl-2 e Bcl-xL,

importante para resistência de células T auto-reativas à apoptose, agravando a doença inflamatória intestinal (MUDTER; NEURATH, 2007).

Nas doenças inflamatórias intestinais, também pôde ser observado aumento dos níveis de IL-1 β resultante da estimulação de macrófagos do colo por antígenos, como na presença de LPS, ativa a enzima ICE (*Interleukin (IL)-1 converting enzyme*) levando a liberação de IL-1 β na mucosa intestinal (McALINDON et al., 1998). A IL-1 β juntamente com outras citocinas e com mediadores (radicais reativos de oxigênio) contribuem para a cascata de eventos da inflamação levando ao dano tecidual observado nessa resposta imunológica (McALINDON et al., 1998)

Como mencionado, em nosso modelo experimental de colite aguda induzida pelo TNBS, vimos que a CTX foi capaz de reduzir os níveis das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6, bem como os níveis de IL-1 β no macerado de intestinos dos animais. Estes resultados somados aos trabalhos acima citados indicam, portanto que a melhora do quadro clínico observado nos animais que receberam a CTX e TNBS está diretamente relacionada à capacidade da toxina de inibir a produção das citocinas pró-inflamatórias que atuam na doença intestinal.

Bai et al., (2010) encontraram alta produção de TNF- α , IL-6, IL-1 β e a atividade da enzima MPO no homogeneizado da porção colônica em camundongos com colite experimental induzida por TNBS. Após tratamento com ácido retinoico, os autores observaram que estas citocinas e a liberação da MPO diminuíram no sítio da inflamação. Portanto, assim como a CTX, o ácido retinoico (metabólito da vitamina A) apresenta propriedades moduladoras no intestino. Neste mesmo trabalho foi observada alta secreção de citocinas com perfil Th2 na cultura de células da lâmina própria provenientes dos animais com colite induzida por TNBS tratados com ácido retinoico. Em contraste, cultura de células dos animais TNBS tratados com o antagonista do ácido retinoico (LE135), aumentaram a secreção de citocinas com perfil Th1 (BAI et al., 2010).

Além de TNF- α , IL-6 e IL-1 β , a CTX foi capaz de modular a produção de IL-17 no macerado de intestino dos animais com inflamação intestinal em relação ao observado no animais que receberam somente o TNBS. De acordo com os achados de Zhang et al. (2006) níveis elevados de IL-17 são produzidos na porção colônica intestinal de camundongos após 24 e 48h da indução da doença inflamatória intestinal com TNBS. Esses mesmos autores observaram ainda, menor perda de

peso e secreção diminuída de IL-6 após a indução desta doença em camundongos deficientes do receptor para IL-17 sugerindo assim, a participação desta citocina no estabelecimento desse modelo de inflamação. He et al. (2012) observaram aumento na expressão de IL-17 em células mononucleares do baço, em células dos linfonodos mesentéricos e no colo de animais com colite induzida por TNBS em comparação ao grupo controle.

Apesar de diversas descrições das propriedades imunorreguladoras da CTX, o seu efeito sobre a produção das diferentes citocinas ainda não está bem esclarecido. Resultados de Rangel-Santos et al. (2004) mostraram que após 1h da administração da CTX via subcutânea, ocorreu a inibição da produção de IL-4, IL-10 e não de IFN- γ por esplenócitos murinos estimulados com concanavalina A (ConA). Em contraste, Cardoso et al. (2001) verificaram maior produção de IL-10 e IL-6 no soro de camundongos após injeção subcutânea de CTX.

Neste contexto, o presente estudo é o primeiro trabalho a mostrar que a CTX é capaz de modular a produção da IL-17, demonstrando assim que a toxina pode influenciar também a resposta inflamatória mediada por esta citocina.

No processo inflamatório algumas células são recrutadas para o sítio da inflamação, incluindo neutrófilos e macrófagos, os quais quando ativados secretam citocinas bem como enzimas como a MPO. Assim, a liberação da MPO é indicador indireto da resposta inflamatória e da presença desses tipos celulares (SOCCA et al., 2014). Nossos dados mostraram aumento de MPO no macerado dos intestinos de animais com inflamação intestinal (TNBS) que esteve correlacionado com a presença de neutrófilos na lâmina própria neste mesmo grupo. Após o tratamento com a CTX, os animais TNBS apresentaram não só a redução da atividade da MPO como também menor número de neutrófilos na lâmina própria intestinal. Esses dados, mais uma vez, mostram o potencial da CTX em modular a resposta inflamatória intestinal induzida por TNBS.

As citocinas pró-inflamatórias também foram analisadas (expressão gênica) nas células presentes nos linfonodos e placas de Peyer dos nossos grupos experimentais. Os resultados obtidos foram semelhantes à produção das citocinas nos homogeneizados de tecido intestinal, mensurada por ELISA. Os ensaios de PCR em tempo real mostraram aumento na expressão de RNA mensageiro para IL-6, IL-1 β e IL-17 nas células linfoides do grupo TNBS quando comparado aos grupos

controles. No entanto, a administração da CTX nos animais que receberam a instilação do TNBS promoveu menor expressão destas citocinas pelas células dos tecidos linfoides. Apesar dos níveis de IL-6 e IL-1 β estarem diminuídos após o tratamento com CTX, não houve diferença estatística entre o grupo TNBS e TNBS+CTX, mostrando que o forte efeito modulador da CTX está mais atuante no local da inflamação (intestino).

A IL-23 é uma citocina heterodimérica composta pela subunidade IL23p19 e pela IL23p40/IL12p40, que está presente também na IL-12 (BRAND, 2010). É produzida principalmente por APCs (TRINCHIERI, 2003). Esta citocina apresenta papel importante no desenvolvimento da inflamação intestinal orquestrando mecanismos dependentes de células T (principalmente do perfil Th17), da imunidade inata e ainda, é capaz de suprimir a resposta de células T regs no intestino (DANESI et al., 2010).

Hue et al. (2006) mostraram que a administração de anticorpos anti-IL-23p19 foi capaz de suprimir a inflamação intestinal crônica induzida pela infecção de *Helicobacter hepaticus* em camundongos deficientes em célula T. Neste mesmo modelo experimental, Kulberg et al. (2006) observaram que camundongos deficientes em IL-23p19 e IL-12/IL-23p40 são resistentes ao desenvolvimento da colite, enquanto que a deficiência apenas da subunidade p35, específica para IL-12, não protege os animais da indução da doença.

Dentre as principais funções da IL-23 está a sua capacidade de manter e estabilizar as características fenotípicas das células Th17, auxiliando na sobrevivência desse perfil celular (DONG, 2008). Considerando essas observações, analisamos a expressão gênica de IL-23 nas células obtidas dos grupos experimentais. Os resultados mostraram que a expressão desta citocina esteve aumentada no grupo TNBS em relação aos grupos controles assim como no grupo tratado com a CTX.

Visto que esta citocina está relacionada com a produção de IL-17 e à manutenção das células com perfil Th17, este aumento da expressão gênica da IL-23 no grupo TNBS pode explicar o aumento encontrado na expressão e secreção de IL-17 nas células linfoides e macerados dos intestinos, respectivamente. Neste sentido, no grupo TNBS que recebeu a CTX a queda na expressão gênica da IL-23 nos linfonodos também esteve relacionada à diminuição da expressão gênica de IL-

17 nesses mesmos órgãos, assim como na secreção desta citocina nos macerados dos intestinos.

Em relação ao IFN- γ , esta citocina esteve aumentada no grupo TNBS em relação aos controles e ao TNBS+CTX. No entanto, essa diferença entre os grupos TNBS e TNBS+CTX não foi significativa, tanto na sua detecção por ELISA como a análise da expressão relativa do RNAm.

A presença de resposta de células Th1 secretoras de IFN- γ , além de células Th17 é descrita na doença de Crohn e relatada também em inflamações experimentais no intestino (SUJINO et al., 2011). Considerando essas observações e o fato do nosso modelo ser de resposta aguda, ou seja, desenvolvido 4 dias após a administração de apenas uma dose de TNBS, podemos sugerir que a produção de IFN- γ não distinta entre os grupos TNBS e TNBS+CTX, seja devido ao tempo da análise realizada.

Além disso, os dados sugerem que essa resposta inflamatória inicial verificada seja predominantemente mediada por citocinas pró-inflamatórias e IL-17 com aparecimento mais tardio de uma resposta Th1. Neste sentido, Scrivisan e Summerlin (2009) observaram a presença de células Th1 somente após o 7º dia da indução de doença inflamatória intestinal pela administração de duas doses TNBS. Outros trabalhos mostram que células Th17 clássicas são menos estáveis e podem se converter em células produtoras de IFN- γ *in vivo* (BENDING et al., 2009; LEE et al., 2009), o que poderia acontecer em nosso modelo após os 4 dias analisados. Porém, novos estudos precisam ser realizados para responder esta questão e avaliar a plasticidade de células Th17/Th1.

Somada a avaliação da produção de citocinas e da atividade da MPO, a análise histológica dos intestinos dos camundongos BALB/c foi um importante parâmetro para verificar o estabelecimento da inflamação induzida pelo TNBS e a ação da CTX na resposta inflamatória. Dados da literatura corroboram nossos achados nos cortes histológicos quanto ao intenso dano tecidual e extenso infiltrado inflamatório observados nos nossos experimentos de indução de inflamação por TNBS (ALEX et al., 2009; CARUSO et al., 2009). Já nos intestinos dos animais que foram tratados com a CTX houve significativa melhora na inflamação e no dano tecidual, assim como Bai et al., (2010) que também verificaram melhora desses aspectos em cortes

histológicos de animais com inflamação induzida por TNBS e que foram tratados com ácido retinoico.

Nossos resultados mostraram que a CTX foi capaz de modular negativamente vários parâmetros da inflamação intestinal aguda como: o score clínico, infiltrado celular, secreção de citocinas pró-inflamatórias e atividade da MPO nos camundongos que receberam o TNBS, mostrando a capacidade moduladora da toxina na doença intestinal.

Em nosso trabalho também foi avaliada a produção de citocinas anti-inflamatórias como TGF- β e IL-10 no macerado de intestino por ELISA, e a expressão gênica das mesmas em linfonodos e placas de Peyer. Com a administração da CTX após a indução da doença inflamatória intestinal foi verificada a secreção de altos níveis dessas citocinas nos intestinos. E ainda verificamos aumento da expressão gênica de TGF- β e IL-10 no grupo TNBS+CTX nos órgãos linfoides estudados.

Este forte potencial imunomodulador já foi demonstrado em trabalhos do nosso grupo, no qual Ricardi (2010) observou a produção de TGF- β , IL-10, PGE₂ em cultura de células de camundongos BALB/c imunizados com SAH ou OVA tratados com CTX. Favoretto et al. (2011) mostraram ainda, a supressão da produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-SAH e resposta celular OVA-específica após a administração de CTX em camundongos imunizados com OVA.

TGF- β e IL-10 desempenham importante papel no controle da inflamação intestinal. O desenvolvimento de colite espontânea em animais deficientes em IL-10 demonstrou a ligação entre a produção desta citocina e a regulação da resposta imune colônica (KÜHN et al., 1993). Este fato pode explicar os altos níveis de IL-10 no macerado de intestino mostrados em nossos grupos controles ETOH e ETOH+CTX, exercendo a função de manter a homeostase do sistema imunológico no intestino desses animais.

Considerando ainda, os resultados obtidos de expressão de RNAm das citocinas pró- e anti-inflamatórias, Peters et al. (2011) mostraram que células Th17 são mais susceptíveis aos sinais de inibição provocados por IL-10 quando comparadas à outros subtipos de células T efectoras. Assim sendo, podemos sugerir que a diminuição da expressão de IL-17 e IL-23 seja um reflexo do aumento da IL10 nos órgãos linfoides do grupo TNBS tratados com CTX em relação ao grupo TNBS.

TGF- β é uma citocina altamente pleiotrópica e pode modular a resposta imunológica via múltiplos mecanismos. Pode ser produzido por muitas células linfoides e não-linfoides inibindo ativação induzida por antígenos, proliferação e diferenciação celular (LI; SANJABI; FLAVELL, 2006). Fuss et al. (2002) demonstraram que a administração de anticorpos anti-TGF- β e anti-IL-10 subsequente à indução da inflamação com TNBS foi capaz de abolir a prevenção da doença intestinal. Ainda em modelos de colite experimental induzida por TNBS, Yang et al. (2010) observaram que exossomas derivados de DCs previamente tratadas com IL-10 suprimiram a inflamação intestinal aguda em ratos Wistar.

A fim de verificar se o TGF- β e a IL-10 são cruciais para imunomodulação exercida pela CTX no modelo de inflamação aguda intestinal, foram realizados experimentos com injeção de anticorpos bloqueadores para essas citocinas *in vivo*. Observamos que ao tratar os animais com anti-TGF- β ou anti-IL-10, o perfil de regulação da resposta inflamatória intestinal exercido pela CTX foi abolido. Portanto, após o tratamento com esses anticorpos os animais TNBS+CTX apresentaram ao final dos 4 dias de indução média de perda de peso corporal semelhante àquela encontrada no grupo TNBS. Além disso, o grupo TNBS+CTX tratado com os anticorpos bloqueadores apresentaram score clínico e histológico, necrose intestinal e atividade da enzima MPO semelhantes aqueles encontrados no grupo TNBS, demonstrando papel relevante dessas citocinas no mecanismo de ação da CTX sobre esse modelo de inflamação intestinal.

Outros trabalhos também comprovam a importância do TGF- β na inflamação intestinal através da administração de anticorpos bloqueadores desta citocina. Ogino et al. (2011) em modelo de colite induzida por transferência de células T CD4⁺ *naive* para camundongos *SCID* observaram desenvolvimento de colite crônica com significativo aumento da resposta Th17 e Th1 no colo. Por outro lado, a administração de anticorpos anti-TGF- β mesmo com a co-transferência de células T reguladoras nesse modelo, aboliu o efeito protetor desta população celular nos animais, o que resultou em elevados níveis de IL-17 e IFN- γ no colo.

Oida et al. (2003) demonstraram em camundongos *SCID*, que a transferência de células CD4⁺CD45^{low} CD25⁺ ou CD25⁻ expressando peptídeo latente-associado (LAP) em suas membranas juntamente com o TGF- β são capazes de inibir a colite induzida pela presença de células CD4⁺CD45^{high}. Ainda neste trabalho, foi mostrado

que o efeito regulador do TGF- β sobre este modelo de colite também foi abolido quando os animais receberam anticorpos anti-TGF- β um dia antes da indução da doença.

Asseman et al. (2003) verificaram que a administração de anticorpos anti-receptor de IL-10 em camundongos imunocompetentes resultou em desenvolvimento de colite mostrando, portanto a importância desta citocina no controle da resposta imune no intestino. Em outro trabalho, Melgar et al. (2003) verificaram baixos níveis de IL-10 em biópsias de tecidos de pacientes com doença de Crohn e granulomas. Em conjunto, essas observações ressaltam a importância da IL-10 na homeostasia da mucosa intestinal e pode explicar que na ausência dessa citocina verificamos pontos de necrose nos intestinos até mesmo dos animais que receberam a instilação somente do ETOH.

Prostanoides e leucotrienos apresentam potentes efeitos inflamatórios (FORD-HUTCHINSON, 1985). No entanto, alguns mediadores derivados do ácido araquidônico como as lipoxinas exercem funções anti-inflamatórias (GILROY et al., 2003; LEVY et al., 2001), inibindo a migração de neutrófilos e eosinófilos (DIAMOND et al., 1999). Outros trabalhos também sugerem que a PGE₂ podem inibir a fagocitose de macrófagos (DAVIDSON et al., 1998; KOZLOV et al., 1990; OROPEZA-RENDON et al., 1980). Essa prostaglandina pode aumentar os níveis de AMPc e especificamente diminuir a ingestão de células apoptóticas por macrófagos (ROSSI et al., 1998).

A fim de compreender os mecanismos usados pela CTX para exercer sua modulação no modelo experimental proposto, nesse trabalho também foi estudada a produção de eicosanoides e seu papel na inflamação intestinal. Em nossos experimentos pudemos observar que após o tratamento com a CTX os animais induzidos com TNBS produziram níveis maiores de PGE₂ e LXA₄ em seus intestinos. Moreira et al. (2008) mostraram que macrófagos peritoneais quando incubados com a fração PLA₂ (CB) da CTX produzem altos níveis de PGE₂. Além disso, foi observado que a crotapotina (CA), outra subunidade da CTX, foi capaz de inibir a proliferação de esplenócitos murinos quando estimulados com ConA além de induzir a síntese de PGE₂ nestas culturas (GARCIA et al., 2003).

Considerando a alta produção desses mediadores induzida pela CTX, estudamos o papel deles na modulação da resposta inflamatória exercida pela

toxina. Como descrito, foi administrado o inibidor não seletivo de lipoxigenase - NDGA (*Nordihydroguaiaretic acid*) e inibidor da cicloxigenase - Indometacina (INDO) após a indução da doença pela instilação do TNBS seguida de tratamento com a CTX.

Trabalhos de Sampaio et al. (2006b) demonstraram que macrófagos de ratos quando incubados com veneno crotálico, CTX ou fração PLA₂ (CB), e não a crotapotina (CA), secretam altos níveis de PGE₂, LXA₄ e LTB₄. Esses autores também mostraram que o *zileuton*, inibidor da síntese de lipoxigenase, foram capazes de abolir o efeito inibitório da CTX sobre a fagocitose de partículas de zymosan opsonizadas por macrófagos peritoneais em cultura.

Nossos resultados sugerem que a LXA₄ e PGE₂ participam no mecanismo imunomodulador da CTX sobre a inflamação intestinal. Pudemos verificar que os animais induzidos com TNBS e que receberam os inibidores NDGA ou INDO seguida da CTX apresentaram perda de peso, *score* clínico e histológico, e atividade da MPO semelhantes aos observados nos grupos TNBS tratados com NDGA ou INDO.

Além disso, observamos que a atividade da MPO nos intestinos dos animais TNBS e TNBS+CTX após a administração do inibidor NDGA esteve aproximadamente o dobro daquela observada nos animais que receberam PBS ou INDO. Esses dados sugerem que a LXA₄ pode modular o influxo de neutrófilos para o sítio intestinal. Corroborando essa hipótese, Soyombo et al. (1994) relatam que em estudos *in vitro* a LXA₄ foi capaz de inibir a quimiotaxia de neutrófilos e eosinófilos. Em outro trabalho, Bannenberg et al. (2005) mostraram que a LXA₄ inibiu a migração de neutrófilos em modelo de peritonite.

Nunes et al. (2010) observaram que o tratamento de animais com NDGA 30 minutos antes da administração da CTX aumentou o influxo de células no peritônio induzido pela carragenina (ip.) quando comparado aos animais que receberam somente a CTX, mostrando o envolvimento da LXA₄ no mecanismo modulador da toxina sobre a migração de células no local da inflamação.

Em outro trabalho desenvolvido por Freitas (2014) foi observada a importância da LXA₄ na modulação exercida pela CTX sobre a atividade funcional de DCs. Este trabalho mostrou que o cultivo das DCs com o Boc2, um antagonista do receptor peptídeo-formil para LXA₄, aboliu o efeito supressor da CTX sob essas células,

aumentando a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-1 β , TNF- α e IL-6) e a expressão de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86) e de MHC de classe II em DCs cultivadas com LPS. Tendo em vista ainda a relação entre lipoxina e mecanismos reguladores usados pela CTX ou pelo veneno total de *C.d.t.*, Da Silva, Sampaio e Gonçalves (2013) mostraram que os efeitos inibitórios da inflamação, causados pela injeção do veneno total de *C.d.t.*, observada em edema de pata em camundongos Swiss após administração de BCG (via subcutânea), foram abolidos nos animais pré-tratados com antagonistas de receptores peptídeo-formil (Boc2, dexametasona e *zileuton*).

No modelo de colite induzido por TNBS, Chen et al. (2011) observaram que o tratamento com ácido hialurônico nos animais C3H/HeN induziu aumento da expressão de cicloxigenase 2 (Cox2) e da síntese de PGE₂, as quais estiveram envolvidas na significativa melhora do score clínico e histológico desses animais. Baratelli et al. (2005) mostraram que adição de PGE₂ em cultura de células CD4⁺CD25⁻ e CD4⁺CD25⁺ induziu e aumentou a expressão de FoxP3, respectivamente nestes conjuntos de células. Esses achados corroboram os nossos resultados, nos quais também observamos aumento na produção de PGE₂ e aumento do número de células CD4⁺FoxP3⁺ no intestino dos animais TNBS tratados com CTX em relação ao grupo TNBS.

Chen et al. (2009) demonstraram que o aumento da concentração de PGE₂ em cultura de células CD4⁺CD62L⁺ *naive*, cultivadas com TGF- β e IL-6, diminui a produção de IL-17 e a expressão de ROR γ t por essas células.

Vários mecanismos são propostos para a ação moduladora da LXA₄ na inflamação. Qiu et al. (2001) reportaram que a ativação de receptores para LXA₄ regula células polimorfonucleares *in vitro* e promove a resolução da inflamação através da ativação de NAB1, um correpessor transcricional, conhecido como um gene relacionado à resposta por glicocorticoides. Wu et al. (2008) observaram que células endoteliais pulmonares incubadas com LPS na presença de LXA₄ apresentam menor expressão de RNAm para IL-1 β , IL-6 e IL-8, e ativação de NF κ B em relação ao observado em culturas incubadas somente com LPS.

Machado et al. (2006) mostraram que a LXA₄ foi capaz de ativar dois receptores em DCs, AhR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*) e LXAR (*G-protein-coupled receptor LXAR*) desencadeando a expressão do SOCS-2 (*Suppressor of Cytokine Signaling*-

2), o qual está envolvido na inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias. Em outro trabalho, Souza et al. (2007) constataram que a administração do análogo 15-epi-LXA₄ em camundongos preveniu o dano tecidual, produção de TNF- α , letalidade após a isquemia/reperfusão intestinal e induziu altos níveis de IL-10. Em nossos experimentos também observamos que o aumento da produção de LXA₄ esteve acompanhado pela alta produção de IL-10 e diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) nos macerados dos intestinos de camundongos que receberam o TNBS e a CTX, demonstrando o papel regulador exercido por esta toxina.

Além dos parâmetros acima descritos, investigamos outras populações celulares presentes na lâmina própria que participam da resposta inflamatória intestinal. Macrófagos são os leucócitos mais abundantes no intestino dos mamíferos e são encontrados em grande número na lâmina própria e em menor proporção no epitélio intestinal (MOWAT; BAIN, 2011). Assim, tivemos como objetivo estudar as populações de macrófagos encontradas na lâmina própria dos animais induzidos à desenvolver a inflamação intestinal e que receberam ou não a CTX. Notamos que os animais TNBS apresentaram aumento no número tanto de células CD11b⁺CD68⁺ como de células CD11b⁺CD206⁺ em relação aos grupos controles. No entanto, verificamos que a administração da CTX resultou em menor número dessas duas populações celulares em relação ao grupo que recebeu somente o TNBS.

A ação anti-inflamatória do veneno de *C.d.terrificus* e da CTX assim como sobre a atividade funcional de macrófagos tem sido foco de vários estudos. Dentre eles, Souza-e-Silva et al. (1996) demonstraram que venenos crotálicos apresentam atividade anti-inflamatória sobre macrófagos residentes ou previamente ativados na cavidade peritoneal. Os autores verificaram ainda, que o veneno total de *C.d.terrificus* foi capaz de reduzir a migração celular para cavidade peritoneal dos animais induzidos à inflamação aguda pela injeção de tioglicolato. Sampaio et al. (2003) observaram que o veneno total e a CTX também foram capazes de inibir o espreado e fagocitose de macrófagos peritoneais de ratos Wistar, porém estimularam a produção de NO, H₂O₂ e atividade antimicrobiana. Em outro trabalho, Lima et al. (2012) observaram que o efeito inibidor da CTX sobre a fagocitose em neutrófilos, é resultante da inibição da fosforilação de tirosina. Além disso,

verificaram que esse efeito da toxina sobre os neutrófilos é observado até 14 dias após a injeção subcutânea de CTX em ratos.

Visto que a crotoxina pode influenciar na atividade de macrófagos, em nosso trabalho foi observado que a CTX foi capaz de regular a subpopulação de macrófagos M1 (CD11b⁺CD68⁺) na doença inflamatória intestinal, a qual apresenta perfil pró-inflamatório, com acentuada atividade microbicida, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e secreção de TNF- α , IL-8, IL-1 β , IL-6 e IFN- γ (GORDON, 2005). O baixo número desse subtipo celular correlaciona também com a melhora clínica dos animais TNBS+CTX, e com a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias nos intestinos dos animais deste grupo. No entanto, verificamos também número aumentado de células CD11b⁺CD206⁺ na lâmina própria dos animais TNBS, as quais são classicamente secretoras de IL-4, IL-10 e TGF- β , e ainda observamos diminuição desta população celular após o tratamento com CTX. O aumento no grupo TNBS pode ser explicado pelo fato de algumas populações de macrófagos M2 serem induzidas em resposta à imunocomplexos, alguns agonistas de TLR (LPS) e ligantes de receptor de IL-1 (IL-1R) (MANTOVANI et al., 2004), os quais podem estar presentes durante o desenvolvimento da inflamação intestinal induzida pelo TNBS. Os macrófagos M2 apresentam papel relevante como moduladores da resposta imunológica, Tierney et al. (2009) mostraram que a injeção de camundongos com essa população celular foi capaz de protegê-los contra o desenvolvimento de doenças inflamatórias como a encefalomielite autoimune experimental. Além de participarem no controle da resposta inflamatória, Mantovani et al. (2004) relatam que as células M2 promovem angiogênese, remodelamento e reparo tecidual. Dessa maneira a população aumenta de células M2 na lâmina própria dos animais TNBS pode ser resultante da intensa resposta inflamatória desenvolvida no local, na tentativa de reparar o dano tecidual causado. Somados a esses achados, nossos dados permitem inferir que os mecanismos de regulação usados pela CTX para o controle dessa inflamação intestinal não estão envolvidos com o aumento da população CD11b⁺CD206⁺ no intestino dos animais TNBS+CTX.

A fim de compreender quais populações linfocíticas estariam envolvidas na resposta inflamatória intestinal do modelo proposto, também estudamos o perfil fenotípico de células T encontradas nos linfonodos mesentéricos, inguinais,

periaórticos, placas de Peyer e na lâmina própria intestinal dos diferentes grupos experimentais. As análises permitiram verificar maior número absoluto de células TCD4⁺FoxP3⁺, correspondente ao perfil de células T regs, nos animais tratados com CTX e que receberam o TNBS em relação ao grupo TNBS não tratado. Semelhante aos nossos resultados, Bai et al. (2009) verificaram que o efeito modulador do ácido retinoico sobre a colite induzida pelo TNBS em camundongos BALB/c também esteve diretamente relacionado ao aumento de células FoxP3⁺ nos linfonodos mesentéricos e na lâmina própria intestinal desses animais. Os autores mostraram ainda, maior número de células com expressão do fator de transcrição ROR γ t, característico de células Th17 e menor expressão de FoxP3⁺ nos animais com colite e não tratados com ácido retinoico. Estes resultados sugerem que o perfil de células Th17 está relacionado ao agravamento da inflamação intestinal enquanto que a presença de células Tregs está relacionada à melhora da doença.

Em outro trabalho, Round e Mazmanian (2010) observaram que a molécula imunorreguladora PSA (polissacarídeo A) da bactéria comensal *Bacteroides fragilis*, através da sinalização via TLR2, foi capaz de induzir aumento de células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e secreção de IL-10 em linfonodos mesentéricos de animais com colite experimental induzida por TNBS.

Assim como citado acima, também observamos a relação direta entre o aumento no número de células T CD4⁺FoxP3⁺ com o aumento na produção de citocinas moduladoras IL-10 e TGF- β na lâmina própria e nos linfonodos e placas de Peyer no grupo de animais que receberam TNBS e foram tratados com CTX.

Izcue et al. (2006) descreveram que a frequência de células expressando FoxP3 está aumentada em animais deficientes em IL-23 sugerindo, portanto que esta citocina pode suprimir a atividade de células Tregs além de promover a diferenciação de células T efectoras (Th17), as quais contribuem para o surgimento da colite. Essas observações também estão de acordo com os nossos achados, visto que a diminuição da expressão gênica de IL-17 e IL-23 nos órgão linfoides secundários e redução na produção de IL-17 nos macerados de intestinos no grupo TNBS+CTX esteve acompanhada pelo aumento do número de células T CD4⁺FoxP3⁺ tanto na lâmina própria quanto nos órgão linfoides secundários desses animais.

O ROR γ t além de ser identificado como o principal fator de transcrição que leva a diferenciação de células Th17, pode atuar em conjunto com outros fatores como STAT3, ROR α e IRF4 neste processo (BRUSTLE et al., 2007; IVANOV et al., 2006; KIMURA; NAKA; KISHIMOTO, 2007;). A importância de células ROR γ t⁺ (Th17) na colite experimental foi evidenciada por Leppkes et al. (2009). Neste trabalho os autores mostraram em camundongos RAG-deficientes que a transferência de células T CD4⁺ de animais do tipo selvagem (*wild type*) resultava em colite, enquanto que camundongos que receberam células T deficientes em ROR γ t não desenvolveram a doença. Foi observado em nossos resultados que a frequência de células CD4⁺ROR γ t⁺ esteve aumentada nos linfonodos e na lâmina própria dos animais doentes (TNBS) e encontrou-se diminuída nos animais que receberam a CTX (TNBS+CTX). Esses dados em conjunto com os de análise da expressão gênica de IL-17 e IL-23 e de secreção de IL-17 mostram a importância das células Th17 no desenvolvimento da colite experimental aguda e, ainda sugerem que a CTX foi capaz de inibir esta resposta Th17 na doença inflamatória intestinal aguda.

O papel das células Th1, as quais expressam o fator de transcrição Tbet, é comprovado em autoimunidades e certas neoplasias. Antes da identificação e caracterização de células Th17, estas células Th1 eram consideradas como as principais mediadoras da patogenia na doença de Crohn (BRAND, 2010). Este fato foi baseado em observações descrevendo o aumento da produção de IL-12 por macrófagos na doença de Crohn (MONTELEONE et al., 1997; PARRONCHI et al., 1997). Somado a isso, foi visto que a análise de extrato nuclear de células T, em lesões de pacientes com doença de Crohn, mostrou altos níveis de STAT4, Tbet e outros fatores de transcrição associados à resposta Th1 correlacionados com a sinalização celular mediada por IL-12 (NEURATH; FINOTTO; GLIMCHER, 2002).

Assim sendo, analisamos em nosso modelo experimental a presença de células CD4⁺Tbet⁺. Nossos resultados mostraram maior frequência dessa população celular na lâmina própria e nos órgãos linfoides estudados associados à mucosa dos animais do grupo TNBS em relação aos demais grupos. Apesar de termos observado redução dessa população no grupo que recebeu a CTX, essa diferença não foi significativa. Esses resultados estão diretamente relacionados à detecção de IFN- γ nos linfonodos e nos macerados intestinais, visto que apesar dos níveis desta

citocina estarem mais baixos no grupo TNBS tratado com a CTX em relação ao TNBS, também não houve diferença significativa entre eles.

Em vista desses resultados, acreditamos que no nosso modelo parece ocorrer predomínio da resposta Th17 sobre a Th1, visto que a melhora clínica dos animais TNBS tratados com CTX pode estar relacionada a diminuição do número de células CD4⁺ROR γ t⁺ e dos níveis de IL-17 nos intestinos e linfonodos. Nossos dados são corroborados pelo trabalho de Jin et al. (2012), no qual foi demonstrado que camundongos IL-17^{-/-} apresentaram menor infiltrado de neutrófilos no intestino e menor *score* inflamatório que os camundongos IFN- γ ^{-/-} ou *wild type* na inflamação induzida pelo TNBS. Esses autores sugerem que a IL-17 desempenha papel crucial nos estágios iniciais da colite aguda induzida por TNBS. Os autores sugerem que esta citocina pode destruir a barreira mucosa-intestinal, inibir o reparo tecidual do epitélio e promover resposta imune patológica no intestino (JIN et al., 2012).

O conjunto de dados obtidos nesse trabalho permitiu constatar o potente efeito modulador da CTX sobre a resposta inflamatória experimental induzida pelo TNBS. Além disso, pudemos identificar elementos imunes envolvidos nessa ação moduladora da toxina. Portanto, esses resultados acrescentam informações relevantes sobre a ação de uma molécula com potencial imunomodulador e abrem novas perspectivas de estudos focados no entendimento da ação da CTX.

6 CONCLUSÕES

O modelo de indução da inflamação intestinal aguda utilizando o TNBS foi eficientemente estabelecido nos camundongos BALB/c. A CTX mostrou-se um promissor agente imunorregulador nesta doença, visto que foi capaz atenuar os sinais clínicos avaliados, bem como inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-17 e a liberação de MPO nos camundongos que receberam o TNBS. Somado a isso, verificamos menor número de neutrófilos e macrófagos (M1 e M2) na lâmina própria obtida dos animais que receberam a CTX e TNBS em relação ao grupo de animais que apresentaram intensa reação inflamatória (TNBS).

A CTX promoveu a secreção de TGF- β e IL-10 e a produção de PGE₂ e LXA₄. A neutralização dessas citocinas ou o bloqueio da síntese desses eicosanoides indica que a CTX necessita de TGF- β e IL-10, e dos mediadores lipídicos PGE₂ e LXA₄ para atuar na melhora do quadro inflamatório observado nos camundongos que receberam o TNBS.

As análises de expressão gênica e secreção das citocinas estão diretamente relacionadas com o predomínio das populações celulares encontradas tanto nos linfonodos como na lamina própria intestinal. Desse modo, a CTX promoveu aumento das células T reguladoras (CD4⁺FoxP3⁺) e diminuição da população Th17 (células T CD4⁺ROR γ ⁺), populações estas envolvidas na homeostasia ou exacerbação da resposta de mucosa como na Doença de Crohn, respectivamente. No entanto, verificamos que a CTX não foi capaz de inibir a presença de células Th1 (CD4⁺Tbet⁺) nos linfonodos e lâmina própria dos animais

Este trabalho mostrou que a CTX foi capaz de modular a resposta inflamatória (principalmente do tipo Th17) no modelo experimental de colite induzido pelo TNBS, porém novos estudos devem ser realizados para o entendimento dos complexos mecanismos utilizados por esta toxina na imunorregulação.

REFERÊNCIAS*

- ADUKAUSKIENĖ, D.; VARANAUSKIENĖ, E.; ADUKAUSKAITĖ, A. Venomous snakebite. **Medicina**, v. 47, n. 8, p. 461-467, 2011.
- ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V.; RIVINO, L.; GEGINAT, J.; JARROSSAY, D.; GATTORNO, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F.; NAPOLITANI, G. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17- producing T helper memory cells. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 639–646, 2007.
- ALEX, P.; ZACHOS, N.; NGUYEN, T.; GONZALES, B.; CHEN, T.; CONKLIN, L.; CENTOLA, M.; LI, X. Distinct Cytokine Patterns Identified from Multiplex Profiles of DSS, Murine TNBS-induced Colitis”, **Inflam. Bow. Dis.**, v. 15, p. 341-352, 2009.
- ALIBERTI, J.; REIS E SOUSA, C.; SCHITO, M.; HIENY, S.; WELLS, T.; HUFFNAGLE, G.B.; SHER, A. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. **Nat. Immunol.**, v. 1, n. 1, p. 83-87, 2002.
- ANNUNZIATO, F.; COSMI, L.; SANTARLASCI, V.; MAGGI, L.; LIOTTA, F.; MAZZINGHI, B.; PARENTE, E.; FILÌ, L.; FERRI, S.; FROSALI, F.; GIUDICI, F.; ROMAGNANI, P.; PARRONCHI, P.; TONELLI, F.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. **J. Exp. Med.**, v. 204, p. 1849–1861, 2007.
- ASSEMAN, C.; READ, S.; POWRIE, F. COLITOGENIC Th1 cells are present in the antigen-experienced T cell pool in normal mice: control by CD4+ regulatory T cells and IL-10. **J. Immunol.**, v. 171, p. 971–978, 2003.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Acidente crotálico. In J. L. C, Cardoso; F. O. S. França; F. H. Wen; C. M. S Málaque; V. Hadda Jr. **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**, 1ª. Ed., São Paulo, Sarvier, p. 91-107, 2003.
- BAERT, F. J.; RUTGEERTS, P. R. Anti-TNF strategies in Crohn’s disease: mechanisms, clinical effects, indications. **Int. J. Colorectal. Dis.**, v. 14, p. 47-51, 1999.
- BAI, A.; LU, N.; GUO, Y.; LIU, Z.; CHEN, J.; PENG, Z. All-trans retinoic acid down-regulates inflammatory responses by shifting the Treg/Th17 profile in human ulcerative and murine colitis. **J. of Leukocyte Biology**, v. 86, p. 959-969, 2009.
- BAI, A.; LU, N.; ZENG, H.; LI, Z.; ZHOU, X.; CHEN, J.; LIU, P.; PENG, Z.; GUO, Y. All-Trans Retinoic Acid Ameliorates Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Colitis by Shifting Th1 to Th2 Profile. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 30, p. 37-44, 2010.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BANNENBERG, G. L.; CHIANG, N.; ARIEL, A.; ARITA, M.; TJONAHEN, E.; GOTLINGER, K. H.; HONG, S.; SERHAN, C. N. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. **J. Immunol.**, v. 174, p. 4345–4355, 2005.

BARATELLI, F.; LIN, Y.; ZHU, L.; YANG, S. C.; HEUZÉ-VOURC'H, N.; ZENG, G.; RECKAMP, K.; DOHADWALA, M.; SHARMA, S.; DUBINETT, S. M. Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. **J. Immunol.**, v. 175, n. 3, p. 1483-1490, 2005.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunol. Today**, v. 15, p. 74-80, 1994.

BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos- Revisão. **JBM**, v. 65, p. 209-220, 1993.

BEGUE, B.; WAJANT, H.; BAMBOU, J. C.; DUBUQUOY, L.; SIEGMUND, D.; BEAULIEU, J. F.; CANIONI, D.; BERREBI, D.; BROUSSE, N.; DESREUMAUX P.; SCHMITZ, J.; LENTZE, M. J.; GOULET, O.; CERF-BENSUSSAN, N.; RUEMMELE, F. M. Implication of TNF-related apoptosis inducing ligand in inflammatory intestinal epithelial lesions. **Gastroenterology**, v. 130, p. 1962-1974, 2006.

BENDING, D.; DE LA PENA, H.; VELDHOEN, M.; PHILLIPS, J. M.; UYTENHOVE, C.; STOCKINGER, B.; COOKE, A. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. **J. Clin. Invest.**, v.3, p.565-572, 2009.

BERCOVICI, D. et al. A systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mem. Inst. Butantan**, v. 49, p. 69-78, 1987.

BON, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M. S.; LAMBEZAT, M. P.; RADVANYI, F.; SALIOU, B. Biochemical analysis of the mechanism of action of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from snake venom. In: DOLLY, O. J. (Ed.). **Neurotoxins in Neurochemistry**. Chichester: Ellis Horwood, 1988. p. 52-63.

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 Physiol. Pharmacol. Latinoam.**, v. 39, p. 439-448, 1989.

BOUMA, G.; KAUSHIVA, A.; STROBER, W. Experimental murine colitis is regulated by two genetic loci, including one on chromosome 11 that regulates IL-12 responses. **Gastroenterology**, v. 123, p. 554-565, 2002.

BRADFORD, H. F.; RICHARDS, C. D. Specific release of endogenous glutamate from piriform cortex stimulated in vitro. **Brain Res.**, v. 105, p. 168-172, 1976.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.**, v. 78, p. 206-209, 1982.

BRAND, S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. **Gut**, v. 58, p. 1152-1167, 2009.

BRANDTZAEG, P. Inflammatory bowel disease: clinics and pathology. Do inflammatory bowel disease and periodontal disease have similar immunopathogeneses? **Acta Odontol. Scand.**, v. 59, p. 235-243, 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas**. 2002. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/dsra/protocolos/do_d10_00.htm>. Acesso em 15 abr. 2014.

BRÜSTLE, A.; HEINK, S.; HUBER, M.; ROSENPLÄNTER, C.; STADELMANN, C.; YU, P.; ARPAIA, E.; MAK, T. W.; KAMRADT, T.; LOHOFF, M. The development of inflammatory t(h)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 958-966, 2007.

BURKHART, C.; LIU, G. Y.; ANDERTON, S. M.; METZLER, B.; WRAITH, D. C. Peptide-induced T cell regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: a role for IL-10. **International Immunology**, v. 11, p. 1625-1634, 1999.

CARDOSO, D.F.; MOTA, I. Effects of Crotalus venom on the humoral and cellular immune responses. **Toxicon**, v. 35, p. 607-612, 1997.

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 Inflamm.**, v. 10, n. 3, p. 125-133, 2001.

CARDOSO, D. F.; RANGEL-SANTOS, A.; DOS-SANTOS, E. C.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C.; MOTA, I. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon**, v. 43, n. 7, p. 801-810, 2003.

CARUSO, R.; SARRA, M.; STOLFI C.; RIZZO, A.; FINA, D.; FANTINI, M.; PALLONE, F.; MACDONALD, T.; MONTELEONE, G. Interleukin-25 inhibits interleukin-12 production and Th1 cell-driven inflammation in the gut. **Gastroenterology**, v. 136, p. 2270-2279, 2009.

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

CERF-BENSUSSAN N, GABORIAU-ROUTHIAU V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? **Nat. Rev. Immunol.**, v. 186, p. 1531-1537, 2010

CHEN, Y.; KUCHROO, V. K.; INOBE, J.; HAFLER, D. A.; WEINER, H. L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. **Science**, v. 265, p. 1237–1240, 1994.

CHEN, W.; JIN W.; HARDEGEN N.; LEI, K. J.; LI, L.; MARINOS, N.; MCGRADY, G.; WAHL, S. M. Conversion of peripheral CD4+CD25– naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. **J. Exp. Med.**, v. 198, p. 1875-1886, 2003.

CHEN, H.; QIN, J.; WEI, P.; ZHANG, J.; LI, Q.; FU, L.; LI, S.; MA, C.; CONG, B. Effects of leukotriene B4 and prostaglandin E2 on the differentiation of murine Foxp3+ T regulatory cells and Th17 cells. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 80, n. 4, p. 195-200, 2009.

CHEN, H.; MAHASETH, M.; ZHANG, Y. Hyaluronic acid as a rescue therapy for trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis through Cox-2 and PGE2 in a Toll-like receptor 4-dependent way. **J. Zhejiang. Univ. Sci. B.**, v.12, n. 9, p. 712-719, 2011.

CHISARI, A.; SPINEDI, E.; VOIROL, M.J.; GIOVAMBATTISTA, A.; GAILLARD, R. C. A phospholipase A2-related snake venom (from *Crotalus durissus terrificus*) stimulates neuroendocrine and immune functions: determination of different sites of action. **Endocrinology**, v. 139, p. 617-625, 1998.

CHOWERS, Y.; ALLEZ, M. Efficacy of anti-TNF in Crohn's disease: how does it work? **Curr. Drug. Targets**, v.11, n. 2, p.138-142, 2010.

COHN, S. M.; SCHLOEMANN, S.; TESSNER, T.; SEIBERT, K.; STENSON, W. F. Crypt stem cell survival in the mouse intestinal epithelium is regulated by prostaglandins synthesized through cyclooxygenase-1. **J. Clin. Invest.**, v. 99, n. 6, p 1367-1379, 1997.

CONG, Y.; WEAVER, C. T.; LAZENBY, A.; ELSON, C. O. Bacterial-reactive T regulatory cells inhibit pathogenic immune responses to the enteric flora. **J. Immunol.**, v. 169, p. 6112–6119, 2002.

COSTA, L. A.; FORNARI, M. C.; BERARDI, V. E.; MILES, H. A.; DIEZ, R. A. In vivo effect of snake phospholipase A2 (crotoxin+cardiotoxin) on serum IL-1 α , TNF- α and IL-1 α level in humans. **Immunol. Lett.**, v. 75, n. 2, p. 137-141, 2001.

COSTA, E. S.; FAIAD, O. J.; LANDGRAF, R. G.; FERREIRA, A. K.; BRIGATTE, P.; CURI, R.; CURY, Y.; SAMPAIO, S. C. Involvement of formyl peptide receptors in the stimulatory effect of crotoxin on macrophages co-cultivated with tumour cells. **Toxicon**, v. 74, p.167-178, 2013.

DA SILVA, N. G.; SAMPAIO, S. C.; GONÇALVES, L. R. Inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom on chronic edema induced by injection of bacillus Calmette-Guérin into the footpad of mice. **Toxicon**, v. 63, p. 98-103, 2013.

DAVIES, M. D.; PARROTT, D. M. Preparation and purification of lymphocytes from the epithelium and lamina propria of murine small intestine. **Gut**, v. 22, n. 6, p. 481-488, 1981.

DAVIDSON, J.; KERR, A.; GUY, K.; ROTONDO, D. Prostaglandin and fatty acid modulation of *Escherichia coli* O157 phagocytosis by human monocytic cells. **Immunology**, v. 94, p. 228–234, 1998.

DAMBACHER, J.; BEIGEL, F.; ZITZMANN, K.; DE TONI, E. N.; GÖKE, B.; DIEPOLDER, H. M.; AUERNHAMMER, C. J.; BRAND, S. The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. **Gut**, v. 58, p. 1207-1217, 2009.

DANESI, F.; PHILPOTT, M.; HUEBNER, C.; BORDONI, A.; FERGUSON, L. R. Food-derived bioactives as potential regulators of the IL-12/IL-23 pathway implicated in inflammatory bowel diseases. **Mutat. Res.**, v. 7, n. 690, p. 139-144, 2010.

DIAMOND, P.; MCGINTY, A.; SUGRUE, D.; BRADY, H. R.; GODSON, C. Regulation of leukocyte trafficking by lipoxins. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 37, n. 3, p. 293-297, 1999.

DIGNASS, A. U.; BAUMGART, D. C.; STURM, A. The etiopathogenesis of inflammatory bowel disease-immunology and repair mechanisms. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 20, p. 9-17, 2004.

DOETZE, A.; SATOGUINA, J.; BURCHARD, G.; RAU, T.; LÖLIGER, C.; FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. **Int. Immunol.**, v. 12, n. 5, p. 623-630, 2000.

DOHI, T.; FUJIIHASHI, K.; RENNERT, P. D.; IWATANI, K.; KIYONO, H.; MCGHEE, J. R. Hapten-induced colitis is associated with colonic patch hypertrophy and T helper cell 2-type responses. **J. Exp. Med.**, v. 189, p. 1169-1180, 1999.

DONG, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 337-348, 2008.

ELSON, C. O.; CONG, Y.; MCCracken, V. J.; DIMMITT, R. A.; LORENZ, R.G.; WEAVER, C. T. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. **Immunol. Rev.**, v. 206, p. 260–276, 2005.

FAURE, G.; BON, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 25, n. 2, p. 229-234, 1987.

FAVORETTO, B.; RICARDI, R.; SILVA, S.; JACYSYN, J.; FERNANDES, I.; TAKEHARA, H.; FAQUIM-MAURO, E. Immunomodulatory effects of crotoxin isolated

from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice immunised with human serum albumin. **Toxicon**, v. 57, p. 600-607, 2011.

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

FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 115, p. 182–205, 1998.

FIORUCCI, S.; ANTONELLI, E.; DISTRUTTI, E.; DEL SOLDATO, P.; FLOWER, R. J.; CLARK, M. J.; MORELLI, A.; PERRETTI, M.; IGNARRO, L. J. NCX-1015, a nitric-oxide derivative of prednisolone, enhances regulatory T cells in the lamina propria and protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 15770-15775, 2002.

FORD, A. C.; SANDBORN, W. J.; KHAN, K. J.; HANAUER, S. B.; TALLEY, N. J.; MOAYYEDI, P. Efficacy of biological therapies in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. **Am. J. Gastroenterol**, v. 106, p. 644–659, 2011.

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

FREITAS, A. P. **Estudo do potencial regulador da crotoxina e suas subunidades isoladas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre atividade funcional de células dendríticas**. 2014. 139 f. Dissertação (Mestrado em Toxinologia) - Instituto Butantan, São Paulo, 2014.

FUSS, I.; BOIRIVANT, M.; LACY, B. The interrelated roles of TGF-beta and IL-10 in the regulation of experimental colitis, **The Journal of Immunology**, v. 168, p. 900-908, 2002.

GARCIA, F.; TOYAMA, M. H.; CASTRO, F. R.; PROENÇA, P. L.; MARANGONI, S.; SANTOS, L. M. Crota-potin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE2 synthesis. **Toxicon**, v. 42, n. 4, p. 433-437, 2003.

GARCIA, F. **Efeito de uma fração derivada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* na evolução clínica da encefalomielite experimental auto-imune e na ativação dos linfócitos T**. 2004. 54 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, São Paulo, 2004.

GEBOES, K. From inflammation to lesion. **Acta Gastroenterol. Belg.**, v. 57, p. 273-284, 1994.

GILROY, D. W.; COLVILLE-NASH, P. R.; MCMASTER, S.; SAWATZKY, D. A.; WILLOUGHBY, D. A.; LAWRENC, T. Inducible cyclooxygenase- derived 15-deoxy(Delta)12-14PGJ2 brings about acute inflammatory resolution in rat pleurisy by

inducing neutrophil and macrophage apoptosis. **FASEB J.**, v. 17, p. 2269-2271, 2003.

GOLDSON, C.; BRADY, H. R. Lipoxins: novel anti-inflammatory therapeutics? **Curr Opin. Investig. Drugs**, v. 1, n. 3, p. 380-385, 2000.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; HAWGOOD, B. J. Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. **Toxicon**, v. 22, n. 5, p. 791-804, 1984.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, p. 953-964, 2005.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p. 386-401, 2001.

GRINMAN, A. B. Manifestações extraintestinais das doenças inflamatórias intestinais. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 11, p. 22-26, 2012.

GRÜTZ, G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. **J. Leukoc. Biol.**, v. 77 n. 1, p. 3-15, 2005.

GUIDOLIN, F. R.; TAMBOURGI, D. V.; MARCELINO, J. R.; OKAMOTO, C. K.; MAGNOLI, F. C.; QUEIROZ, G. P.; DIAS DA SILVA, W. Characterization of anti-crotalic antibodies. **Toxicon**, v. 66, p. 7- 17, 2013.

HABR-GAMA, A.; SCHIMIDT, C. T.; MOREIRA, P. T.; CASERTA, N. M. G.; OLIVEIRA JÚNIOR, O.; ARAÚJO E. A. **Diretrizes em foco, Doença de Crohn intestinal: manejo. Sociedade Brasileira de Cólonproctologia; Colégio Brasileiro de Cirurgia Digestiva.** Sociedade Brasileira de Patologia; Colégio Brasileiro de Radiologia, 2008.

HAMEL R.; FORD-HUTCHINSON A. W. Leukotriene A4-induced bronchoconstriction in the guinea pig in vivo. **Prostaglandins**, v. 30, n. 6, p. 935-947, 1985.

HARIZI, H.; JUZAN, M.; PITARD, V.; MOREAU, J. F.; GUALDE N. Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin E(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. **J. Immunol.**, v. 168, n. 5, p. 2255-2263, 2002.

HARIZI, H.; NORBERT, G. Inhibition of IL-6, TNF-alpha, and cyclooxygenase-2 protein expression by prostaglandin E2-induced IL-10 in bone marrow-derived dendritic cells. **Cell Immunol.**, v. 229, n. 2, p. 159, 2004.

HE, Y.; LIN, L. J.; ZHENG, C. Q.; JIN, Y.; LIN, Y. Cytokine expression and the role of Th17 cells in mice colitis **Hepatogastroenterology**, v. 59, p. 1809-1813, 2012.

HOLTMANN, M. H.; GALLE, P. R.; NEURATH, M. F. Immunotherapeutic approaches to inflammatory bowel diseases. **Expert. Opin. Biol. Ther.**, v. 1, p. 455-466, 2001.

HOLTMANN, M. H.; GALLE, P. R. Current concept of pathophysiological understanding and natural course of ulcerative colitis. **Langenbecks Arch. Surg.**, v. 389, p. 341-349, 2004.

HUE, S.; AHERN, P.; BUONOCORE, S. et al. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 2473–2483, 2006.

INCE, M. N.; ELLIOTT, D. E. Immunologic and molecular mechanisms in inflammatory bowel disease. **Surg. Clin. North. Am.**, v. 87, p. 681-696, 2007.

IZCUE, A.; HUE, S.; BUONOCORE S.; ARANCIBIA-CÁRCAMO, C.; AHERN, P.; IWAKURA, Y.; MALOY, K.; POWRI, F. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. **Immunity**, v. 28, p. 559–570, 2008.

IVANOV, I. .; MCKENZIE, B. S.; ZHOU, L.; TADOKORO, C. E.; LEPELLEY, A.; LAFAILLE, J.J.; CUA, D.J.; LITTMAN, D.R. The orphan nuclear receptor rorgammat directs the differentiation program of proinflammatory il-17+ t helper cells. **Cell**, v. 126, p. 1121-1133, 2006.

JENNIFER, C.; LOUIS, N. A.; PARKOS, C. A. The role of Polymorphonuclear Leukocyte trafficking in the perpetuation of inflammation during inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 19, p. 1556-1565, 2013.

JIANG, G. L.; NIEVES, A.; IM, W. B.; OLD, D. W.; DINH, D. T.; WHEELER, L. The prevention of colitis by E Prostanoid receptor 4 agonist through enhancement of epithelium survival and regeneration. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 320, n. 1, p. 22-28, 2007.

JIN, Y.; LIN, Y.; LIN, L.; ZHENG, C. IL-17/IFN- γ interactions regulate intestinal inflammation in TNBS-induced acute colitis. **J. Interferon. Cytokine Res.**, v. 32, n.11, p. 548-556, 2012.

JURJUS, A. R.; KHOURY, N. N.; REIMUND, J.M. Animal models of inflammatory bowel disease **J. Pharmacol, Toxicol. Methods**, v. 50, p. 81-92, 2004.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N.K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; DE SILVA, H. J. The global snake burden of snakebite: A literature analysis and modeling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLOS Medicine**, v. 5, p. 1591-1604, 2008.

KOLIOS, G.; PETOUMENOS, C.; NAKOS, A. Mediator s of inflammation: production and implication in inflammatory bowel disease. **Hepatogastroenterology**, v. 45, p. 1601-1609, 1998.

KOZLOV, V.; POVESHCHENKO, A.; GROMYKHINA, N. Some mechanisms involved in the prostaglandin E2 immunosuppressive effect in (CBA x C57BL)F1 mice in vivo. **Cell. Immunol.**, v. 128, p. 242–249, 1990.

KRAUS, T. A.; MAYER, L. Oral tolerance and inflammatory bowel disease. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 21, p. 692-696, 2005.

KUHN, R.; LOHLER, J.; RENNICK, D.; RAJEWSKY, K.; MULLER, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v. 75, p. 263-274, 1993.

KULLBERG M. C. et al. IL-23 plays a key role in Helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis. **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 2485-2494, 2006.

KIMURA, A.; NAKA, T.; KISHIMOTO, T. IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing t helper cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, p. 12099-12104, 2007.

KUNISAWA, J.; KURASHIMA, Y.; KIYONO, H. Gut-associated lymphoid tissues for the development of oral vaccines. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, 523–530, 2012.

KUNA, A. T. Serological markers of inflammatory bowel disease. **Biochem. Med.**, v. 23, n. 1, p. 28-42, 2013.

KURASHIMA ,Y.; GOTO, Y.; KIYONO, H. Mucosal innate immune cells regulate both gut homeostasis and intestinal inflammation. **Eur. J. Immunol.**, v. 43, p. 3108-3115, 2013.

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.**, v. 170, n. 2, p. 757-764, 2003.

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

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Inflammasomes and their roles in health and disease. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 28, p. 137–161, 2012.

LANDUCCI, E. C.; ANTUNES, E.; DONATO, J. L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; DE NUCCI, G. Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crota-potin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, n. 3, p. 578-583, 1995.

LEE, Y. K.; TURNER, H.; MAYNARD, C. L.; OLIVER, J. R.; CHEN, D.; ELSON, C. O.; WEAVER, C. T. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. **Immunity**, v. 30, p. 92-107, 2009.

LEPPKES, M.; BECKER, C.; IVANOV, I. I.; HIRTH, S.; WIRTZ, S.; NEUFERT, C.; POULY, S.; MURPHY, A. J.; VALENZUELA, D.M.; YANCOPOULOS, G. D.; BECHER, B.; LITTMAN, D.R.; NEURATH, M. F. RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. **Gastroenterology**, v. 136, p. 257-267, 2008

LEVY, B. D.; CLISH, C. B.; SCHMIDT, B.; GRONERT, K.; SERHAN, C. N. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. **Nat. Immunol.**, n. 7, p. 612-619, 2001.

LI, M. O.; SANJABI, S.; FLAVELL, R. A. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. **Immunity**, v. 25, p. 455-471, 2006.

LIMA, J. S.; MARTELLI JÚNIOR, H.; MARTELLI, D. R.; SILVA, M. S.; CARVALHO, S. F.; CANELA, J. R.; BONAN, P. R. Profile of snakebite accidents in the north of the State of Minas Gerais, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 5, p. 561-564, 2009.

LIMA, T. S.; CATANEO, S. C.; IRITUS, A. C.; SAMPAIO, S. C.; DELLA-CASA, M. S.; CIRILLO, M. C. Crotoxin, a rattlesnake toxin, induces a long-lasting inhibitory effect on phagocytosis by neutrophils. **Exp. Biol. Med.**, v. 237, n. 10, p. 1219-1230, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGENS, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))}. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

MACHADO, F. S.; JOHNDROW, J. E.; ESPER, L.; DIAS, A.; BAFICA, A.; SERHAN, C. N.; ALIBERTI J. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. **Nat. Med.**, v. 12, n. 3, p. 330-334, 2006.

MACIA, L. et al. Microbial influences on epithelial integrity and immune function as a basis for inflammatory diseases. **Immunol. Rev.**, v. 245, p. 164–176, 2012.

MALOY, K. J.; SALAUN, L.; CAHILL, R.; DOUGAN, G.; SAUNDERS, N. J.; POWRIE, F. CD4+CD25+ TR cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. **J. Exp. Med.**, v. 197, p. 111-119, 2003.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol.**, v. 25, p. 677-686, 2004

MAYNARD, C. L.; WEAVER, C. T. Intestinal effector T cells in health and disease **Immunity**, v. 18, p. 389-400, 2009.

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**, v. 42, p. 214-219, 1998.

McDOLE, J. R.; WHEELER, L. W.; MCDONALD, K. G.; WANG, B.; KONJUFCA, V.; KNOOP, K. A.; NEWBERRY, R. D. et al., Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. **Nature**, v. 483, p. 345–349, 2012.

McGHEE, R.; MESTECKY, J.; ELSON, C. O.; KIYONO, H. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. **J. Clin. Immunol.**, v. 9, p. 175-199, 1989.

MELGAR, S.; YEUNG, M. M.; BAS, A.; FORSBERG, G.; SUHR, O.; OBERG, A.; HAMMARSTROM, S.; DANIELSSON, A.; HAMMARSTROM, M. L. Over-expression of interleukin 10 in mucosal t cells of patients with active ulcerative colitis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 134, p. 127-137, 2003

MJÖSBERG, J.; BERNINK, J.; PETERS, C.; SPITS, H. Transcriptional control of innate lymphoid cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 42, p. 1916–1923, 2012.

MILLER, A.; LIDER, O.; ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B.; WEINER, H. L. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 421–425, 1992.

MOLODECKY, N. A. et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**, v.142, p.46–54, 2012.

MONTELEONE, G.; TRAPASSO, F.; PARRELLO, T.; BIANCONE, L.; STELLA, A.; IULIANO, R.; LUZZA, F.; FUSCO, A.; PALLONE F. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. **J. Immunol.**, v. 163, p. 143-147, 1999.

MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 683–765, 2001.

MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; SOARES, A. M., ZAMUNÉR, S. R.; PURGATTO, E.; TEIXEIRA, C. Secretory phospholipases A(2) isolated from Bothrops asper and from Crotalus durissus terrificus snake venoms induce distinct mechanisms for biosynthesis of prostaglandins E2 and D2 and expression of cyclooxygenases. **Toxicon.**, v. 52, n. 3, p. 428-439, 2008.

MORRIS, D. D.; MESSICK, J.; WHITLOCK, R. H.; PALMER, J.; WARD, M. V.; FELDMAN, B. F. Effect of equine ehrlichial colitis on the hemostatic system in ponies. **Am. J. Vet. Res.**, v. 49, p. 1030-1036, 1988.

MOWAT, A. M.; BAIN, C. C. Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. **J. Innate Immun.**, v. 3, n. 6, p. 550-564, 2011.

MUDTER, J.; NEURATH, M. F. Apoptosis of T cells and the control of inflammatory bowel disease: therapeutic implications. **Gut**, 2007, v.56, p. 293-303.

NADUR-ANDRADE; BARBOSA, A. M.; CARLOS, F. P.; LIMA, C. J.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by Bothrops moojeni venom. **Lasers Med. Sci.**, v. 27, p. 65–70, 2012.

NEURATH, M.; FUSS, I.; KELSALL, B.; STUBER, E.; STROBER, W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, p. 1281–1290, 1995.

NEURATH, M. F.; PETTERSSON, S.; MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H.; STROBER, W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. **Nat. Med.**, v. 2, p. 998–1004, 1996.

NEURATH, M. F.; FINOTTO, S.; GLIMCHER, L. H. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. **Nat. Med.**, v. 8, p. 567-573, 2002.

NIESS, J. H.; BRAND, S.; GU, X.; LANDSMAN, L.; JUNG, S.; McCORMICK, B. A.; VYAS, J. M.; BOES, M.; PLOEGH, H. L.; FOX, J.G.; LITTMAN, D. R.; REINECKER, H.C. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. **Science**, v. 307, p. 254-258, 2005.

NOGUEIRA, R. M. B.; SAKATE, M. Acidentes crotálicos em animais domésticos. **Rev. Cons. Fed. Méd. Vet.**, v. 31, p. 47-56, 2004.

NUNES, F. P.; SAMPAIO, S. C.; SANTORO, M. L.; SOUSA-E-SILVA, M. C. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. **Toxicon**, v. 49, n. 8, p. 1090-1098, 2007.

NUNES, F. P.; ZYCHAR, B. C.; DELLA-CASA, M. S.; SAMPAIO, S. C.; GONÇALVES, L. R.; CIRILLO, M. C. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1100-1106, 2010.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. **Nat. Med.**, v. 10, p. 801–805, 2004.

OGINO, H.; NAKAMURA, K.; IHARA, E.; AKIHO, H.; TAKAYANAGI, R. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress Th17-responses in an experimental colitis model. **Dig. Dis. Sci.**, v. 56, n. 2, p. 376-386, 2011.

OIDA, T.; ZHANG, X.; GOTO, M.; HACHIMURA, S.; TOTSUKA, M.; KAMINOGAWA, S.; WEINER, H. L. CD4+CD25- T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+CD45RB^{high}-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism. **J. Immunol.**, v. 170, n. 5, p. 2516-2522, 2003.

OKAMOTO, M.; VISKATIS, L. J.; DE LA ROZA, G.; VIDAL, J. C. Induction of Tolerance to Crotoxin in Mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 265, p. 41-46, 1992.

OROPEZA-RENDON, R. L.; BAUER, H. C.; FISCHER, H. 1980. Effect of prostaglandin E1 on the level of cAMP in bone marrow macrophages. Inhibition of phagocytosis and cell shape changes. **J. Immunopharmacol.**, v. 2, p. 133–147, 1980.

OSTANIN, D. V.; BAO, J.; KOBOZIEV, I.; GRAY, L.; ROBINSON-JACKSON, S. A.; KOSLOSKI-DAVIDSON, M.; PRICE, V. H.; GRISHAM, M. B. T cell transfer model of

chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 296, p. 135-146, 2008.

PARK, H. B.; PAIK, D. J.; JANG, E.; HONG, S.; YOUN, J. Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-beta-costimulated CD4+CD25- T cells. **Int. Immunol.**, v. 16, p. 1203–1213, 2004.

PARRONCHI, P. et. al. Type 1 t-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. **Am. J. Pathol.**, v. 150, p. 823-832, 1997.

PETERS, A.; LEE, Y.; KUCHROO, V. K. The many faces of Th17 cells. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 23, n. 6, p. 702-706, 2011.

PINHO, F. M. O.; VIDAL, E. C.; BURDMANN, E. A. Atualização em insuficiência renal aguda: insuficiência renal aguda após acidente crotálico. **J. Bras. Nefrol.**, v. 22, n. 3, p. 162- 168, 2000.

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

PIZARRO, T. T.; MICHIE, M. H.; BENTZ, M.; WORARATANADHARM, J.; SMITH, M. F. JR.; FOLEY, E.; MOSKALUK, C. A.; BICKSTON, S. J.; COMINELLI, F. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. **J. Immunol.**, v. 162, p. 6829-6835, 1999.

PODOLSKY, D. K. Inflammatory bowel disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, p. 417-429, 2002.

PODOLSKY, D. K.; GERKEN, G.; EYKING, A.; CARIO, E. Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair because of TFF3 deficiency. **Gastroenterology**, v. 137, p. 209–220, 2009.

POWRIE, F.; LEACH, M. W.; MAUZE, S.; MENON, S.; CADDLE, L. B.; COFFMAN, R. L. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. **Immunity**, v. 1, p. 553–562, 1994.

POWRIE, F.; CARLINO, J.; LEACH, M. W.; MAUZE, S.; COFFMAN, R. L. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RBlow CD4+ T cells. **J. Exp. Med.**, v. 183, p. 2669–2674, 1996.

QIU, F. H.; DEVCHAND, P. R.; WADA, K.; SERHAN, C. N. Aspirin-triggered lipoxin A4 and lipoxin A4 up-regulate transcriptional corepressor NAB1 in human neutrophils. **FASEB. J.**, v. 15, n. 14, p. 2736-2738, 2001.

RANGEL-SANTOS, A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; CARDOSO D. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 44, n. 6, p. 609-616, 2004.

RESCIGNO, M.; URBANO, B.; VALZASINA, M.; FRANCOLINI, G.; ROTTA, R.; BONASIO, F.; GRANUCCI, J. P.; KRAEHENBUHL, P. RICCIARDI-CASTAGNOLI. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelialmonolayers to sample bacteria. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 361-367, 2001.

RIETDIJK, S. T.; D'HAENS, G. R. Recent developments in the treatment of inflammatory bowel disease. **J. Dig. Dis.**, v. 14, p. 282-287, 2013.

RICARDI, R. **Estudo dos mecanismos de supressão da resposta imune induzida pela crotoxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus***. 2010. 114 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2010.

ROSSI, A. G.; MCCUTCHEON, J. C.; ROY, N.; CHILVERS, E. R.; HASLETT, C.; DRANSFIELD, I. Regulation of macrophage phagocytosis of apoptotic cells by cAMP. **J. Immunol.**, v. 160, p. 3562–3568, 1998.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, n. 27, p. 12204-12209, 2010.

RUBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of yhe crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of yhe crotoxin complex. **Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 270, p. 274–288, 1971.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 531-562, 2004.

SAMBROOK, J.; GETHING, M. J. Protein structure. Chaperones, paperones. **Nature**, v. 342, p. 224-225, 1989.

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

SAMPAIO, S. C.; RANGEL-SANTOS, A.C.; PERES, C.M.; CURI R.; CURY, Y. Inhibitory effect of phospholipase A(2) isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. **Toxicon**, v. 45, p. 671-676, 2005.

SAMPAIO, S. C.; SANTOS, M. F.; COSTA, E. P.; RANGEL-SANTOS, A. C.; CARNEIRO, S. M.; CURI, R.; CURY, Y. Crotoxin induces actin reorganization and inhibits tyrosine phosphorylation and activity of small GTPases in rat macrophages **Toxicon**, v. 47, p. 909-919, 2006a.

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

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

SAMPAIO, S. C.; HYSLOP, S.; FONTES, M. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; ZAMBELLI, V. O.; MAGRO, A. J.; BRIGATTE, P.; GUTIERREZ, V.P.; CURY, Y. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1045-1060, 2010.

SANCHEZ-MUNOZ, F.; DOMINGUEZ-LOPEZ, A.; YAMAMOTO-FURUSHO, J. K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, n. 27, p. 4280-4288, 2008.

SANTOS, R. M. M.; OLIVEIRA, L. C.; ESTEVÃO-COSTA, M. I.; LIMA, M. E.; SANTORO, M. M. FORTES-DIAS, C. L. Inhibition of crotoxin binding to synaptosomes by a receptor-like protein from *crotalus durissus terrificus* (the south american rattlesnake). **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1717, p. 27-33, 2005.

SATOH-TAKAYAMA, N.; VOSSHENRICH, C. A.; LESJEAN-POTTIER, S.; SAWA, S.; LOCHNER, M.; RATTIS, F.; MENTION, J. J. et al. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosalimmunedefense. **Immunity**, v. 29, p. 958–970, 2008.

SARTOR, R. B. Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. **Gastroenterol. Clin. North. Am.**, v. 24, p. 475-507, 1995.

SARTOR, R. B. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 92, p. 5S-11S, 1997.

SARTOR, R. B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 3, p. 390–407, 2006.

SERHAN, C. N.; FIORE, S.; LEVY, B. D. Cell-cell interactions in lipoxin generation and characterization of lipoxin A4 receptors. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, n. 744, p. 166-180, 1994.

SETOGUCHI, R.; HORI, S.; TAKAHASHI, T.; SAKAGUCHI, S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3 (+) CD25 (+) CD4 (+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. **J. Exp. Med.**, v. 201, p. 723-735, 2005.

SHANAHAN F. Crohn's disease. **Lancet.**, v. 359, p. 62-69, 2002.

SHEIBANIE, A. F.; YEN, J. H.; KHAYRULLINA, T.; EMIG, F.; ZHANG, M.; TUMA, R.; GANEA, D. The proinflammatory effect of prostaglandin E2 in experimental inflammatory bowel disease is mediated through the IL-23-->IL-17 axis. **J. Immunol.**, v. 178, n. 12, p. 8138-8147, 2007.

SHEIFFELE, F.; FUSS, I. Animal models for autoimmune and inflammatory disease – Induction of TNBS colitis mice. **Current Protocols en Immunology**, 15.19.1-15.19.14, 2001. Suppl. 49.

SHULL, M. M.; ORMSBY, I.; KIER, A. B.; PAWLOWSKI, S.; DIEBOLD, R. J.; YIN, M.; ALLEN, R.; SIDMAN, C.; PROETZEL, G.; CALVIN, D.; ANNUNZIATA, N.; DOETSCHMAN, T. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. **Nature**, v. 359, p. 693–699, 1992.

SLOTTA, K.; FRANENKEL-CONRAT, H. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. **Mem. Inst. But.**, v. 12, p. 505-510, 1938.

SOLCA, E. A.; LUIZ-FERREIRA, A.; DE FARIA, F. M.; DE ALMEIDA, A. C.; DUNDER, R. J.; MANZO, L. P.; BRITO, A. R. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha and cyclooxygenase-2 by Isatin: a molecular mechanism of protection against TNBS-induced colitis in rats. **Chem. Biol. Interact.**, v. 209, p. 48-55, 2013.

SODHI, C. P.; NEAL, M. D.; SIGGERS, R.; SHO, S.; MA, C., BRANCA, M. F.; PRINDLE, T. et al. Intestinal epithelial Toll-like receptor 4 regulates goblet cell development and is required for necrotizing enterocolitis in mice. **Gastroenterology**, v.143, p 708–718, 2012.

SOUZA, D.G.; FAGUNDES, C.T.; AMARAL, F.A.; CISALPINO, D.; SOUSA, L.P.; VIEIRA, A.T.; PINHO, V.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q.; FIERRO, I.M.; TEIXEIRA, M.M. The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice. **J. Immunol.**, v. 179, n. 12, p. 8533-8543, 2007.

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

SOYOMBO, O.; SPUR, B. W.; LEE, T. H. 1994. Effects of lipoxin A4 on chemotaxis and degranulation of human eosinophils stimulated by platelet activating factor and N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine. **Allergy**, v. 49, n. 3, p. 230–234, 1994

SPITS, H.; ARTIS, D.; COLONNA, M.; DIEFENBACH, A.; DI SANTO, J. P.; EBERL, G.; KOYASU, S.; et al. Innate lymphoid cells: a proposal for uniform nomenclature. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 13, p. 145–149, 2013.

STEIDLER, L.; HANS, W.; SCHOTTE, L.; NEIRYNCK, S.; OBERMEIER, F.; FALK, W.; FIERS, W.; REMAUT, E. Treatment of murine colitis by Lactococcus lactis secreting interleukin-10. **Science**, v. 289, p. 1352–1355, 2000.

STROBER, W.; FUSS, I.; MANNON, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 514–521, 2007.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases a(2) and their receptors and binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 148, p. 59-70, 2010

VAN DER SLUIS, M.; DE KONING, B. A.; DE BRUIJN, A.C.; VELCICH, A.; MEIJERINK, J. P.; VAN GOUDOEVER, J. B.; BULLER, H. A. et al., Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. **Gastroenterology**, v. 131, p. 117–129, 2006.

VELDE, A. A.; VERSTEGE, M.I.; HOMMES, D. W. Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. **Inflamm. Bowel. Dis.**, v. 12, p. 995-999, 2006.

VIEIRA, P. L.; CHRISTENSEN, J. R.; MINAEE, S.; O'NEILL, E. J.; BARRAT, F. J.; BOONSTRA, A.; BARTHLOTT, T.; STOCKINGER, B.; WRAITH, D. C.; O'GARRA, A. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. **J. Immunol.**, v. 172, p. 5986–5993, 2004.

TALLEY, N. J.; ABREU, M. T.; ACHKAR, J. P. et al; American College of Gastroenterology IBD Task Force. An evidence-based systematic review on medical therapies for inflammatory bowel disease. **Am. J. Gastroenterol.**, v.106, p. S2–25, quiz S26, 2011. Suppl. 1.

TESSNER, T. G.; COHN, S. M.; SCHLOEMANN, S.; STENSON, W. F. Prostaglandins prevent decreased epithelial cell proliferation associated with dextran sodium sulfate injury in mice. **Gastroenterology**, n. 4, p. 874-882, 1998.

TIERNEY, J. B.; KHARKRANG, M.; LA FLAMME, A. C. Type II-activated macrophages suppress the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 87, n. 3, p. 235-240, 2009.

THUKRAL, C.; CHEIFETZ, A.; PEPPERCORN, M.A. Anti-tumour necrosis factor therapy for ulcerative colitis: evidence to date. **Drugs**, v. 66, p. 2059-2065, 2006.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 133-146, 2003.

WIRTZ, S.; NEUFERT, C.; WEIGMANN, B.; NEURATH, M.F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nat. Protoc.**, v. 2, p. 541-546, 2007.

WU, S. H.; LIAO, P. Y.; DONG, L.; CHEN, Z. Q. Signal pathway involved in inhibition by lipoxin A(4) of production of interleukins induced in endothelial cells by lipopolysaccharide. **Inflamm Res.**, v. 57, n. 9, p. 430-437, 2008.

YANG, X.; MENG, S.; JIANG, H.; CHEN, T.; WU, W. Exosomes derived from interleukin-10-treated dendritic cells can inhibit trinitrobenzene sulfonic acid-induced rat colitis. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 45, p. 1168-1177, 2010.

YAMAMOTO, M.; YOSHIZAKI, K.; KISHIMOTO, T.; ITO, H. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. **J. Immunol.**, v. 164, p. 4878-4882, 2000.

WAGNER, N.; LÖHLER, J.; TEDDER, T. F.; RAJEWSKY, K.; MÜLLER, W.; STEEBER, D. A. L-selectin and $\beta 7$ integrin synergistically mediate lymphocyte migration to mesenteric lymph nodes. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 3832–3839, 1998.

WARRELL, D. A. Snake bite. **Lancet**, v. 375, p. 77-88. 2010

WEIGMANN B, NEURATH, M. F. T-bet as a possible therapeutic target in autoimmune disease. **Expert Opin. Ther. Targets**, n. 6, p. 619-622, 2002.

WEIGMANN, B.; TUBBE, I.; SEIDEL, D.; NICOLAEV, A.; BECKER, C.; NEURATH, M.F. Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. **Nat. Protoc.**, v. 2, n. 10, p. 2307-2311, 2007.

WEINER, H. L. et al. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 12, p. 809-837, 1994.

WIRTZ, S.; BILLMEIER, U.; MCHEDLIDZE, T.; BLUMBERG, R. S.; NEURATH, M. F. Interleukin-35 mediates mucosal immune responses that protect against T-cell-dependent colitis. **Gastroenterology**, v. 141, n. 5, p. 1875-1886, 2011.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 2nd ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1984. 130 p.

ZHANG, Z.; ZHENG, M.; BINDAS, J.; SCHWARZENBERGER, P.; KOLLS, J. K. Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. **Inflamm. Bowel. Dis.**, v. 12, p. 382-388, 2006.