

## AValiação dos Índices Hematológicos Após a Administração de Diferentes Doses de Crotalina em Ratos Wistar

Gabriel Tavares dos Santos<sup>1\*</sup>, Julia Costa Baroni<sup>1</sup>, Alexandre Yoshida Belo<sup>2</sup>, Estêvão Rocha da Silva<sup>2</sup>, Daniela Gomes da Silva<sup>3</sup> e Annelise Carla Camplesi<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Discentes no Curso de Medicina Veterinária – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV – Jaboticabal/SP – Brasil – \*Contato: gabriel.tavares@unesp.br

<sup>2</sup>Discentes do Colégio Técnico Agrícola José Bonifácio – Jaboticabal/SP – Brasil

<sup>3</sup>Docente do Curso de Veterinária – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV – Jaboticabal/SP – Brasil

### INTRODUÇÃO

As propriedades terapêuticas de toxinas e venenos são estudadas devido à sua seletividade, especificidade e potência, além de seu efeito em doses baixas e ausência de indução de dependência<sup>1</sup>. No Brasil, o gênero *Crotalus* spp., conhecido como cascavel, é o mais comum da família Crotalinae, encontrada em toda a América do Sul<sup>2</sup>. O veneno da *Crotalus durissus* contém quatro toxinas principais, sendo a crototoxina a mais predominante<sup>3</sup>.

Além das toxinas conhecidas, um peptídeo com propriedades analgésicas foi identificado nesse veneno em 2008, denominado crotalina. A crotalina consiste em um peptídeo de 14 aminoácidos, com uma ponte dissulfídica e um resíduo de ácido piroglutâmico<sup>4</sup>. Demonstrou-se que a crotalina, tanto em sua forma natural quanto sintética, exerce uma prolongada ação antinociceptiva em modelos de dor aguda e crônica, quando administrada por via intraperitoneal, intraplantar, intravenosa ou oral; seus efeitos foram observados por até três dias em modelos de dor crônica e até cinco dias em modelos de dor aguda<sup>1,4,5</sup>. Estudos adicionais indicam que a crotalina atua na via das MAPKs, especialmente em ERK1/2 e JNK, modulando a atividade dos receptores opioides  $\mu$  e  $\kappa$ <sup>6</sup>. Além disso, a crotalina influencia o comportamento funcional de macrófagos residentes ou estimulados com LPS, inibindo a produção de NO<sub>2</sub>, fagocitose, liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e secreção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos, sugerindo um potencial efeito anti-inflamatório<sup>7</sup>.

Assim, a crotalina surge como um promissor analgésico em pacientes com dor crônica e neuropática, quando o manejo farmacológico representa um desafio clínico devido às contraindicações, efeitos colaterais significativos e potencial para induzir dependência psíquica associados aos fármacos atualmente disponíveis<sup>8</sup>.

Portanto, o presente estudo visa avaliar a segurança clínica da crotalina, utilizando doses terapêuticas eficazes e concentrações seriadas crescentes.

### METODOLOGIA

O presente estudo foi desenvolvido respeitando os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e com aprovação prévia (nº 3803/23) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/Unesp).

#### Animais

Ratos Wistar machos ( $n_{total} = 24$ , idade aproximada de 8 semanas, peso 200-250g) oriundos do Biotério de Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus de Botucatu, foram mantidos no Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV sob temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C), ciclo claro/escuro de 12 horas (6h30 – 18h30) e acesso livre à água filtrada e alimento. Os experimentos começaram após duas semanas de aclimação dos animais ao novo ambiente. Os ratos foram alocados aleatoriamente em grupo controle (GC,  $n = 8$ ), crotalina 25 $\mu$ g/Kg (G25,  $n = 8$ ) e crotalina 50 $\mu$ g/Kg (G50,  $n = 8$ ).

#### Preparação do peptídeo

Parte do peptídeo liofilizado foi cedido gentilmente pelo Laboratório de Dor e Sinalização do Instituto Butantan (São Paulo/SP). Crotalina (Proteimax Biotecnologia Ltda.) foi inicialmente dissolvida em água destilada em uma solução de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l e posteriormente diluída em uma solução mãe de 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l e armazenada a -20°C. Adiante, no momento do uso, foi diluída em solução salina.

#### Administração e coleta de amostras biológicas

Nos dias 0, 3 e 6 foi feita a administração de solução salina estéril 0,9%, 25 $\mu$ g/Kg e 50 $\mu$ g/Kg de crotalina aos grupos GC, G25, G50,

respectivamente. Todos os animais receberam volume total de 500 $\mu$ l pela via oral, por meio de gavagem.

Para coleta das amostras biológicas, no nono dia metade dos animais de cada grupo foram submetidos à coleta intracardíaca terminal sob anestesia geral inalatória em câmara de gás com isofluorano e o restante dos animais passaram pelo mesmo procedimento no décimo quarto dia. Não foi instituído analgesia terminal, pois no momento anterior à coleta os ratos tiveram o plano anestésico aprofundado, até a constatação da perda dos estímulos nociceptivos, confirmada por meio do pinçamento falangeano.

De cada amostra de sangue, colhida com anticoagulante EDTA, foram determinadas as contagens de hemácias, leucócitos, plaquetas, teor de hemoglobina, hematócrito e índices hematimétricos (volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média), em equipamento automático. A contagem diferencial de leucócitos e a avaliação morfológica celular dos esfregaços sanguíneos, corados com tinta de Rosenfeld, foram realizadas manualmente em microscópio de luz.

Os grupos foram submetidos a avaliações laboratoriais para examinar os constituintes hematológicos e suas possíveis alterações associadas à crotalina.

#### Análise de dados

As variáveis quantitativas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey para comparação entre pares de médias, ao nível de 5% de significância, após a verificação da homogeneidade das amostras.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

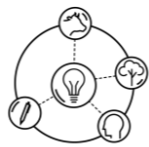
Diante da necessidade de desenvolver tratamentos mais eficazes para o controle da dor, os pesquisadores dedicam-se à investigação de novas moléculas com potencial analgésico, destacando-se a crotalina como uma candidata promissora para futuros protocolos analgésicos. Até o momento, não foram observados efeitos adversos associados ao seu uso; no entanto, são necessários estudos adicionais para avaliar sua segurança clínica. Neste estudo, foi investigado as possíveis alterações hematológicas após a administração de crotalina, apresentando e discutindo os aspectos relacionados à sua segurança.

Para os valores hematológicos da série vermelha e plaquetas (Tabela 1) houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a variável de WBC no grupo G50 entre os momentos de avaliação D9 e D14. Para a variável de HCHC houve diferença no GC entre os momentos D9 e D14, no G25 entre os momentos D9 e D14 e no G50 houve diferença entre os momentos D9 e D14.

De forma geral, os parâmetros hematológicos apresentaram alterações discretas, em comparação à estudos que utilizaram o veneno crotálico para testes de toxicidade, o qual foi observado queda significativa nos valores de hemácias, hemoglobina e no volume globular, alterações que comumente estão relacionadas com a atividade hemolítica do veneno crotálico<sup>9</sup>.

Para os valores do leucograma (Tabela 2) houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a variável leucócitos totais no G50 entre os momentos D9 e D14, para a variável linfócitos no G50 entre os momentos D9 e D14 e para a variável monócitos no G25 entre os momentos D9 e D14. O mecanismo de ação da crotalina ainda não é totalmente elucidado, mas sabe-se que esta é capaz de ativar os receptores canabinóides CB2 e estimular a secreção de IL-1 $\beta$  regular a secreção de IL-6<sup>1,5</sup>. Foi possível observar queda nos valores totais de leucócitos, assim como na contagem diferencial de linfócitos e monócitos no grupo que recebeu a dose mais alta, porém essa queda foi transitória, retornando à normalidade na última análise.

# XIII Colóquio Técnico Científico de Saúde Única, Ciências Agrárias e Meio Ambiente



**Tabela 1.** Média  $\pm$  desvio padrão dos valores hematológicos da série vermelha e plaquetas em ratos Wistar do grupo controle (GC), grupo 25 $\mu$ g/kg (G25) e grupo 50 $\mu$ g/kg (G50).

Variáveis/Grupos	Momento de avaliação	
	D9	D14
<b>RBC (x10<sup>6</sup>/<math>\mu</math>L)</b>		
GC	8,0 $\pm$ 0,6 <sup>Aa</sup>	8,0 $\pm$ 0,3 <sup>Aa</sup>
G25	7,9 $\pm$ 0,3 <sup>Aa</sup>	7,9 $\pm$ 0,5 <sup>Aa</sup>
G50	8,2 $\pm$ 0,2 <sup>Aa</sup>	7,8 $\pm$ 0,4 <sup>Aa</sup>
<b>HGB (g/dL)</b>		
GC	15,5 $\pm$ 0,7 <sup>Aa</sup>	15,2 $\pm$ 0,4 <sup>Aa</sup>
G25	15,5 $\pm$ 0,5 <sup>Aa</sup>	15,2 $\pm$ 0,8 <sup>Aa</sup>
G50	15,8 $\pm$ 0,1 <sup>Aa</sup>	15,3 $\pm$ 0,6 <sup>Aa</sup>
<b>HCT (%)</b>		
GC	46,0 $\pm$ 2,8 <sup>Aa</sup>	46,6 $\pm$ 1,2 <sup>Aa</sup>
G25	45,3 $\pm$ 1,8 <sup>Aa</sup>	46,2 $\pm$ 2,5 <sup>Aa</sup>
G50	46,8 $\pm$ 0,4 <sup>Aa</sup>	45,4 $\pm$ 2,1 <sup>Aa</sup>
<b>MCV (fL)</b>		
GC	57,4 $\pm$ 1,2 <sup>Aa</sup>	58,5 $\pm$ 1,4 <sup>Aa</sup>
G25	57,4 $\pm$ 0,9 <sup>Aa</sup>	58,4 $\pm$ 1,3 <sup>Aa</sup>
G50	57,0 $\pm$ 1,3 <sup>Aa</sup>	58,1 $\pm$ 2,1 <sup>Aa</sup>
<b>MCH (pg)</b>		
GC	19,4 $\pm$ 0,6 <sup>Aa</sup>	19,1 $\pm$ 0,5 <sup>Aa</sup>
G25	19,6 $\pm$ 0,3 <sup>Aa</sup>	19,3 $\pm$ 0,5 <sup>Aa</sup>
G50	19,3 $\pm$ 0,6 <sup>Aa</sup>	19,6 $\pm$ 0,9 <sup>Aa</sup>
<b>MCHC (g/dL)</b>		
GC	33,8 $\pm$ 0,6 <sup>Ab</sup>	32,7 $\pm$ 0,5 <sup>Aa</sup>
G25	34,1 $\pm$ 0,2 <sup>Ab</sup>	33,0 $\pm$ 0,5 <sup>ABa</sup>
G50	33,8 $\pm$ 0,4 <sup>Aa</sup>	33,7 $\pm$ 0,5 <sup>Ba</sup>
<b>PLT (x10<sup>3</sup>/<math>\mu</math>L)</b>		
GC	713,5 $\pm$ 57,9 <sup>Aa</sup>	703,5 $\pm$ 107,2 <sup>Aa</sup>
G25	690,5 $\pm$ 180,3 <sup>Aa</sup>	635,0 $\pm$ 98,8 <sup>Aa</sup>
G50	726,0 $\pm$ 97,8 <sup>Aa</sup>	791,8 $\pm$ 61,2 <sup>Aa</sup>

WBC: número de células brancas, RBC: número de células vermelhas, HGB: hemoglobina, HCT: hematócrito, MCV: volume corpuscular médio, MCH: hemoglobina corpuscular média e MCHC: concentração de hemoglobina corpuscular média. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os efeitos da crotalina sobre os valores hematológicos são discretos em comparação com os outros componentes do veneno crotálico, corroborando com as evidências anteriores da ausência de efeitos adversos relacionados ao seu uso. No entanto, são necessários mais estudos para correlacionar os resultados laboratoriais aqui obtidos com testes comportamentais e a relação da crotalina como moduladora do sistema imune.

**Tabela 2.** Média  $\pm$  desvio padrão do leucograma e sua contagem diferencial em microscopia óptica em ratos Wistar do grupo controle (GC), grupo 25 $\mu$ g/kg (G25) e grupo 50 $\mu$ g/kg (G50).

Variáveis/Grupos	Momento de avaliação	
	D9	D14
<b>LEU (x10<sup>6</sup>/<math>\mu</math>L)</b>		
GC	5.425,0 $\pm$ 1.757,6 <sup>Aa</sup>	7.325,0 $\pm$ 2.223,2 <sup>Aa</sup>
G25	5.200,0 $\pm$ 909,2 <sup>Aa</sup>	4.850,0 $\pm$ 1.360,1 <sup>Aa</sup>
G50	3.500,0 $\pm$ 1.587,5 <sup>Ab</sup>	6.400,0 $\pm$ 1.505,5 <sup>Aa</sup>
<b>BAS (cel./<math>\mu</math>L)</b>		
GC	19,0 $\pm$ 38,0 <sup>Aa</sup>	18,0 $\pm$ 36,0 <sup>Aa</sup>
G25	0 $\pm$ 0 <sup>Aa</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>Aa</sup>
G50	0 $\pm$ 0 <sup>Aa</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>Aa</sup>

<b>EOS (cel./<math>\mu</math>L)</b>		
GC	156,3 $\pm$ 175,9 <sup>Aa</sup>	159,3 $\pm$ 135,8 <sup>Aa</sup>
G25	48,5 $\pm$ 34,3 <sup>Aa</sup>	115,5 $\pm$ 69,8 <sup>Aa</sup>
G50	70,5 $\pm$ 31,8 <sup>Aa</sup>	133,0 $\pm$ 95,1 <sup>Aa</sup>
<b>NB (cel./<math>\mu</math>L)</b>		
GC	13,3 $\pm$ 26,5 <sup>Aa</sup>	18,0 $\pm$ 36,0 <sup>Aa</sup>
G25	0 $\pm$ 0 <sup>Aa</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>Aa</sup>
G50	0 $\pm$ 0 <sup>Aa</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>Aa</sup>
<b>NS (cel./<math>\mu</math>L)</b>		
GC	1.321,3 $\pm$ 535,1 <sup>Aa</sup>	2.196,0 $\pm$ 783,5 <sup>Aa</sup>
G25	1.422,0 $\pm$ 290,5 <sup>Aa</sup>	1.667,0 $\pm$ 312,9 <sup>Aa</sup>
G50	1.138,0 $\pm$ 546,5 <sup>Aa</sup>	1.878,0 $\pm$ 276,9 <sup>Aa</sup>
<b>LINF (cel./<math>\mu</math>L)</b>		
GC	3.814,5 $\pm$ 1.037,3 <sup>Aa</sup>	4.808,0 $\pm$ 1.331,3 <sup>Aa</sup>
G25	3.677,5 $\pm$ 824,8 <sup>Aa</sup>	2.970,3 $\pm$ 1.108,3 <sup>Aa</sup>
G50	2.247,5 $\pm$ 1.138,5 <sup>Ab</sup>	4.303,0 $\pm$ 1.112,1 <sup>Aa</sup>
<b>MON (cel./<math>\mu</math>L)</b>		
GC	100,8 $\pm$ 67,4 <sup>Aa</sup>	125,8 $\pm$ 126,3 <sup>Aa</sup>
G25	52,0 $\pm$ 9,1 <sup>Ab</sup>	101,3 $\pm$ 34,2 <sup>Aa</sup>
G50	44,0 $\pm$ 41,7 <sup>Aa</sup>	86,0 $\pm$ 75,5 <sup>Aa</sup>

LEU: leucócitos totais, BAS: basófilos, EOS: eosinófilos, NB: neutrófilos bastonetes, NS: neutrófilos segmentados, LINF: linfócitos, MON: monócitos. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GUTIERREZ, V. P. et al. **Crotalphine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors.** European Journal of Pharmacology, v. 594, n. 1–3, p. 84–92, 2008.
- FLORES-VILLELA, O.; CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **Venomous reptiles of Latin America.** Copeia, v. 1990, n. 3, p. 900, 1990.
- SANTORO, M. L. et al. **Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*).** Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology, v. 122, n. 1, p. 61–73, 1999.
- KONNO, K. et al. **Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*.** Peptides, v. 29, n. 8, p. 1293–1304, 2008.
- BRIGATTE, P. et al. **Peripheral kappa and delta opioid receptors are involved in the antinociceptive effect of crotalphine in a rat model of cancer pain.** Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 109, p. 1–7, 2013.
- ZAMBELLI, V. O. et al. **Peripheral sensitization increases opioid receptor expression and activation by crotalphine in rats.** PLOS ONE, v. 9, n. 3, p. e90576, 2014.
- VELHOTE, F. **Caracterização da ação da Crotalina sobre a função de macrófagos peritoneais de ratos.** 119 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- COLES, S.; DABBS, W.; WILD, S. **Pharmacologic management of chronic pain.** Primary Care: Clinics in Office Practice, v. 49, n. 3, p. 387–401, 2022.
- NOGUEIRA, R. M. B.; SAKATE, M. **Clinical and hematological alterations in dogs during experimental envenomation with *Crotalus durissus terrificus* venom and treated with antiophidic serum.** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, v. 12, n. 2, p. 285–296, abr. 2006.

APOIO:



Projeto financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2023/04079-2.

