



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

LORENA DUARTE DA SILVA

**PAPEL DA VIA HEME OXIGENASE I/MONÓXIDO DE CARBONO NA DIARREIA
PROVOCADA POR TOXINA DE *Vibrio cholerae* EM CAMUNDONGOS**

RECIFE

2022

LORENA DUARTE DA SILVA

**PAPEL DA VIA HEME OXIGENASE I/MONÓXIDO DE CARBONO NA DIARREIA
PROVOCADA POR TOXINA DE *Vibrio cholerae* EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Renan Oliveira
Silva Damasceno

RECIFE

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Silva, Lorena Duarte da.

Papel da via heme oxigenase I/monóxido de carbono na diarreia provocada por toxina de *Vibrio cholerae* em camundongos. / Lorena Duarte da Silva. – 2022.

95 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Renan Oliveira Silva Damasceno.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2022.

Inclui referências.

1. Monóxido de carbono. 2. Toxina da cólera. 3. Diarreia. I. Damasceno, Renan Oliveira Silva. (Orient.). II. Título.

LORENA DUARTE DA SILVA

**PAPEL DA VIA HEME OXIGENASE I/MONÓXIDO DE CARBONO NA DIARREIA
PROVOCADA POR TOXINA DE *Vibrio cholerae* EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Renan Oliveira Silva Damasceno (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos (Membro Externo)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Jand-Venes Rolim Medeiros (Membro Externo)
Universidade Federal do Delta do Parnaíba - UFDPAr

Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira (Membro Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Data: 01/09/2022

Ao meu avô que encontra-se presente em outro plano e
a minha querida mãe por serem abrigo, amor e tudo que
tenho!

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo quero agradecer a Deus e os espíritos de luz por me manterem de pé durante esse período e principalmente por não me deixarem esquecer em nenhum momento de onde eu vim e que devo sempre cultivar em meu coração a humildade, perseverança e a alegria de viver para realizar todos os meus sonhos.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Renan Oliveira Silva Damasceno** pela paciência ao longo desse tempo, ensinamentos, e principalmente pelo incentivo dado até hoje. É uma grande satisfação ser sua aluna.

A professora **Dayane** e ao professor **Eduardo** pela confiança de cederem seus laboratórios para que eu pudesse realizar meus experimentos quando iniciei o mestrado.

Aos técnicos de laboratório, **Flávia, Junior** (NEMPI - Morfologia/UFC), pela ajuda no preparo, confecção das lâminas histológicas e imuno-histoquímica.

A minha amiga, **Samara** por me incentivar, por não me deixar desistir e me ajudar a acreditar que meu sonho seria possível e que no momento certo ele se tornaria realidade.

A minha amiga, **Yasmin** por me acolher em sua casa quando mudei para Recife e por ser alguém que eu posso sempre contar.

Ao meu amigo **Josenildo** pelos momentos vividos juntos ao longo desse período, pela descontração nos dias difíceis e por ser meu parceiro no dia a dia.

Ao amigo **Elifrances**, que compartilhou comigo momentos de trabalho, alegria, dificuldade e principalmente por ter ficado ao meu lado em silêncio quando foi preciso. Tornou-se meu melhor amigo e confidente!

Ao meu querido aluno de iniciação científica **Lucas**, e ao mestrando **João** por toda contribuição, dedicação nos experimentos, conversas, momentos de descontração e

principalmente por terem tornado esse período mais leve.

Aos colegas e amigos **Victoria, Cecília, Ana Luiza, Junior e Ângela** pela companhia, troca de experiências e por cada momento compartilhado.

Aos meus amigos **Kalliny, Renata, Camila, Gibson e Luciana** que acompanham minha trajetória a um bom tempo e que mesmo com a distância fizeram-se presente ao longo dessa caminhada. Amo vocês!

A **Jennifer** por ter participado de um momento importante na minha vida e para além disso, me proporcionar momentos em que finalmente pude me sentir completa e em casa. Obrigada pela amizade.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia pelos ensinamentos transmitidos.

A FACEPE pelo apoio financeiro.

Enfim...

A todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização desse sonho. Muito obrigado!!!

Mas se desejarmos fortemente o melhor e, principalmente, lutarmos pelo melhor... O melhor vai se instalar em nossa vida. Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da minha altura.

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

A cólera é uma desordem caracterizada por elevada secreção intestinal de água e eletrólitos, resultado da abertura do regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR), um canal de Cl^- , pela toxina de *Vibrio cholerae* (TC). O monóxido de carbono (CO) é produzido pelas enzimas heme oxigenase (HO) e foram demonstrados seus efeitos protetores no TGI e sua ação sobre o CFTR. Assim, o presente estudo avaliou o papel da via HO-1/CO na diarreia promovida por TC. Camundongos Balb/c (25-30 g; n=6) foram tratados com CORM-2 (um doador de CO), Hemina (um indutor de HO-1) ou ZnPP (um inibidor de HO-1). Após 30 min., TC (100 μL ; 0,5 ou 1 $\mu\text{g}/\text{alça}$) ou PBS (100 $\mu\text{L}/\text{alça}$) foram inoculados nas alças intestinais. Após 4 h, os animais foram eutanasiados, e avaliou-se a secreção intestinal de fluido, íon Cl^- , permeabilidade vascular, morfometria, absorção, imuno-histoquímica para HO-1 e bilirrubina. Também foi analisada a interação molecular do CO com a TC, por espectroscopia de fluorescência. Os resultados mostraram que a TC aumentou a relação peso/comprimento da alça, secreção de Cl^- e permeabilidade vascular, comparado ao grupo PBS. No entanto, o tratamento com CORM-2 ou Hemina, mas não com iCORM-2, reverteu estes parâmetros alterados pela TC. O efeito da Hemina foi revertido em animais tratados com ZnPP. Comparado com a TC (1 $\mu\text{g}/\text{alça}$), o tratamento com ZnPP não alterou a relação peso/comprimento da alça ou a secreção de Cl^- . Porém, esse efeito foi potencializado quando utilizada uma dose submáxima de TC (0,5 $\mu\text{g}/\text{alça}$). Ademais, o tratamento com CORM-2, Hemina ou ZnPP não alterou a absorção intestinal. A TC alterou a arquitetura do epitélio intestinal e a relação vilo/crípta, comparado ao grupo PBS. Porém, este efeito lesivo foi prevenido pelo CORM-2. A inoculação com TC aumentou a expressão de HO-1 e os níveis de bilirrubina tecidual, comparado ao grupo PBS. Além disso, foi observado uma redução da emissão de fluorescência pela TC, quando incubada com CORM-2, sugerindo interação molecular com o CO. A equação de Stern-Volmer evidenciou interação estática do CO com a TC, com a formação de complexos. Em conclusão, o CO reduz a diarreia provocada pela TC e quando inibida a sua biossíntese endógena pela HO-1, ocorre potencialização da resposta secretora intestinal pela TC. Assim, esses dados sugerem uma possível aplicação do CO como uma molécula terapêutica.

Palavras-chave: Monóxido de carbono; Toxina da Cólera; Diarreia

ABSTRACT

Cholera is a disorder characterized by high intestinal secretion of water and electrolytes, resulting from the opening of the transmembrane conductance regulator of cystic fibrosis (CFTR), a Cl⁻ channel, by *V. cholerae* toxin (TC). Carbon monoxide (CO) is produced by heme oxygenase (HO) enzymes and its protective effects on TGI and its action on CFTR have been demonstrated. Thus, the present study evaluated the role of via HO-1/CO in the diarrhea promoted by TC. Balb/c mice (25-30 g; n = 6) were treated with CORM-2 (a CO donor), hemin (a HO-1 inducer) or ZNPP (a HO-1 inhibitor). After 30 min., TC (100 µl; 0.5 or 1 µg/loop) or PBS (100 µl/loop) were inoculated in the intestinal loops. After 4 h, the animals were euthanized, and the secretion of fluid intestinal, Cl⁻ ion, vascular permeability, morphometry, absorption, immunohistochemistry for HO-1 and bilirubin were evaluated. Molecular interaction of CO with CT was also analyzed by fluorescence spectroscopy. The results showed that the TC increased the weight/length ratio of the loop, secretion of Cl⁻ and vascular permeability, compared to PBS group. However, the treatment with CORM-2 or Hemin, but not with iCORM-2, reversed these parameters altered by the CT. The effect of the hemin was reversed on animals treated with ZNPP. Compared to TC (1 µg/loop), ZNPP treatment did not change the weight/length ratio of the loop or the secretion of Cl⁻. However, this effect was enhanced when a submaximal dose of TC (0.5 µg/loop) was used. In addition, treatment with CORM-2, Hemin or ZNPP did not change the intestinal absorption. The TC altered the architecture of the intestinal epithelium and the vilus/crypt ratio, compared to PBS group. However, this harmful effect was prevented by CORM-2. CT inoculation increased HO-1 expression and the levels of tissue bilirubin, compared to PBS group. In addition, a reduction in fluorescence emission by CT was observed when incubated with CORM-2, suggesting a molecular interaction with CO. The Stern-Volmer equation showed static interaction of CO with CT, with the formation of complexes. In conclusion, CO reduces the diarrhea caused by CT and when its endogenous biosynthesis by HO-1 is inhibited, occurs a potentialization of the intestinal secretory response by the CT. Thus, this data suggests a possible application of CO as a therapeutic molecule.

Keywords: carbon monoxide; cholera toxin; diarrhea

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo da infecção <i>V. cholerae</i>	21
Figura 2 – Número de casos de cólera com base em casos reportados à OMS por continente.....	23
Figura 3 – Distribuição dos casos de cólera no Brasil, 1991 – 2010	24
Figura 4 – Fisiopatologia da cólera.....	26
Figura 5 – Síntese e metabolismo do monóxido de carbono (CO).....	29
Figura 6 – Efeitos do monóxido de carbono (CO).	30
Figura 7 – Animais de experimentação	34
Figura 8 – Procedimento para indução da diarreia pela toxina de <i>V. cholerae</i>	35
Figura 9 – Tratamentos farmacológicos.....	36
Figura 10 – Procedimento para dosagem de Cl ⁻ no fluido intestinal.....	37
Figura 11 – Procedimento para análise da morfometria intestinal.....	38
Figura 12 – Procedimento para análise da permeabilidade vascular intestinal.	39
Figura 13 – Procedimento para análise da absorção intestinal.....	40
Figura 14 – Procedimento para análise da expressão de HO-1 tecidual.....	41
Figura 15 – Procedimento para análise dos níveis de bilirrubina tecidual.	42
Figura 16 – Procedimento para análise da emissão de fluorescência pela toxina de <i>V. cholerae</i>	43
Figura 17 – Efeito da via HO-1/CO na secreção intestinal induzida pela toxina de <i>V. cholerae</i>	46
Figura 18 – Efeito da inibição farmacológica de HO-1 sobre a secreção intestinal induzida pela toxina de <i>V. cholerae</i>	47
Figura 19 – Efeito da via HO-1/CO sobre a concentração de Cl ⁻ no fluido intestinal. ...	48
Figura 20 – Efeito do bloqueio farmacológico de HO-1 sobre a secreção de cloreto intestinal induzida pela toxina de <i>V. cholerae</i>	49
Figura 21 – Efeito do CO sobre as alterações morfométricas promovida pela toxina de <i>V. cholerae</i>	50
Figura 22 – Efeito do CO sobre as alterações da permeabilidade vascular promovida pela toxina de <i>V. cholerae</i>	51
Figura 23 – Efeito de moduladores da via HO-1/CO sobre a absorção de fluido intestinal.....	52
Figura 24 – Coloração imuno-histoquímica para HO-1 e níveis de bilirrubina de animais	

com inoculação de toxina de <i>V. cholerae</i>	53
Figura 25 – Interação molecular do CO com a toxina de <i>V. cholerae</i>	54
Figura 26 – Modelo hipotético do efeito antissecretório do CO e sua possível ligação molecular com a toxina de <i>V. cholerae</i>	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da solução de reidratação oral (SRO)	28
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclase
ADPR	Adenosina difosfato ribose
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ASA	Ácido acetilsalicílico
AV/AC	Vilosidades e profundidade das criptas
C127	Células epiteliais mamárias
CC	Canal de cálcio
CM	Centímetro
CFTR	Canal regulador de condutância da fibrose cística
Cl ⁻	Cloreto
CO	Monóxido de carbono
CORM-2	Tricarbonildiclororutênio (II)
COXs	Ciclooxygenases
CSE	Cistationina gama-liase
CT	Toxina da cólera
CTA	Toxina da cólera subunidade A
CTB	Toxina da cólera subunidade B
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
DII	Doença inflamatória intestinal
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DSS	Dextran sulfato de sódio
Fe ²⁺	Ferro ferroso
G	Gramas
GM1	Receptor gangliosídeo
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GTP	Guanosina trifosfato
Hemina	Cloroprotoporfirina IX ferro (III)
H	Horas
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
H&E	Hematoxilina e eosina

HO-1	Enzima heme-oxigenase 1
HO-2	Enzima heme-oxigenase 2
HO-3	Enzima heme-oxigenase 3
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
iCORMs	CORM-2 inativo
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
I.P	Via intraperitoneal
K ⁺	Potássio
Kg	Quilograma
Kv	Canal de potássio dependente de voltagem
mEq/L	Miliequivalente por litro
mmol/L	Milimoles por litro
mg/dL	Miligrama por decilitro
mg	Miligrama
Na ⁺	Sódio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaOH	Hidróxido de sódio
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NM	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PGE2	Prostaglandina-E2
PKA	Proteína quinase A
PBS	Tampão Fosfato Salina
SRO	Solução de reidratação oral
TcdA	Toxina A de Clostridium difficile
TGI	Trato gastrointestinal
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNBS	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ m	Micrometro

ZnPP Zinco (II) Protoporfirina IX

V. cholerae *Vibrio cholerae*

V.O Via Oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1	DOENÇAS DIARREICAS	20
2.2	CÓLERA: UMA DOENÇA INFECCIOSA	20
2.3	EPIDEMIOLOGIA DA CÓLERA.....	22
2.4	FISIOPATOLOGIA DA CÓLERA	24
2.5	TRATAMENTO DA CÓLERA	26
2.6	MONÓXIDO DE CARBONO (CO): SÍNTESE E METABOLISMO.....	28
2.7	MONÓXIDO DE CARBONO: AÇÕES FISIOLÓGICAS	29
3	OBJETIVOS	32
3.1	GERAL.....	32
3.2	ESPECÍFICOS.....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1	DROGAS E REAGENTES	33
4.2	ASPECTOS ÉTICOS	33
4.3	ANIMAIS	34
4.4	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA INDUÇÃO DA DIARREIA POR TOXINA DE <i>V. cholerae</i>	35
4.5	TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS.....	36
4.6	DOSAGEM DE ÍONS CLORETO (Cl ⁻) NO FLUIDO INTESTINAL	37
4.7	ANÁLISE MORFOMÉTRICA INTESTINAL	38
4.8	ANÁLISE DA PERMEABILIDADE VASCULAR INTESTINAL	39
4.9	AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO INTESTINAL	40
4.10	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA HO-1 TECIDUAL	41
4.11	NÍVEIS DE BILIRRUBINA NO TECIDO INTESTINAL	42
4.12	ESPECTROSCOPIA FLUORIMÉTRICA	43
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5	RESULTADOS	45
5.1	CO DIMINUI A SECREÇÃO DO FLUIDO INTESTINAL PROMOVIDA PELA TOXINA DE <i>V. cholerae</i>	45
5.2	INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DE HO-1 POTENCIALIZA A SECREÇÃO DO FLUIDO INTESTINAL PROMOVIDA PELA TOXINA DE <i>V. cholerae</i>	47
5.3	CO REDUZ A CONCENTRAÇÃO DE CL ⁻ NO FLUIDO INTESTINAL AUMENTADOPELA TOXINA DE <i>V. cholerae</i>	48

5.4	O BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DE HO-1 POTENCIALIZOU A SECREÇÃO DE CL- NO FLUIDO INTESTINAL PROMOVIDA PELA TOXINA DE <i>V. cholerae</i>	49
5.5	CO PROTEGE A ARQUITETURA DO EPITÉLIO INTESTINAL LOCAL ALTERADA PELA TOXINA DE <i>V. cholerae</i>	50
5.6	CO REDUZ A PERMEABILIDADE VASCULAR LOCAL ALTERADA PELA TOXINA DE <i>V. cholerae</i>	51
5.7	MODULADORES FARMACOLÓGICOS DA VIA HO-1/CO NÃO ALTERAM A ABSORÇÃO DE FLUIDO INTESTINAL	52
5.8	A TOXINA DE <i>V. cholerae</i> AUMENTA A IMUNOREATIVIDADE DE HO-1 E OS NÍVEIS DE BILIRRUBINA, UM PRODUTO DA DEGRADAÇÃO DA VIA HO-1/CO, NO TECIDO INTESTINAL	53
5.9	CO INTERAGE COM A TOXINA DE <i>V. CHOLERA</i> E	54
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62
	APÊNDICE A – CARBON MONOXIDE IS A KEY REGULATOR OF DIARRHEA PROMOTED BY TOXIN FROM <i>Vibrio cholera</i>: PERSPECTIVE FOR ITS USE AS A THERAPEUTIC TOOL	70

INTRODUÇÃO

A cólera é uma doença diarreica aguda causada pela enterotoxina do *Vibrio cholerae* através da ingestão de alimentos ou água contaminados por essa bactéria. O *V. cholerae* é um bacilo gram-negativo com flagelo polar, aeróbio ou anaeróbio facultativo, classificado em mais de 200 sorogrupos e membro da família *Vibrionaceae* (CHOWDHURY et al., 2022).

Nos últimos anos, tem ocorrido epidemias de cólera no mundo, sendo endêmica em áreas da Ásia e África, onde as populações têm condições sanitárias precárias. Embora amplamente subnotificada, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima cerca de 2,8 milhões de pessoas afetadas pela doença, onde 91 mil afetados podem evoluir para óbito (SOUSA et al., 2020). No Brasil, os últimos casos de cólera ocorreram entre os anos de 2004 e 2005, onde foram registrados 21 casos. A partir daí, não houve casos autóctones de cólera, tendo sido notificados apenas 3 casos importados, um da Angola (2006), um da República Dominicana (2011) e outro de Moçambique (2016) (BRASIL, 2020).

Apesar de erradicada no Brasil, pesquisas desenvolvidas nessa área são necessárias por ainda existir risco de contaminações autóctones, podendo se expandir em diversas regiões brasileiras onde existem problemas no sistema de saneamento básico e condições precárias de vida.

Esta doença diarreica resulta em grande perda de fezes aquosas, chegando até 1 litro por hora, causando rápida desidratação, o que pode progredir para choque hipovolêmico e acidose metabólica. Isso se dá, após a ingestão da bactéria *V. cholerae*, que em seguida coloniza o intestino delgado (VANDEN BROECK et al., 2007).

Um dos principais fatores responsáveis pela virulência da *V. cholerae* aos hospedeiros de mamíferos é a produção e liberação da toxina da cólera (CT) (NADEEM et al., 2022), formada por uma subunidade A (CTA) de 240 aminoácidos incorporados numa subunidade B (CTB), um homopentâmetro circular contendo 103 aminoácidos em cada monômero da sua estrutura (SÁNCHEZ; HOLMGREN, 2008). A interação com células do intestino humano ocorre por meio da ligação da CTB ao receptor gangliosídeo (GM1), permitindo a entrada de CTA na célula alvo (CUATRECASASAS, 1973). Dentro da célula, CTA regula uma guanosina trifosfatase que rege a adenilato ciclase, resultando num aumento irreversível dos níveis de AMPc

e consequente ativação da proteína quinase A (PKA). Uma vez ativada, a PKA aumenta a atividade do regulador de condutância da fibrose cística transmembrana (CFTR), o que leva a um aumento da secreção de cloreto (Cl^-), uma das principais características da diarreia produzida por *V. cholerae* (DAS et al., 2018).

Por ser um potente estimulador do canal CFTR, a *V. cholerae* promove um desequilíbrio eletrolítico, onde altas concentrações de Cl^- são secretadas no lúmen intestinal. Esse aumento exacerbado prejudica a função intestinal por secretar volumes superiores à sua capacidade absorptiva, ocasionando problemas secundários como desidratação devido a perda de fluidos, diminuição da massa muscular, desnutrição e dores abdominais intensas, o que pode levar o indivíduo a óbito (SACK et al., 2004). Dessa forma, o canal CFTR representa um importante alvo para uma possível proteção contra a diarreia causada pela toxina de *V. cholerae*.

Dados na literatura mostram que mediadores gasosos, tais como o óxido nítrico (NO), o sulfeto de hidrogênio (H_2S) e o monóxido de carbono (CO), produzidos endogenamente demonstram atividade protetora no trato gastrointestinal (TGI) e estão envolvidos na manutenção da integridade da mucosa, na modulação do fluxo sanguíneo local e da secreção gastroduodenal (WALLACE et al., 2017; DANIELAK et al., 2021). Estudos recentes demonstraram que o H_2S tem ação antissecretória contra a diarreia produzida pela toxina de *V. cholerae*, reduzindo fatores ligados à inflamação, como o NF- κB , diminuição dos níveis de PGE2, IL-1 β e TNF- α assegurando a proteção das vilosidades intestinais. Além disso, o H_2S também inibiu a secreção intestinal de Cl^- , ao passo que a toxina de *V. cholerae* aumentou a expressão de cistationina gama-liase (CSE), uma das principais enzimas envolvidas na produção de H_2S (SOUZA et al., 2018; SOUZA et al., 2021).

Nesta perspectiva, o CO vem recebendo cada vez mais atenção, e se tornando um importante mensageiro principalmente no TGI, pois está predominantemente envolvido em respostas protetoras e neuromodulação (GIBBONS et al., 2013). Essa molécula é produzida endogenamente a partir da degradação do grupo heme da hemoglobina através da enzima heme-oxigenase 1 (HO-1; induzível) e heme-oxigenase 2 (HO-2; constituinte), com a liberação de ferro ferroso (Fe^{2+}) e biliverdina, onde esta última é ainda convertida em bilirrubina pela enzima biliverdina redutase (COSTA et al., 2013; WALLACE et al., 2017). Sabe-se também da existência de uma terceira isoforma, a HO-3, porém suas funções não são bem estabelecidas (MEDEIROS et al., 2011).

Umas das características importantes do CO, é seu potencial de atravessar membranas, ligando-se a receptores e transportadores mediando mudanças funcionais na célula através de seus alvos moleculares, tais como monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), canais para potássio (K^+)-dependentes do cálcio (Ca^{2+}) da musculatura vascular, que resulta em uma potente vasodilatação (WANG et al., 1997), reversão da superexpressão do canal K(v)2.1 em células HEK293, colaborando para ação anti-apoptótica neuronal através da regulação de canais K^+ retificadores retardados (DALLAS et al., 2011), além de efeito protetor contra a lesão intestinal provocada por toxina A de *Clostridium difficile* (TcdA) (MEDEIROS et al., 2011).

No TGI, o CO é capaz ainda de modular o transporte de Cl^- e bicarbonato (HCO_3^-) no cólon, um efeito dependente do canal CFTR, regulando a secreção intestinal em ratos (STEIDLE; DIENER, 2011). Adicionalmente, Rodrat (2020) mostrou recentemente por meio experimentos de “*patch-clamp*” e usando células epiteliais mamárias (C127) expressando o canal CFTR, que uma molécula doadora de CO, o CORM-2, tem ação direta sobre o CFTR, impedindo a abertura do canal, o fluxo de corrente através de canais abertos com cinética muito rápida, e sugeriram que o CO pode ser um regulador fisiológico do transporte epitelial mediado por CFTR (RODRAT et al., 2020).

Assim, o presente estudo visa avaliar o papel da via de sinalização HO-1/CO na diarreia induzida pela toxina de *V. cholerae* e seus possíveis mecanismos de ação. Espera-se que a partir desse estudo, seja possível estabelecer um potencial protetor do CO contra a diarreia colérica, colaborando assim para uma possível terapia clínica.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 DOENÇAS DIARREICAS

As doenças diarreicas são um problema de saúde pública global que contribuem para o aumento da morbidade e mortalidade mundial, principalmente nos países em desenvolvimento. Segundo a OMS, em 2020 as doenças diarreicas foram consideradas a segunda principal causa de óbitos no mundo, com aproximadamente 1,7 bilhão de casos, levando 525 mil crianças menores de 5 anos a óbito. Países em desenvolvimento são os mais atingidos por essas desordens, por não terem um saneamento básico de qualidade, colaborando para o aumento do número de casos (OMS, 2022). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística IBGE, uma proporção significativa das doenças diarreicas no Brasil é transmitida pela água, por existirem falhas de abastecimento e saneamento básico, com maior prevalência dessas doenças na região Nordeste, onde concentram-se 50% dos casos nacionais (BRASIL, 2020).

Existem dois tipos de doenças diarreicas, as de origem não infecciosa, que são ocasionadas por fármacos como antibióticos, laxantes e quimioterápicos, que podem desencadear desordens como a doença de Crohn, colite ulcerativa, doença celíaca, síndrome do intestino irritável e intolerâncias alimentares como à lactose e ao glúten. Por outro lado, as infecciosas são causadas por microrganismos, tais como bactérias, vírus e parasitas, que são responsáveis por quadros de gastroenterite, uma inflamação que afeta o estômago e o intestino (BRASIL, 2020).

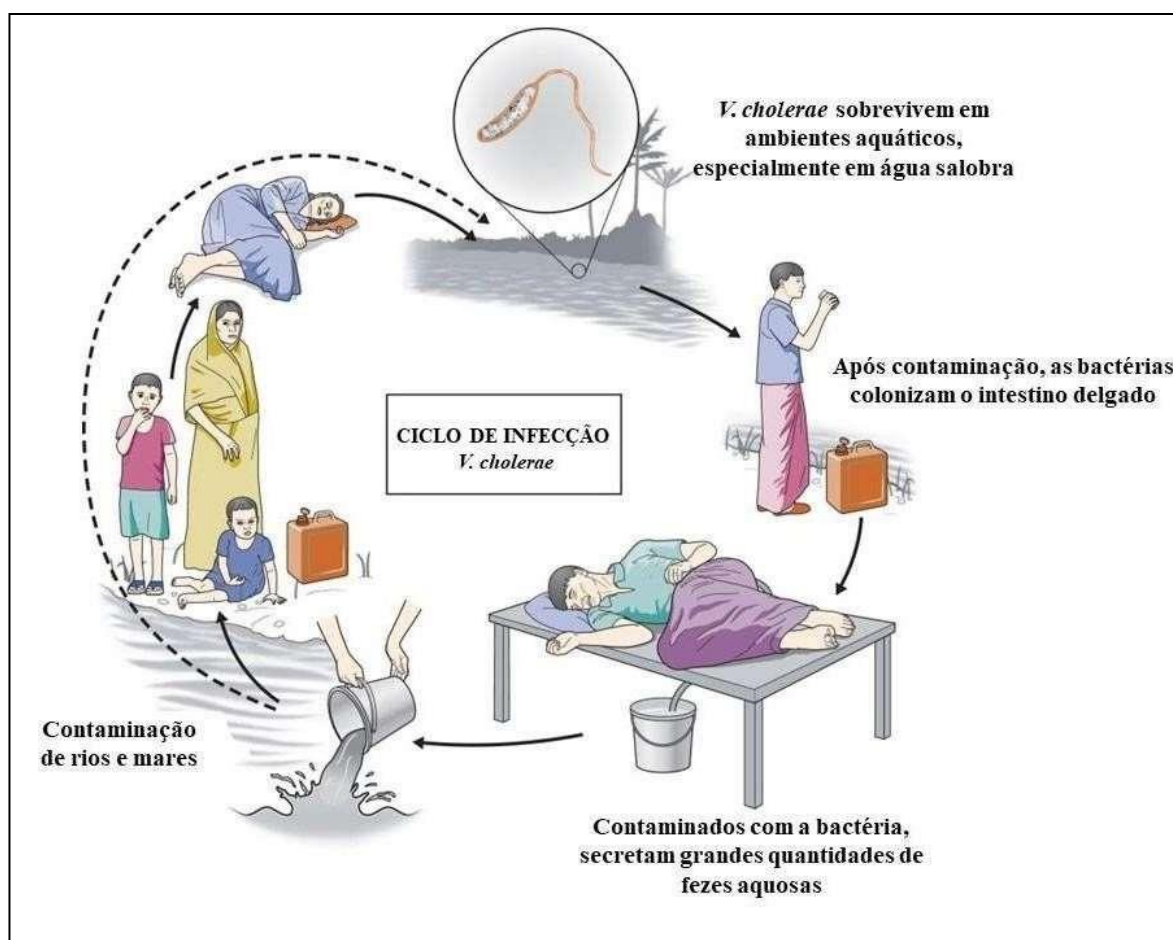
No contexto das diarreias infecciosas, o rotavírus é um dos principais responsáveis pela morte de crianças menores de cinco anos. O *V. cholerae* também atinge crianças nessa faixa etária, e é responsável pela maioria dos casos de óbitos em adultos, tornando-se um agravante em epidemias de diarreia (HASAN et al., 2021).

1.2 CÓLERA: UMA DOENÇA INFECCIOSA

A cólera é uma doença infecciosa intestinal causada pela bactéria *V. cholerae*, um bacilo gram-negativo com flagelo apolar que facilita sua locomoção, anaeróbio ou anaeróbio facultativo, pertencente à família *Vibrionaceae* (WEIL; HARRIS, 2022). Essa doença é transmitida através do consumo de água e/ou alimentos contaminados

(Figura 1), caracterizada por uma síndrome de evacuações de fezes aquosas com ocorrência de três ou mais vezes em um período de 24 horas, gerando um quadro que pode ser acompanhado de náusea, vômito, febre e dor abdominal (ELLIOTT et al., 2007). Em casos graves, pode haver perda de até 1 litro de fluido intestinal, levando a desidratação, acidose pela perda de HCO_3^- nas fezes, acidose láctica associada à má perfusão, choque hipovolêmico e morte nas primeiras horas após os sintomas (BRASIL, 2008).

Figura 1 – Ciclo da infecção *V. cholerae*



Fonte: Adaptado de Weil et al., 2020.

A partir disso, o Fundo das Nações Unidas para Infância (UNICEF) e a OMS desenvolveram estratégias para controlar ou erradicar os números de casos e morte por essa doença, através da conscientização da população a respeito do abastecimento de água, higiene e saneamento básico de qualidade, incluindo o fortalecimento da vigilância na detecção de casos e implantação de equipes de resposta rápida nas áreas afetadas (UNICEF, 2019).

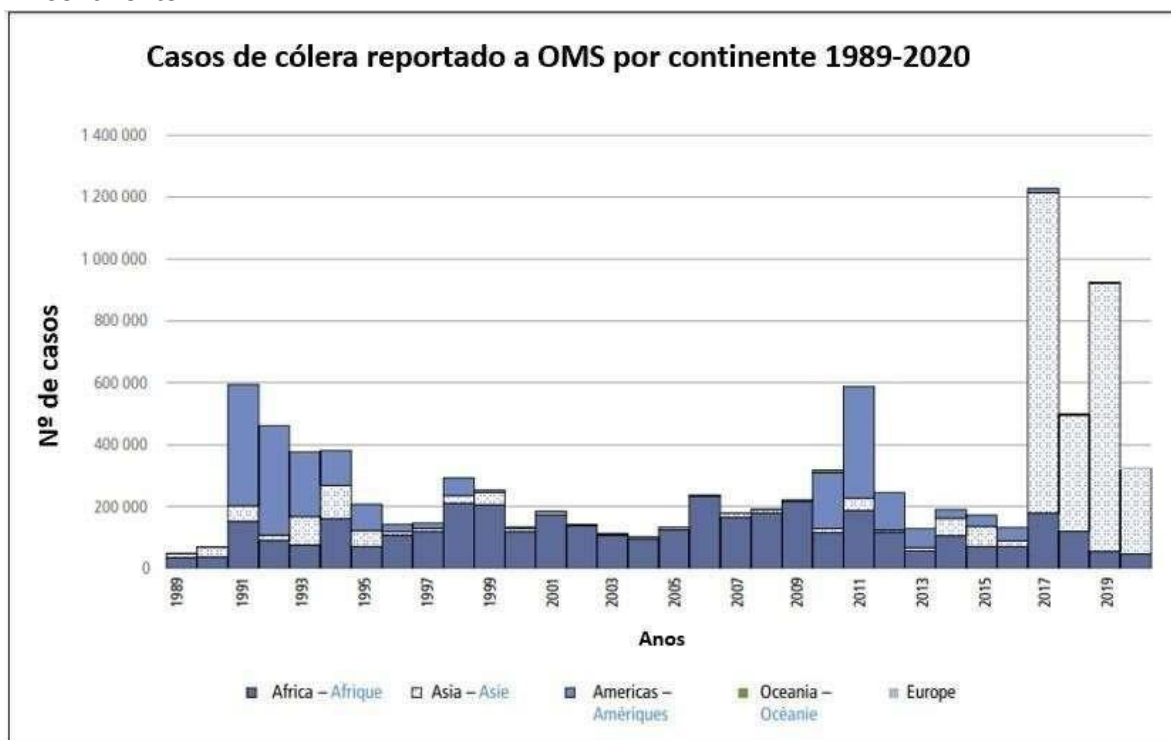
1.3 EPIDEMIOLOGIA DA CÓLERA

A cólera possui predisposição para causar epidemias com potencial pandêmico, assim como capacidade de permanecer endêmica em áreas afetadas. Em condições epidêmicas, pessoas de todas as idades podem contrair a infecção, já nas endêmicas, afetam principalmente crianças a partir de 2 anos de idade. As grandes epidemias de diarreia foram bem documentadas na história humana e a cólera destaca-se pela elevada morbimortalidade (HASAN et al., 2021). Essas epidemias surgem em um longo ciclo sobreposto às doenças endêmicas existentes. Este padrão refere-se ao declínio da imunidade da população exposta a um surto anterior, sobreposto a ciclos de variabilidade climática. Fatores ambientais, tais como o aumento de temperatura e inundações tem colaborado para o aumento e desenvolvimento dessa de epidemias (HARRIS et al., 2012).

Nesse contexto, os maiores registros de casos foram detectados no continente Africano, sendo a Somália e a Etiópia, as regiões mais afetadas, onde foram registrados 6.414 e 12.226, respectivamente. Em Uganda, houve um aumento substancial no número de casos, sendo registrados 1.521 casos em 2020. Esses números chamaram atenção, pois ocorreram ao longo de sua fronteira com o Quênia, demonstrando o risco da transmissão nas fronteiras. Na Ásia, houve um declínio no número de casos em 2020, sendo relatados no Iêmen (275.712 casos). Apesar dos números serem menores que em anos anteriores, a cólera segue persistindo nessa região. Na América, no Haiti e na República Dominicana, não houve nenhum caso em 2020. Vale ressaltar que nessas regiões, a cólera foi responsável por 850.000 casos e mais de 10.000 mortes em 2010, quando houve uma reintrodução da doença. Na Europa e Oceania foram relatados 2 casos, na Holanda, que foram importados, sem propagação local em 2020. (Figura 2).

Apesar de uma baixa nos casos, ainda existem diversos fatores de risco para novas contaminações da cólera ao redor do mundo, mas também há diferenças importantes, principalmente em áreas desenvolvidas. O quadro global de cólera continua a evoluir e provavelmente mudará nos próximos anos, mas a cólera continuará afetando populações de áreas subdesenvolvidas, sem acesso a água e ao saneamento básico adequado (DEEN et al., 2020).

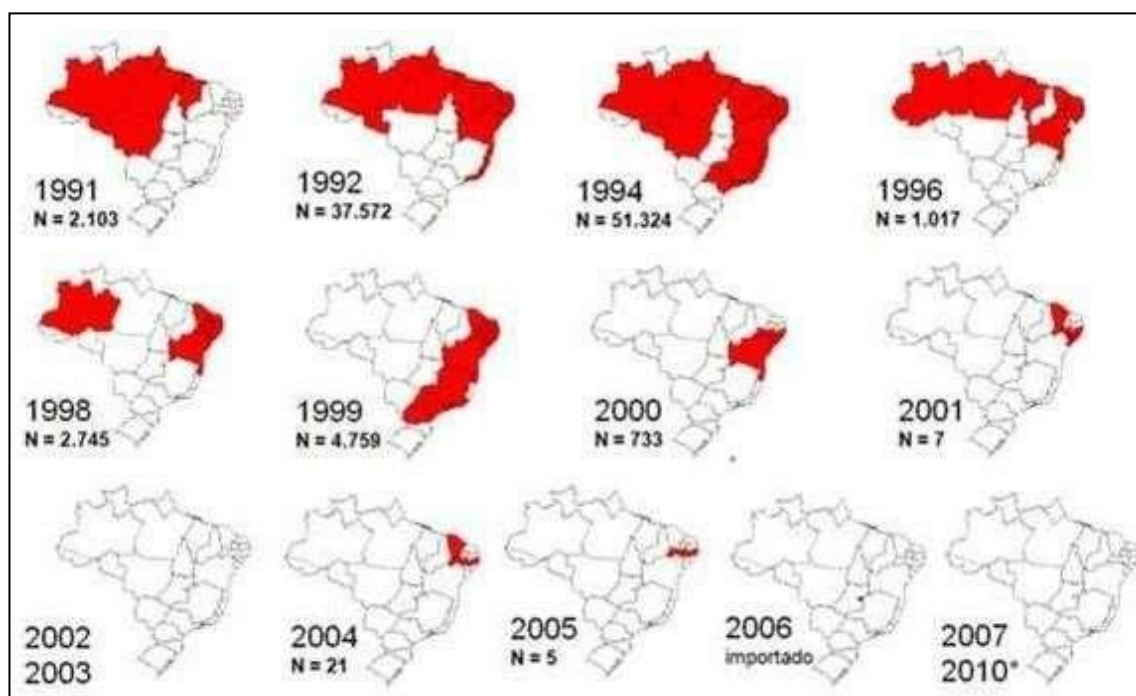
Figura 2 – Número de casos de cólera com base em casos reportados à OMS por continente



Fonte: Adaptado de Weil et al., 2020.

Conforme mostra a (Figura 3), o último surto de cólera no Brasil iniciou em 1991, com ápice em 1994, quando foram registrados 51.324 casos, sendo 49.276 na região nordeste. Entre os anos de 2000 e 2007, houve uma redução significativa no número de casos e óbitos no Brasil, sendo registrados, nesse período, 766 casos e 20 óbitos, onde o estado de Pernambuco liderou o número de casos registrados. Considerando-se a ocorrência de casos e surtos em países com relações estreitas com o Brasil, tais como Haiti, República Dominicana, e México, pode-se haver risco de reintrodução de cólera por viajantes do exterior, turistas ou trabalhadores brasileiros, e essa forma de contaminação ainda é um risco evidente e preocupante (EDUARDO; KATSUYA, 2018).

Figura 3 – Distribuição dos casos de cólera no Brasil, 1991 – 2010



Fonte: SINAN/SVS/MS, 2016

1.4 FISIOPATOLOGIA DA CÓLERA

A cólera é um quadro de diarreia aguda provocada por cepas da bactéria *V. cholerae*, produtoras de enterotoxinas virulentas. Essas toxinas são capazes de alterar o funcionamento intestinal, provocando grande perda de água e de eletrólitos, tais como HCO_3^- , Na^+ , Cl^- e K^+ . Algumas bactérias não sobrevivem a acidez gástrica, uma importante linha de defesa do organismo, porém, as que conseguem ultrapassar essa barreira colonizam o intestino delgado (WOLF et al., 2008).

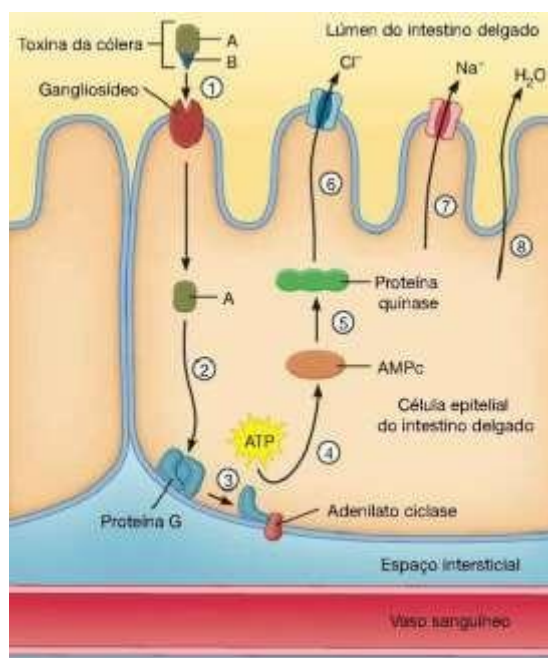
Uma das enterotoxinas de *V. cholerae* é uma proteína de massa molecular de 85 kDa, constituída por duas subunidades. A subunidade A contém 27,2 kDa e consiste em 2 polipeptídeos distintos que são ligados por uma ponte de dissulfeto. Já a subunidade B contém 11,6 kDa, sendo uma lectina pentamérica que se liga à superfície das células intestinais para mediar a translocação da subunidade A para o citosol, ou seja, se liga ao domínio oligossacarídico do receptor de membrana das células epiteliais do jejuno, o gangliosídeo GM1 (BASU et al., 2014; Sousa et al., 2020). A toxina tem alta afinidade por este receptor e após ligação, a subunidade A é transportada para o retículo endoplasmático por uma via retrógrada que pode ou não envolver a passagem pelo aparelho Golgi (Clemens MD et al., 2017).

Uma vez translocada para o citosol a subunidade A torna-se ativa e promove a clivagem da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) em adenosina difosfato ribose (ADPR) e nicotinamida. Após essa clivagem ADPR se liga covalentemente a subunidade α da proteína G_s , que tem estimula a adenilato ciclase (AC) localizada na membrana basolateral dos enterócitos (WANDS et al., 2015). Essa ligação inibe a atividade intrínseca GTPase da subunidade α , impedindo assim, a auto inativação da sua atividade estimulante da AC. Portanto, a ligação ADPR- $G_{s\alpha}$ faz com que o GTP permaneça ligado a subunidade α da proteína G_s impedindo sua reassociação as subunidades β e γ da proteína G_s . Assim, a toxina por meio da subunidade A, promove uma ativação persistente da AC e uma elevação dos níveis de AMPc intracelular (MUANPRASAT et al., 2013), resultando na ativação de PKA, que medeia a abertura do canal CFTR (Figura 4) (THIAGARAJAH et al., 2003).

O receptor CFTR pertence às proteínas de ligação a ATP (ABC) (subfamília C, membro 7; ABCC7), e constitui a arquitetura geral da subfamília ABCC. Essa estrutura é responsável pela ligação de quatro domínios: dois domínios de abrangência de membrana (MSD1 e MSD2) e dois domínios de ligação de nucleotídeos (NBD1 e NBD2). Cada MSD é composto por 6 hélices transmembranares (TM1–TM6 e TM7–TM12), seguido por um domínio de ligação de nucleotídeos. Uma das características distintivas do CFTR é a presença de uma região intrinsecamente desordenada, o domínio regulatório (RD), localizada entre NBD1 e MSD2. Como na maioria das proteínas ABC, a atividade da ATPase dos NBDs utiliza a energia de ligação e hidrólise de ATP para energizar a translocação de vários substratos através das membranas. Entretanto, o CFTR é um caso único de uma proteína ABC que forma um canal iônico dependente de ATP (MORAN et al., 2016).

O receptor CFTR é um canal de Cl^- expresso na membrana apical de células epiteliais que revestem o intestino, e tem um papel crítico no transporte transepitelial de Cl^- e secreção de fluido intestinal (FIELD, 2003). A hiperativação do canal CFTR pela toxina de *V. cholerae* faz com que ocorra uma secreção excessiva de Cl^- , acompanhada pelo movimento osmótico de grande quantidade de água para o lúmen, o que pode sobrecarregar a reabsorção de fluido intestinal, causando a diarreia secretória (MOON et al., 2015).

Figura 4 – Fisiopatologia da cólera



Fonte: 2014, Fisiologia Humana da Stanfield 5ª, p 164.

Apesar dos avanços nas pesquisas sobre sua fisiopatologia, a diarreia causada por *V. cholerae* ainda é um problema socioeconômico e global (CHEUVRONT et al., 2021). Os rápidos avanços no ritmo das pesquisas biomédicas continuarão a beneficiar as doenças que afetam o mundo desenvolvido, mas infelizmente este não é o caso de países em desenvolvimento. Como resultado, não há atualmente nenhuma terapia eficaz para o tratamento da diarreia secretória por toxina de *V. cholerae* (DAHL; YAMADA, 2008).

1.5 TRATAMENTO DA CÓLERA

O tratamento da cólera consiste na administração de uma solução de reidratação oral (SRO), composta de glicose, cloreto de sódio, cloreto de potássio e citrato de sódio (Tabela 1), que contribuem para a reidratação, colaborando para o equilíbrio eletrolítico, por promover a absorção de fluido intestinal e manutenção da hidratação. Esse tratamento surgiu a partir da descoberta de que glicose estimula fisiologicamente a absorção de Na^+ por um mecanismo independente do aumento de AMPc (FLACH et al., 2007; CHENG 2016). A partir daí, a SRO tornou-se de suma importância, pois diminui a mortalidade de crianças por distúrbios eletrolíticos, é mais acessível que a reidratação venosa, baixo custo e possui menos riscos (CHEUVRONT

et al., 2021).

Tabela 1 – Composição da solução de reidratação oral (SRO)

SOLUÇÃO DE REIDRATAÇÃO ORAL (SRO)	
Composição	Quantidade (g)
<i>Coreto de sódio</i>	2,6
<i>Citrato de sódio</i>	2,9
<i>Cloreto de potássio</i>	1,5
<i>Glicose</i>	13,5

Fonte: Adaptado de Weil et al., 2020.

Embora a SRO seja a melhor medida terapêutica recomendada pelas diretrizes da OMS e UNICEF e tenha causado uma redução da mortalidade em cerca de quatro vezes nas últimas 3 décadas, a sua eficácia é limitada nos jovens e idosos, pois a administração de fluidos não proporciona um alívio dos sintomas, não elimina a bactéria e não interfere no mecanismo de ação de sua toxina (TRADTRANTIP et al., 2014; GRIGGS et al., 2016).

A OMS tem disponibilizado o zinco com uma importante terapia aditiva para crianças menores de 5 anos, pois é um micronutriente essencial, considerado um fator anti-inflamatório e protege as membranas celulares contra danos oxidativos (HOQUE et al., 2006). Isso leva à redução dos riscos e atua na manutenção e ativação de células imunes, tornando-se um aliado essencial para as respostas de combate ao agente causal da diarreia (OMS 2022).

Atualmente existem três vacinas da cólera oral aprovadas pela OMS, a Dukoral®, Shanchol™ e Euvichol-Plus®. A Dukoral® é administrada em 2 doses, com uma a seis semanas de intervalo, sua formulação contém pequenas quantidades de *V. cholerae* inativadas e parte da subunidade B da toxina, que não é tóxica por si só. Assim, quando a vacina é administrada, o sistema imune reconhece a bactéria e a toxina e inicia a produção de anticorpos específicos e possibilita uma proteção por cerca de 2 anos. Já a Shanchol™ e Euvichol-Plus® contém cepas O1 e O139 de *V. cholerae* inativados, que após ingestão, também estimulam a produção de anticorpos pelo sistema imunológico. Deve haver um atraso mínimo de duas semanas entre cada dose dessas vacinas, com uma proteção prolongada por até 3 anos (OMS, 2022).

Apesar das vacinas exercerem um papel fundamental e ajudado na diminuição do número de casos de cólera, elas não protegem adequadamente as crianças, pois a sua eficácia é mais baixa para as crianças mais jovens, com maior risco de morte pela doença. Isso acontece devido a vários fatores, incluindo imunidade menos pré-existente à *V. cholerae* e diferenças nas respostas imunológicas. Outro fator potencial inclui enteropatia ambiental, uma condição ainda mal compreendida que ocorre devido à contaminação fecal-oral e que frequentemente resulta em inflamação da mucosa intestinal (Weil et al, 2018). Assim, não há atualmente nenhuma terapia eficaz ou medicamento para o tratamento da cólera o que suporta a busca por novos alvos e abordagens de tratamento.

1.6 MONÓXIDO DE CARBONO (CO): SÍNTESE E METABOLISMO

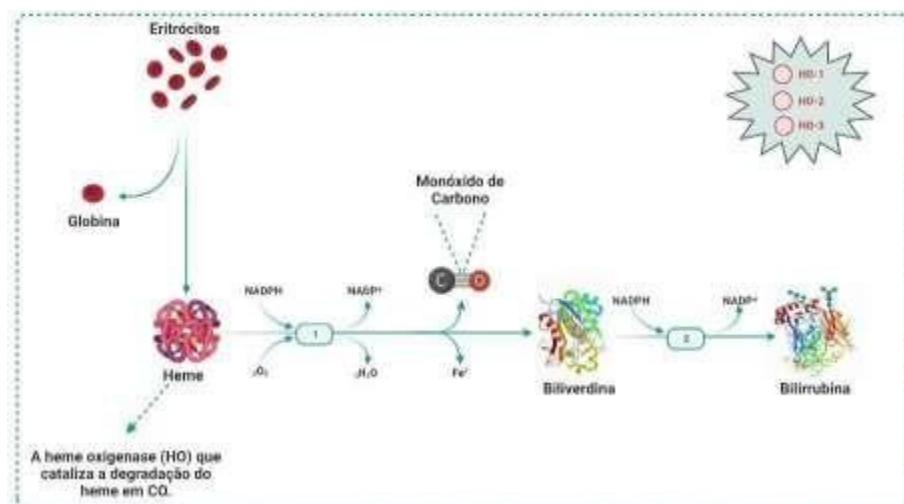
O CO é um gás lipossolúvel produzido endogenamente a partir da degradação do grupo heme da hemoglobina (WALLACE et al., 2017). Este grupamento é um complexo essencial para a função das células aeróbicas, visto que funciona como carreador do oxigênio para os tecidos. Além disso, o grupo heme também serve como grupo prostético de numerosas outras hemoproteínas e desempenha um papel fundamental no controle da síntese proteica e diferenciação celular (PONKA, 1999).

A síntese de CO ocorre por ação enzimática da heme-oxigenase (HO), uma enzima microssomal que catalisa a degradação do grupo heme em CO, ferro ferroso (Fe^{2+}) e biliverdina, esta última é posteriormente convertida em bilirrubina pela enzima biliverdina redutase (Figura 5) (ABRAHAM et al, 1988). Três isoformas de HO já foram relatadas. A HO-1 é a forma induzível da enzima, que, em geral, é expressa em condições de estresse oxidativo, isquemia e/ou reperfusão, por citocinas pró-inflamatórias, endotoxinas e heme (DOI et al., 1999; FUJITA et al., 2001; YACHIE et al., 2003). Por outro lado, a HO-2 é expressa de maneira constitutiva na maioria dos tecidos (MCCOUBREY et al., 1997). Uma terceira isoforma, a HO-3, parece ser uma derivação da HO-2 e foi descrita em roedores, mas sem funções biológicas ativas conhecidas no organismo humano.

Sabe-se também que o CO gerado no meio ambiente, principalmente devido a combustão, pode se ligar ao ferro presente na hemoglobina e reduzir sua capacidade de transportar o oxigênio para os tecidos (PIANTADOSI, 2002), levando à hipóxia tecidual e, até mesmo, à morte. No entanto, essa visão negativa atribuída ao CO não

deve mascarar os inúmeros estudos que sinalizam as atividades protetoras da HO-1 e do CO, desde que em doses apropriadas (FORESTI et al., 2008).

Figura 5 – Síntese e metabolismo do monóxido de carbono (CO)



Fonte: Autor 2022.

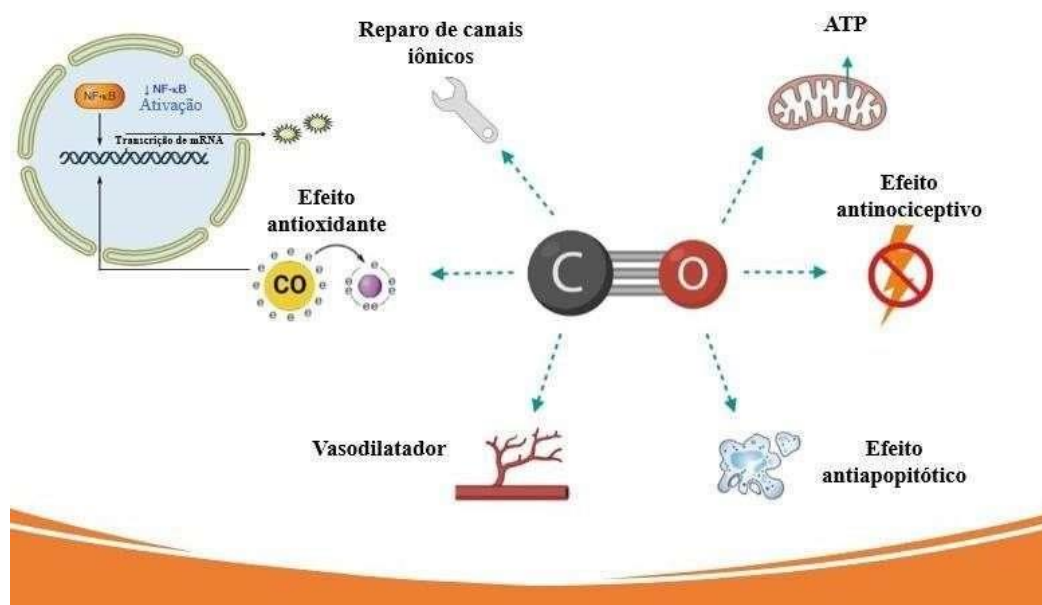
1.7 MONÓXIDO DE CARBONO: AÇÕES FISIOLÓGICAS

Na última década, estudos desvendaram muitos aspectos sobre as funções fisiológicas do CO. Foi demonstrado que o CO pode atuar sobre genes anti-apoptóticos protegendo as células endoteliais da necrose causada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (BROUARD et al., 2002). O CO também induz o relaxamento do músculo liso vascular, regula a pressão arterial, o processo inflamatório e inibe a agregação plaquetária (OLAS et al., 2014).

O CO tornou-se um importante alvo de pesquisas nos últimos anos, principalmente no TGI, pois há muitas evidências de sua ação sobre canais iônicos, incluindo o CFTR, um canal para Cl⁻. Apesar de ser produzido em baixas concentrações no TGI, a biossíntese do CO pode ser induzida, aumentando rapidamente seus níveis em poucas horas (FARRUGIA et al., 2014). A administração de baixas concentrações de CO em animais de experimentação, melhora a motilidade intestinal e a contratilidade muscular circular do TGI (GIBBONS et al., 2004). Além disso, o aumento da atividade de HO-1 protege o TGI contra diversos tipos de injúria tecidual, tais como a inibição de danos oxidativos e apoptose (Figura 6), com redução do processo inflamatório devido sua capacidade de reduzir a migração de neutrófilos, exsudação e liberação de mediadores pró-inflamatórios, além de regulação da

expressão de proteínas de adesão (VICENTE et al, 2003; HAYASHI et al, 1999).

Figura 6 – Monóxido de carbono (CO)



Fonte: Adaptado de Chan et al., 2013.

Por sua vez, de maneira similar, o CO também reduz respostas inflamatórias em diversos modelos de estresse oxidativo (OTTERBEIN et al, 2003) e contribui, ainda, aumentando a transcrição de genes anti-inflamatórios (BELCHER et al, 2006). Ademais, o CO já demonstrou proteger a mucosa do TGI em diferentes modelos animais de distúrbios digestivos, como lesão induzida por isquemia/reperfusão do intestino delgado, enterite induzida por toxina e colite experimental (UDDIN et al., 2013; MEDEIROS et al., 2011; KATADA et al., 2009).

Adicionalmente, o CO pode atuar sobre o funcionamento de canais iônicos. Estudos já sugeriram que o CO possui papel fundamental na vasodilatação por regular canais para K^+ dependentes de cálcio da musculatura vascular (WANG et al., 1997), bem como atuar sobre a fibrose cística ao interferir em canais para Na^+ do epitélio pulmonar (ALTHAUS et al., 2009). Além disso, o CO também pode modular o transporte transepitelial de íons colônicos, como Cl^- e bicarbonato, atuando na regulação da secreção intestinal (STEIDLE; DIENER, 2011). Além disso, o CO pode interagir com outras proteínas tais como citocromo P450, ciclooxigenases (COXs) e óxido nítrico sintase (NOS), sendo capaz de modular a resposta de outros mediadores gasosos e inflamatórios (COCEANI et al., 1996; MAGIEROWSKA et al., 2018; GIBBONS et al., 2013).

Um estudo recente publicado por Rodrat e colaboradores (2020) mostrou que o CO pode interagir diretamente com o canal CFTR, onde foi observado um efeito inibitório desse canal, diminuição da sua frequência de abertura, sugerindo que o CO regula a atividade do CFTR e consequentemente o transporte de íons no epitélio (RODRAT et al., 2020). Desse modo, o CO consegue obstruir o efluxo de Cl^- , o que poderia ser um importante mecanismo protetor contra a diarreia provocada pela toxina de *V. cholerae*.

Nesse sentido, estabeleceu-se a hipótese de que o CO possa desempenhar um papel protetor contra a diarreia colérica. Assim, o presente estudo visou avaliar as implicações da via de sinalização HO-1/CO na diarreia induzida pela toxina de *V. cholerae* e possíveis mecanismos de ação.

OBJETIVOS

1.8 GERAL

- Avaliar o papel da via HO-1/CO na diarreia induzida por toxina de *V. cholerae* em camundongos.

1.9 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da modulação farmacológica da via HO-1/CO sobre o acúmulo de fluido intestinal na diarreia induzida por toxina de *V. cholerae*;
- Estudar os efeitos da modulação farmacológica da via HO-1/CO sobre o efluxo de íons cloreto, na alça intestinal inoculada com toxina de *V. cholerae*;
- Investigar os efeitos do CO sobre as alterações morfométricas intestinais de camundongos submetidos a diarreia causada pela toxina de *V. cholerae*;
- Avaliar as ações do CO sobre a permeabilidade vascular na diarreia induzida por toxina de *V. cholerae*;
- Investigar possíveis alterações pela modulação farmacológica da via HO-1/CO sobre a absorção intestinal;
- Avaliar os níveis de bilirrubina intestinal na diarreia induzida por toxina de *V. cholerae*;
- Analisar a expressão de HO-1 intestinal após indução da diarreia por toxina de *V. cholerae*;
- Avaliar a ligação da molécula CO à toxina de *V. cholerae*, por meio de espectroscopia de fluorescência;

MATERIAIS E MÉTODOS

1.10 DROGAS E REAGENTES

Tricarbonildiclororutênio (II) (CORM-2), Cloroprotoporfirina IX ferro (III) (Hemina), Zinco (II) Protoporfirina IX (ZnPP) e toxina de *V. cholerae* foram adquiridos junto a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O CORM-2 inativo (iCORM-2) foi preparado mantendo a solução estoque de CORM-2 em DMSO a 1% durante 18 h a 37°C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂ para liberar CO (SUN et al., 2008). CORM-2 foi dissolvido em DMSO a 1%. Hemina e ZnPP foram dissolvidos em NaOH a 1 mM. A toxina de *V. cholerae* foi dissolvida em tampão fosfato salina (PBS). Todos os outros produtos químicos e reagentes eram de qualidade analítica e obtidos de fornecedores comerciais padrão.

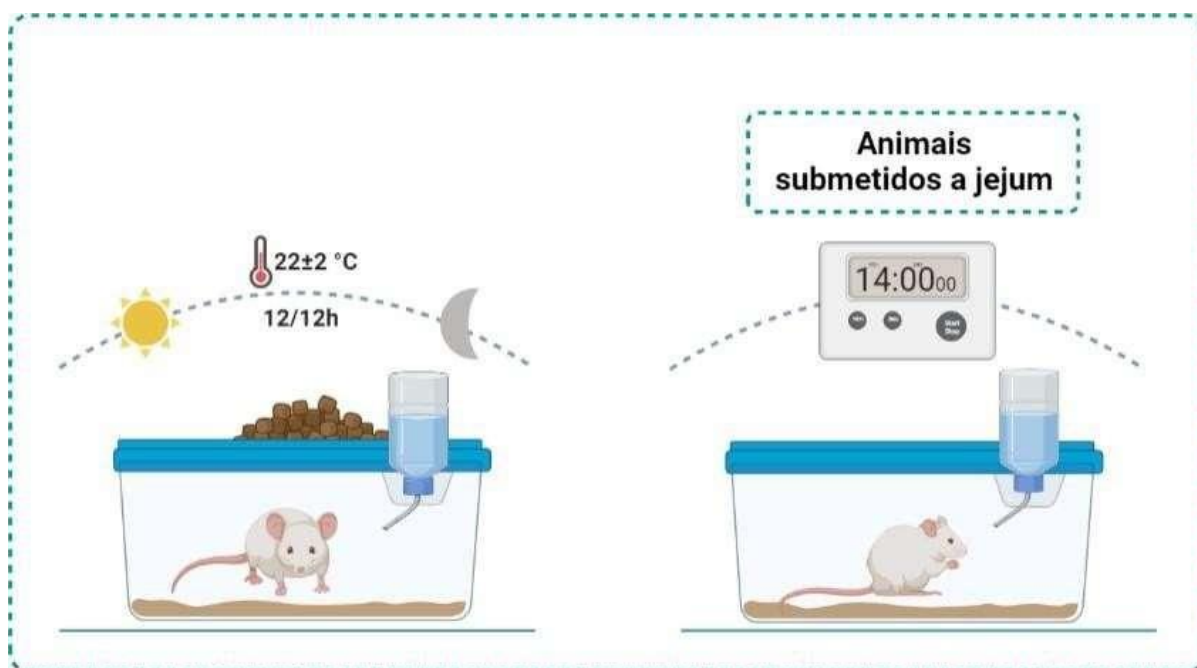
1.11 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE (Protocolo nº 17/2019).

1.12 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c (25-30g; 8 semanas de idade; n=6) machos/fêmeas, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, com temperatura e luminosidade controlada, ciclo de 12h claro/12h escuro, com livre acesso a ração e água. Antes dos experimentos, os animais foram randomizados e submetidos a jejum de 14 h, com livre acesso apenas à água (Figura 7).

Figura 7 – Animais de experimentação

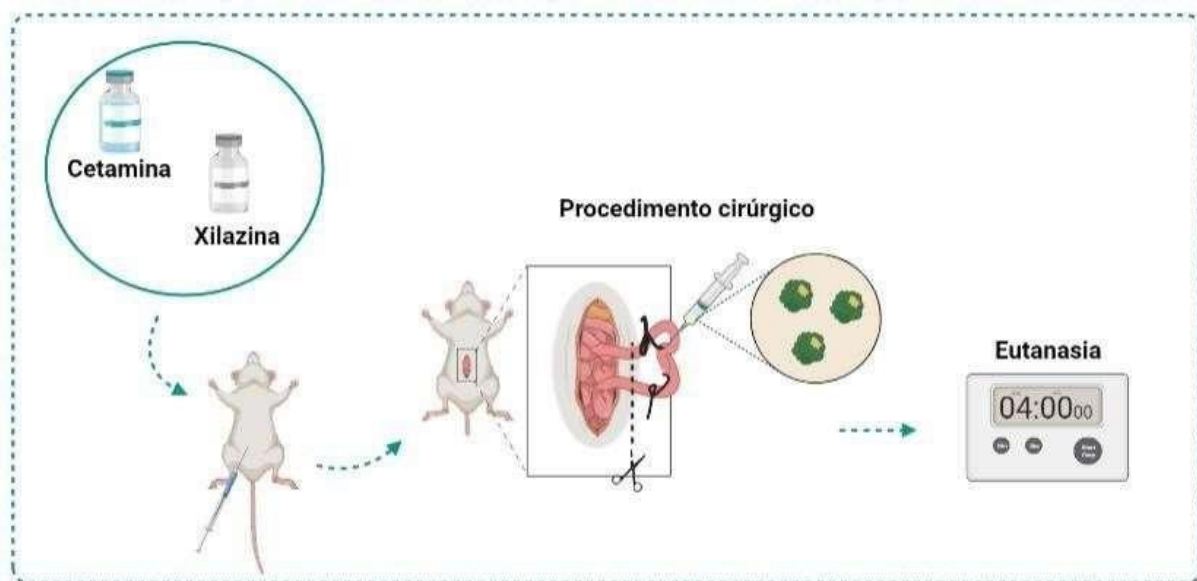


Fonte: Autor (2022).

1.13 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA INDUÇÃO DA DIARREIA POR TOXINA DE *V. cholerae*

Inicialmente, os camundongos foram anestesiados com xilazina + cetamina (8 e 80 mg/kg, i.p., respectivamente), em seguida foi realizada uma laparotomia mediana, onde foi feita uma incisão na pele e, depois, no peritônio para visualizar e expor o intestino delgado. Uma porção do jejuno foi isolada e fechada com dupla lassada para formar uma alça intestinal medindo cerca de 2 cm. Então, foi inoculada a toxina de *V. cholerae* (1 µg de toxina por alça em PBS; 100 uL). No grupo controle, foi administrado apenas 100 uL de PBS. As alças intestinais foram devolvidas à cavidade abdominal e a incisão fechada. Após 4 h, os animais foram eutanasiado e o fluido e o tecido intestinal foram coletados para avaliação (Figura 8).

Figura 8 – Procedimento para indução da diarreia pela toxina de *V. cholerae*.

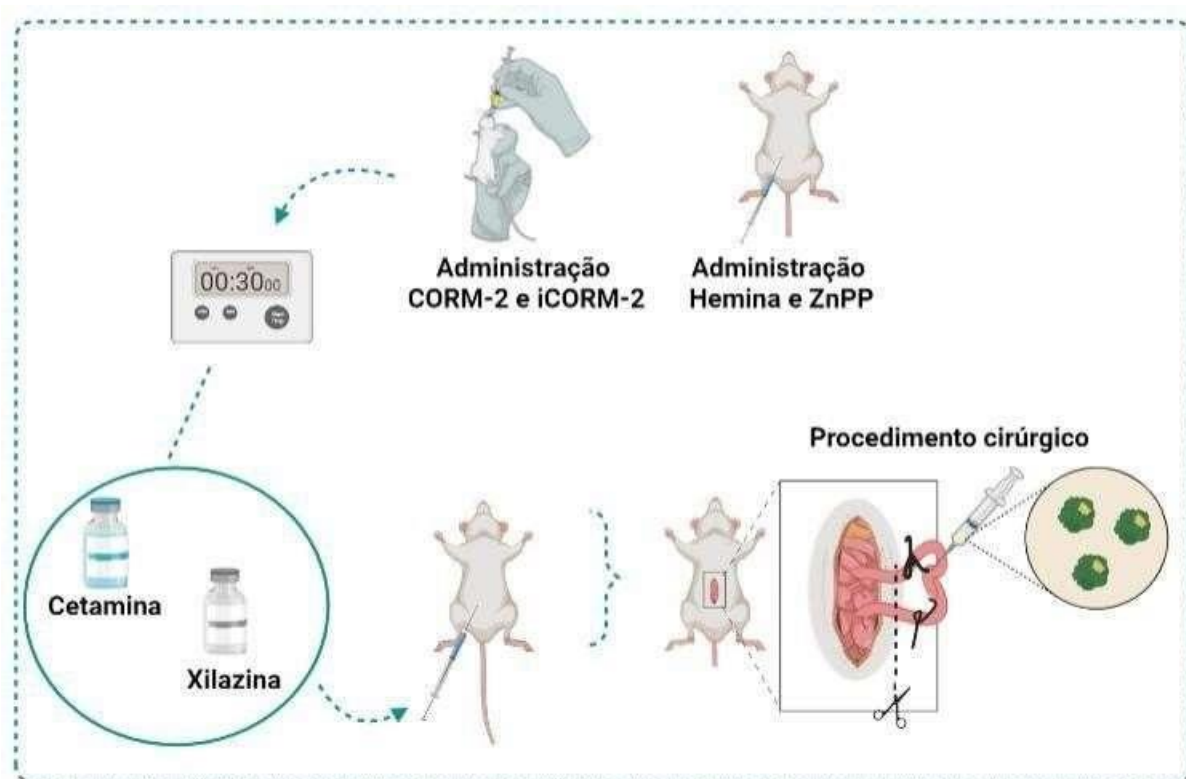


Fonte: Autor (2022).

1.14 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS

Os animais foram tratados com CORM-2 (um doador de CO; 0,5, 1,5 ou 5 mg/kg, v.o.), Hemina (um indutor de HO-1; 1, 3 ou 10 mg/kg, i.p.) ou ZnPP (um inibidor de HO-1; 1, 3 ou 10 mg/kg, i.p.) (ARAUJO et al., 2018). Os grupos controles receberam apenas PBS, DMSO a 1% ou NaOH a 1 mM. Após 30 min, os animais foram anestesiados para realização do procedimento cirúrgico e inoculação da toxina de *V. cholerae* (100 μ L; 1 μ g/alça), conforme descrito anteriormente. Após 4 h, os camundongos foram eutanasiados, e a alça intestinal foi retirada. A secreção do fluido intestinal foi medida a partir da relação peso/comprimento da alça e expressa em gramas de tecido por centímetros (g de tecido/cm). Em seguida, o fluido e o tecido intestinal foram coletados para análises posteriores (Figura 9) (TRADTRANTIP et al., 2014).

Figura 9 – Tratamentos farmacológicos

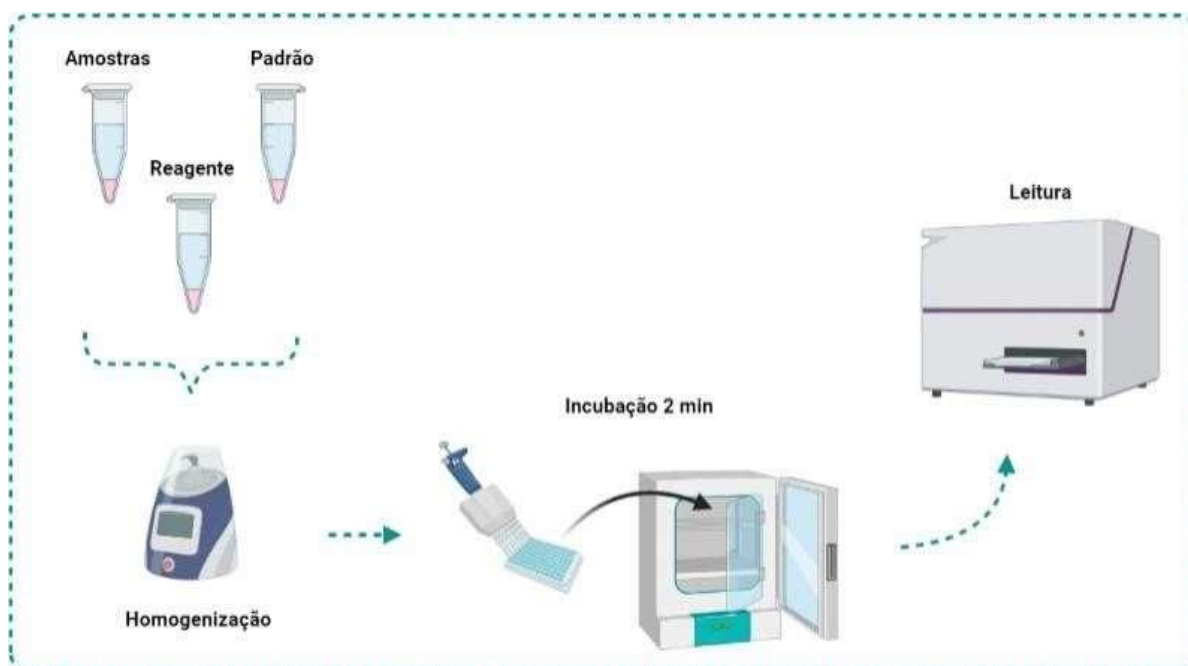


Fonte: Autor (2022).

1.15 DOSAGEM DE ÍONS CLORETO (Cl^-) NO FLUIDO INTESTINAL

As concentrações de Cl^- no fluido intestinal foram medidas utilizando um kit bioquímico (Labtest, São Paulo, Brasil), conforme as instruções do fabricante. Em resumo, o fluido intestinal foi centrifugado a 4.000 rpm durante 10 min e o sobrenadante foi homogeneizado com tiocianato de mercúrio a 2,0 mmol/L, cloreto de mercúrio a 0,8 mmol/L, nitrato férrico a 20 mmol/L, ácido nítrico a 28 mmol/L e um estabilizador. Em seguida, o homogeneizado foi misturado com um reagente padrão a 100 mEq/L. A concentração de Cl^- foi medida utilizando um leitor de placas a 450 nm. Os resultados foram expressos em miliequivalente por litro (mEq/L) (Figura 10).

Figura 10 – Procedimento para dosagem de Cl^- no fluido intestinal

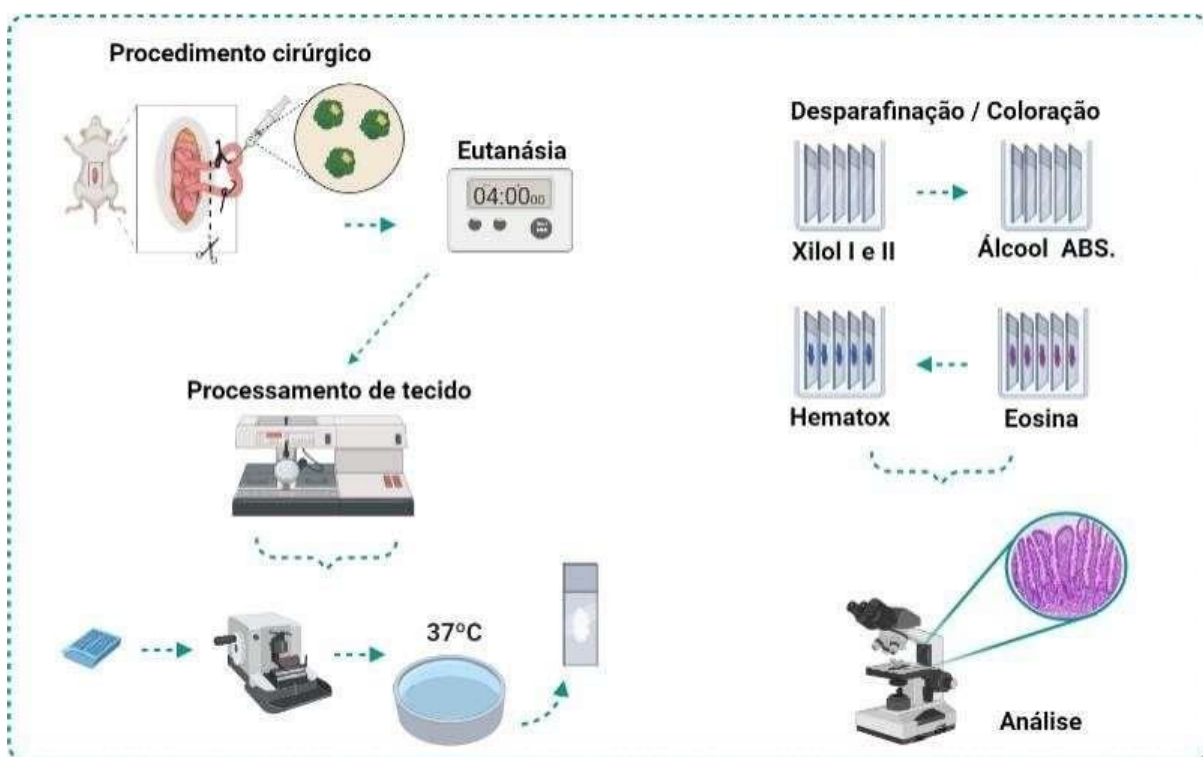


Fonte: Autor (2022).

1.16 ANÁLISE MORFOMÉTRICA INTESTINAL

Inicialmente, as alças intestinais foram fixadas em formalina a 10%, desidratadas em álcool 70% e embebidas em parafina. As secções (3- μ m de espessura) foram desparafinizadas, coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e analisadas utilizando um microscópio de luz. As lâminas foram fotografadas em um microscópio (Nikon, modelo Eclipse Ni-U) com as objetivas 10 $\times$ e 40 $\times$. A altura das vilosidades e profundidade das criptas intestinais (4 a 5 por lâmina) foram medidas utilizando o software ImageJ® 1.4 (NIH, Bethesda, MD, EUA). Os resultados foram expressos como uma razão da altura das vilosidades e profundidade das criptas (AV/PC) (Figura 11) (ALVARENGA et al., 2017).

Figura 11 – Procedimento para análise da morfometria intestinal

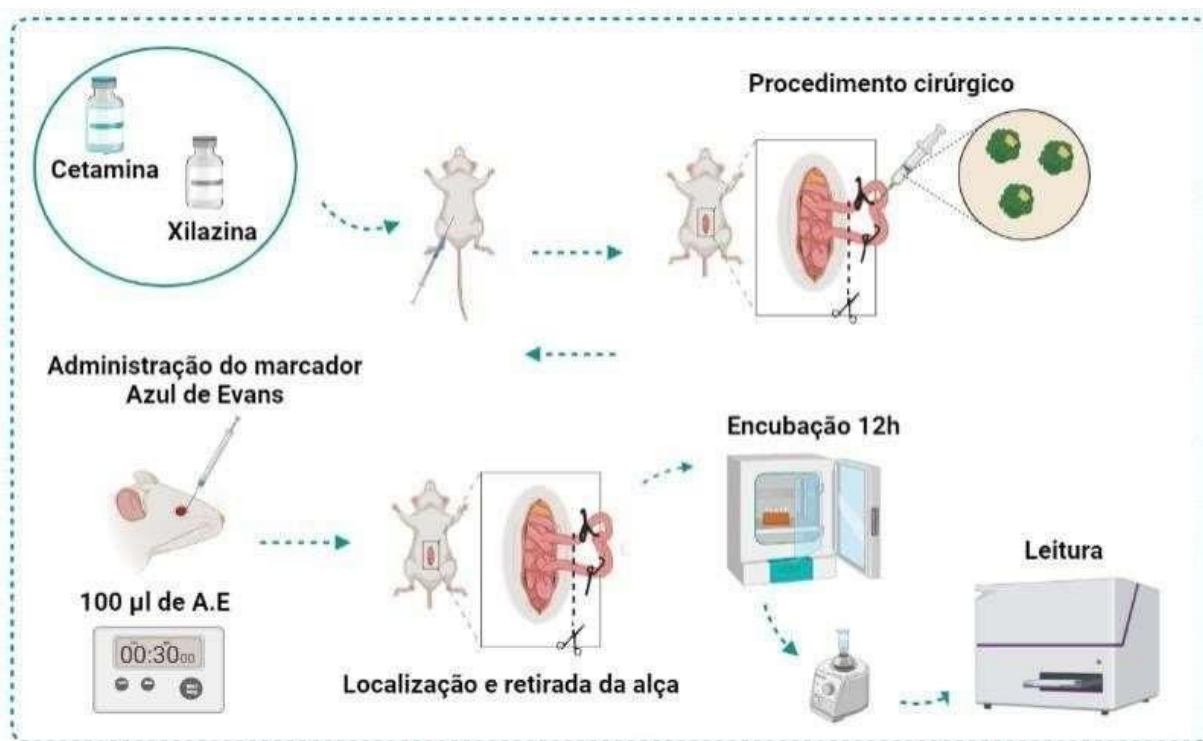


Fonte: Autor (2022).

1.17 ANÁLISE DA PERMEABILIDADE VASCULAR INTESTINAL

Os camundongos receberam CORM-2 (um doador de CO; 5 mg/kg, v.o.) ou Hemina (um indutor HO-1; 10 mg/kg, i.p.). Após 30 min., os animais foram anestesiados para realização do procedimento cirúrgico e inoculação da toxina de *V. cholerae* (100 μ L; 1 μ g/alça). O grupo controle recebeu apenas PBS. Após 4 h, os animais receberam azul de Evans (25 mg/kg; 150 μ L, i.v.) e a alça intestinal foi coletada 30 min mais tarde. Em seguida o tecido foi pesado e colocado em formamida a 37°C durante 12 h. As amostras foram misturadas e analisadas utilizando um leitor de placas a 620 nm. Os resultados foram expressos em micrograma de azul de Evans por miligrama de tecido (μ g de azul de Evans/mg de tecido) com base em uma curva padrão, (Figura 12) (RADU, CHERNOFF et al., 2013).

Figura 12 – Procedimento para análise da permeabilidade vascular intestinal

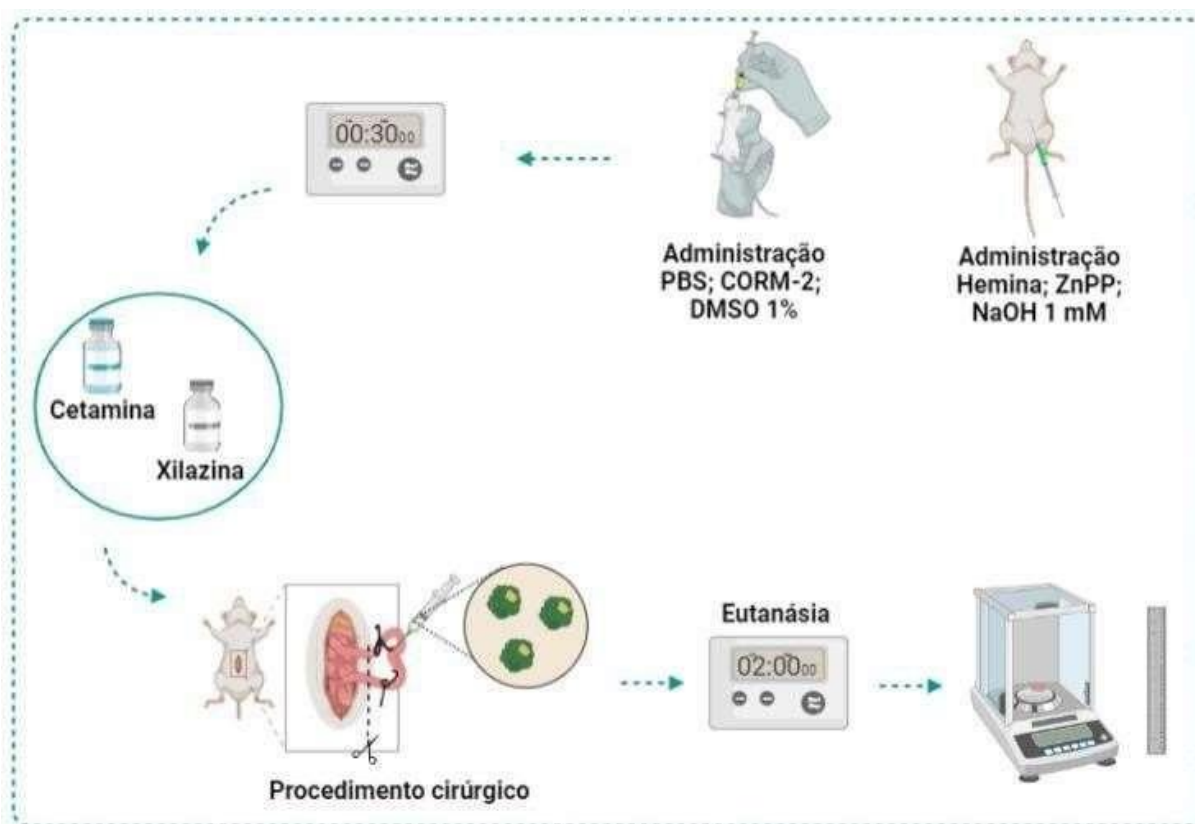


Fonte: Autor (2022).

1.18 AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO INTESTINAL

Inicialmente, os camundongos receberam CORM-2 (um doador de CO; 5 mg/kg, v.o.), Hemina (um indutor HO-1; 10 mg/kg, i.p.) ou ZnPP (um inibidor de HO-1; 10 mg/kg, i.p.). Após 30 min os animais foram anestesiados para realização do procedimento cirúrgico e administração de PBS (200 μ L/alça). Os grupos controles receberam apenas PBS, DMSO 1% ou NaOH 1 mM. A absorção intestinal foi analisada no tempo basal (T_0) e duas horas após a cirurgia (T_{2h}), usando uma relação entre o peso e o comprimento da alça, sendo os valores expressos em gramas de tecido por centímetros (g de tecido/cm) (Figura 13) (AKRIMAJIRACHOOTE et al., 2020).

Figura 13 – Procedimento para análise da absorção intestinal

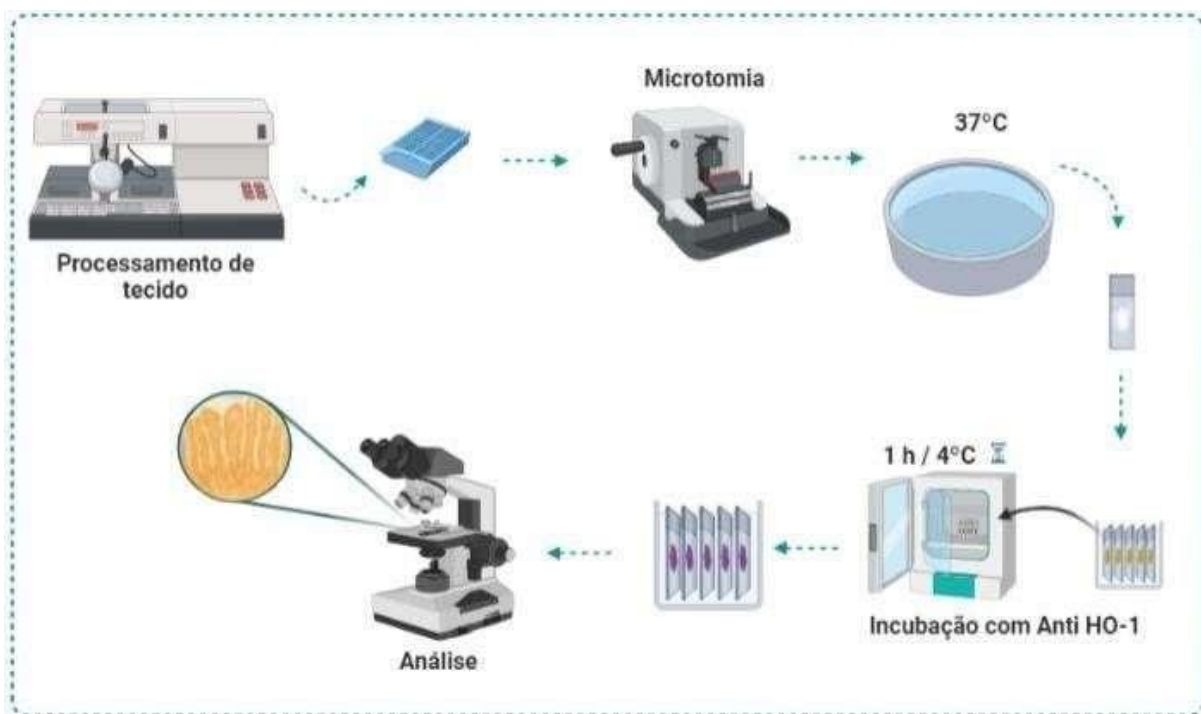


Fonte: Autor (2022).

1.19 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA HO-1 TECIDUAL

Secções (3- μ m de espessura) da alça intestinal foram imersas em tampão citrato (pH 6,0) a 95°C durante 20 min. A peroxidase endógena foi bloqueada com H₂O₂ 3% (v/v) durante 20 min. Em seguida as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo anti-HO-1 (1:200, Santa Cruz Biotechnology) durante 1 h. As lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com polímero (DAKO) durante 30 min. Após lavagem, foram coradas com 3,3-diaminobenzidina (DAB; DAKO). Lâminas controle negativo foram incubadas com diluente de anticorpos, porém sem anticorpos primários. As lâminas foram fotografadas em um microscópio (Nikon, modelo Eclipse Ni-U) com a objetiva 40 $\times$. As células intestinais foram identificadas com base na sua morfologia, localização e coloração (Figura 14) (SOUSA et al., 2018).

Figura 14 – Procedimento para análise da expressão de HO-1 tecidual

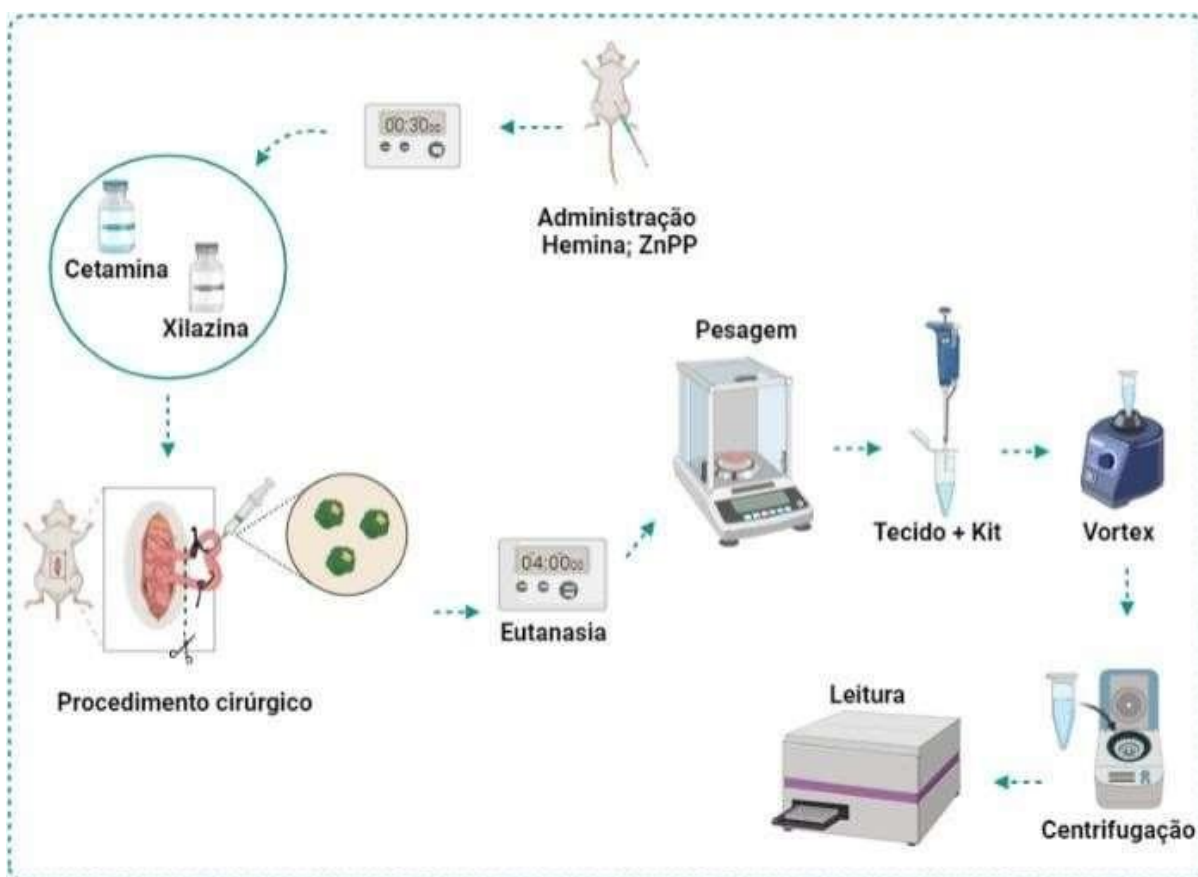


Fonte: Autor (2022).

1.20 NÍVEIS DE BILIRRUBINA NO TECIDO INTESTINAL

A concentração de bilirrubina no tecido intestinal foi quantificada utilizando um kit bioquímico (Labtest, São Paulo, Brasil), conforme as instruções do fabricante. Em resumo, as alças intestinais foram homogeneizadas em PBS e centrifugadas a 4.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi incubado com ácido sulfanílico a 5,75 mmol/L, nitrito de sódio a 72,5 mmol/L, cafeína a 130 mmol/L; benzoato de sódio a 260 mmol/L e acetato de sódio a 460 mmol/L, durante 5 min. A concentração de bilirrubina foi medida utilizando um leitor de placas a 525 nm e os resultados foram expressos em miligramas de bilirrubina por decilitro (mg/dL) (Figura 15).

Figura 15 – Procedimento para análise dos níveis de bilirrubina tecidual



Fonte: Autor (2022).

1.21 ESPECTROSCOPIA FLUORIMÉTRICA

O espectro de fluorescência da toxina de *V. cholerae* na presença ou ausência de CORM-2 (um doador de CO) foi estudado usando um leitor fluorescência (Varioskan Flash, Thermo Fisher) a 25°C ou 45°C (LAKOWICZ, 2006). Os dados foram analisados por meio da área sob a curva (ASC). Para medições da extinção de fluorescência, CORM-2 (2 µM, 20 µM e 200 µM) foi adicionado sucessivamente à toxina de *V. cholerae* (3 µM) (Figura 16). Foi utilizada excitação a 282 nm e os espectros de emissão foram registrados de 305 a 370 nm e os valores finais de fluorescência foram corrigidos para o efeito de filtro interno, usando a seguinte equação.

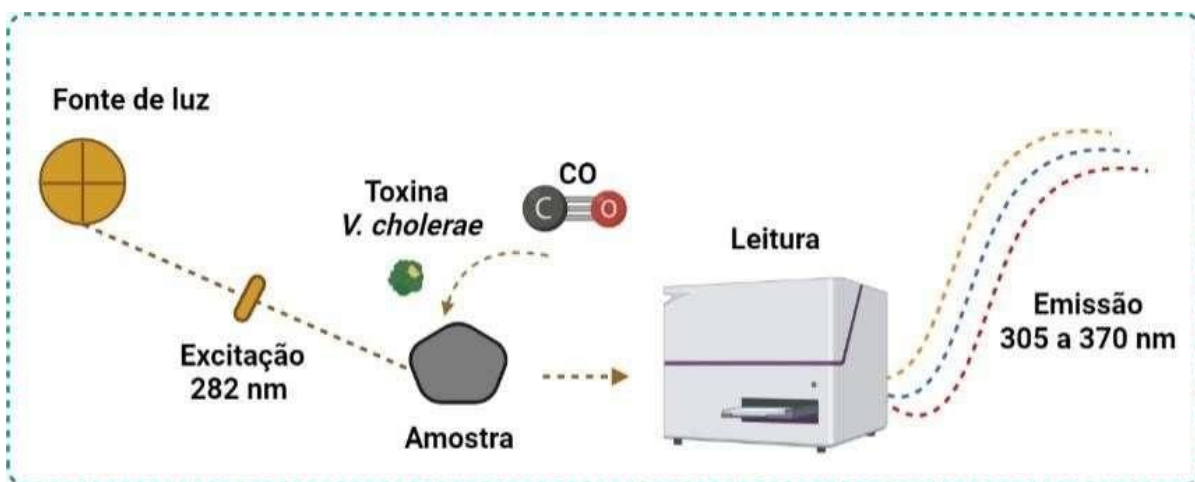
$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \times 10^{\frac{A_{\text{ex}} + A_{\text{em}}}{2}}$$

Onde F_{corr} e F_{obs} são as intensidades de fluorescência corrigidas e observadas, respectivamente, A_{ex} e A_{em} são as absorbâncias das amostras nos comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente.

Para elucidar o mecanismo molecular da interação do CO com a toxina de *V. cholerae*, um gráfico foi plotado utilizando os dados das duas temperaturas analisadas e as intensidades de fluorescência foram determinadas no λ_{max} , utilizando a equação de Stern-Volmer.

$$\frac{F_o}{F_c} = 1 + K_{\text{SV}} \times [\text{NP}]$$

Figura 16 – Procedimento para análise da emissão de fluorescência pela toxina de *V. cholerae*



Fonte: Autor (2022).

1.22 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média. A normalidade dos dados foi analisada através do Teste de normalidade Shapiro-Wilk. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism® (Versão 5.0). O significado estatístico foi determinado pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de comparações múltiplas utilizando o teste de Newman-Keuls. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

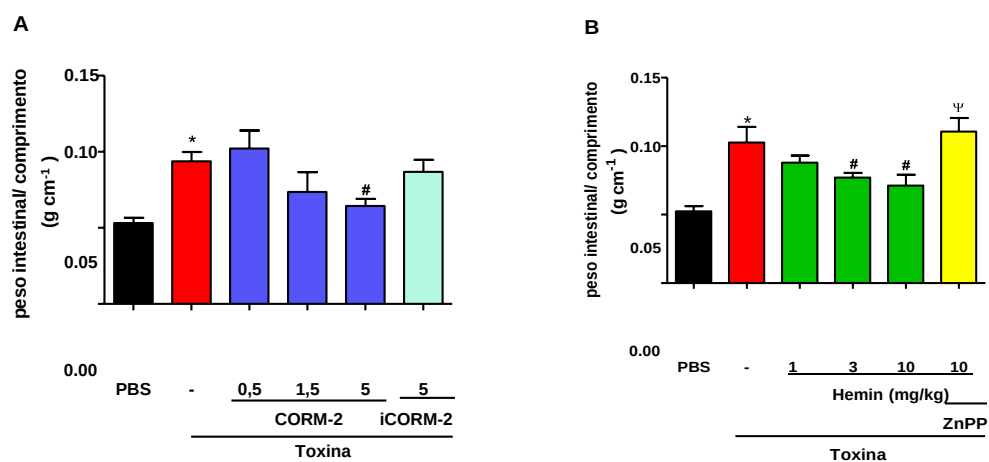
RESULTADOS

1.23 CO DIMINUI A SECREÇÃO DO FLUIDO INTESTINAL PROMOVIDA PELATOXINA DE *V. cholerae*

A Figura 17A demonstra que a toxina de *V. cholerae* ($0,093 \pm 0,006$ g/cm) aumentou a relação peso/comprimento da alça, comparado ao grupo PBS ($0,053 \pm 0,003$ g/cm). Contudo, os animais tratados com CORM-2 a 5 mg/kg ($0,064 \pm 0,004$ g/cm) tiveram uma redução significativa ($P < 0,05$) da secreção do fluido intestinal causada pela toxina de *V. cholerae*. Além disso, a administração de iCORM-2 ($0,086 \pm 0,007$ g/cm), uma molécula que não libera CO, não alterou a relação peso/comprimento da alça, em comparação com a toxina de *V. cholerae*. Animais tratados apenas com CORM-2 ($0,056 \pm 0,004$ g/cm), iCORM-2 ($0,062 \pm 0,007$ g/cm) ou veículo DMSO ($0,055 \pm 0,006$ g/cm), não tiveram alterações na secreção de fluido intestinal, comparado ao grupo PBS.

Na Figura 17B, o tratamento com Hemina (3 mg/kg: $0,077 \pm 0,003$ g/cm e 10 mg/kg: $0,071 \pm 0,007$ g/cm) diminuiu a relação peso/comprimento da alça, comparação ao grupo toxina de *V. cholerae* ($0,102 \pm 0,011$ g/cm). No entanto, o pré- tratamento com ZnPP ($0,110 \pm 0,009$ g/cm) reverteu este efeito do Hemina. O grupo PBS ($0,052 \pm 0,003$ g/cm) mostrou níveis basais. Hemina ($0,054 \pm 0,007$ g/cm), ZnPP ($0,055 \pm 0,006$ g/cm), ou NaOH ($0,050 \pm 0,002$ g/cm), não tiveram alterações significativas na relação peso/comprimento da alça.

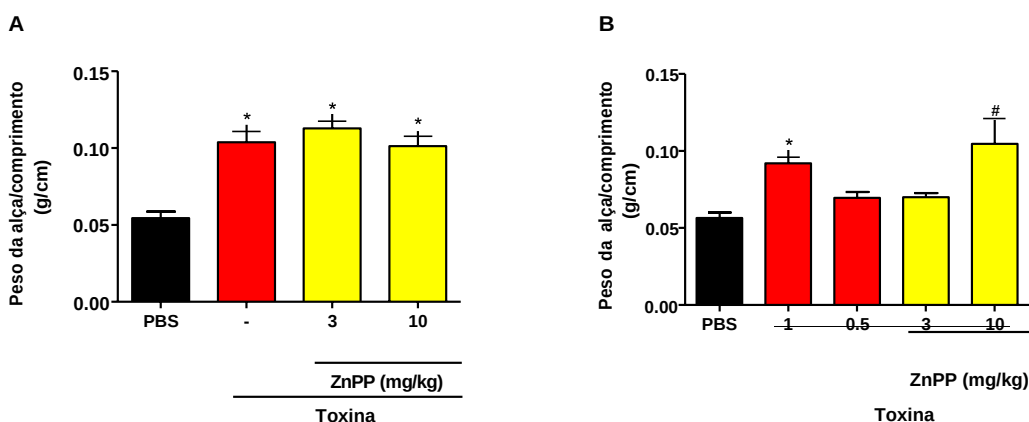
Figura 17 – Efeito da via HO-1/CO na secreção intestinal induzida pela toxina de *V. cholerae*. Relação peso/comprimento da alça intestinais de animais tratados com CORM-2 ou iCORM-2 (A), ou Hemina (B), seguido da inoculação da toxina de *V. cholerae*. *P<0,05 vs. grupo PBS; #P<0,05 vs. grupo toxina; Ψ P<0,05 vs. grupo Hemina (10 mg/kg). (N=6).



1.24 INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DE HO-1 POTENCIALIZA A SECREÇÃO DO FLUIDO INTESTINAL PROMOVIDA PELA TOXINA DE *V. cholerae*

A Figura 18A mostra que animais inoculados com toxina de *V. cholerae* (1 µg/alça; $0,091 \pm 0,008$ g/cm) apresenta um aumento significativo ($P < 0,05$) na relação peso/comprimento da alça, comparado ao grupo PBS ($0,056 \pm 0,003$ g/cm). Além disso, não houve diferença estatística com o tratamento com ZnPP (3 ou 10 mg/kg; $0,069 \pm 0,002$ g/cm; $0,104 \pm 0,015$ g/cm, respectivamente), comparado ao grupo da toxina de *V. cholerae*. Contudo, quando foi utilizada uma dose submáxima de toxina de *V. cholerae* (0,5 µg/alça; $0,069 \pm 0,003$ g/cm), animais tratados com ZnPP a 10 mg/kg tiveram um aumento significativo ($P < 0,05$) na relação peso/comprimento da alça ($0,104 \pm 0,015$ g/cm) (Figura 18B).

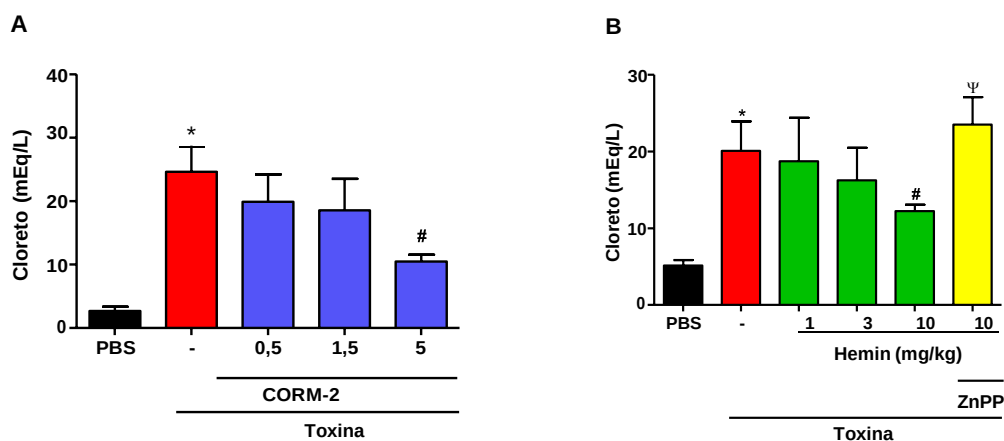
Figura 18 – Efeito da inibição farmacológica de HO-1 sobre a secreção intestinal induzida pela toxina de *V. cholerae*. Relação peso/comprimento da alça intestinal dos animais tratados com ZnPP e inoculação da toxina de *V. cholerae* a 1 µg/alça (A) ou 0,5 µg/alça (B). * $P < 0,05$ vs. grupo PBS; # $P < 0,05$ vs. grupo toxina (0,5 µg/alça). (N=6).



1.25 CO REDUZ A CONCENTRAÇÃO DE Cl^- NO FLUIDO INTESTINAL AUMENTADO PELA TOXINA DE *V. cholerae*

A Figuras 19A e 19B toxina de *V. cholerae* ($24,63 \pm 4,13$ mg/dL) aumentou significativamente ($P < 0,05$) a concentração de Cl^- no fluido intestinal, comparado ao grupo PBS ($2,66 \pm 0,68$ mg/dL). Contudo, em comparação ao grupo toxina de *V. cholerae*, os animais tratados com CORM-2 ($10,51 \pm 1,03$ mg/dL) ou Hemina ($12,23 \pm 0,82$ mg/dL) apresentaram uma redução significativa ($P < 0,05$) na concentração deste íon. Além disso, o efeito do Hemina (Figura 19B) foi revertido significativamente ($P < 0,05$) em animais pretratados com ZnPP ($23,50 \pm 3,57$ mg/dL).

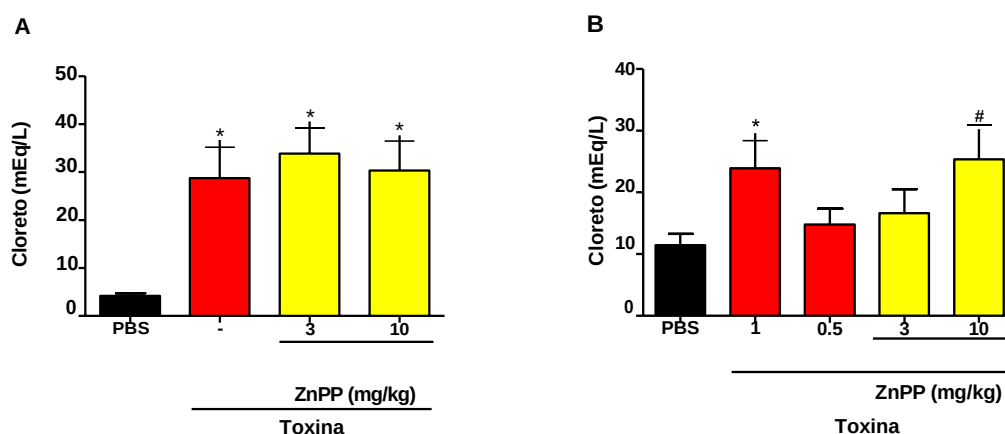
Figura 19 – Efeito da via HO-1/CO sobre a concentração de Cl^- no fluido intestinal. Concentração de Cl^- no fluido intestinal de animais tratados com CORM-2 (A), Hemina com ou sem ZnPP (B), seguido da inoculação da toxina de *V. cholerae* a $1 \mu\text{g}/\text{alça}$. * $P < 0,05$ vs. grupo PBS; # $P < 0,05$ vs. grupo toxina ($1 \mu\text{g}/\text{alça}$); $\Psi P < 0,05$ vs. grupo Hemina ($10 \text{ mg}/\text{kg}$). (N=6).



1.26 O BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DE HO-1 POTENCIALIZOU A SECREÇÃO DE CL⁻ NO FLUIDO INTESTINAL PROMOVIDA PELA TOXINA DE *V. cholerae*

A Figura 20A demonstra que o tratamento com ZnPP ($30,36 \pm 7,32$ mg/dL) não altera significativamente a concentração de Cl⁻ no fluido intestinal, comparado ao grupo toxina de *V. cholerae* a $1 \mu\text{g/alça}$ ($28,79 \pm 7,93$ mg/dL). No entanto, a concentração de Cl⁻ no fluido intestinal (Figura 20B) foi potencializada pelo ZnPP ($25,36 \pm 4,89$ mg/dL), quando utilizada uma dose submáxima de toxina de *V. cholerae* $0,5 \mu\text{g/alça}$ ($14,78 \pm 2,55$ mg/dL).

Figura 20 – Efeito do bloqueio farmacológico de HO-1 sobre a secreção de cloreto intestinal induzida pela toxina de *V. cholerae*. Concentração de Cl⁻ no fluido intestinal de animais tratados com ZnPP e inoculação da toxina de *V. cholerae* a $1 \mu\text{g/alça}$ (A) ou $0,5 \mu\text{g/alça}$ (B). *P<0,05 vs. grupo PBS; #P<0,05 vs. grupo toxina ($0,5 \mu\text{g/alça}$). (N=6).



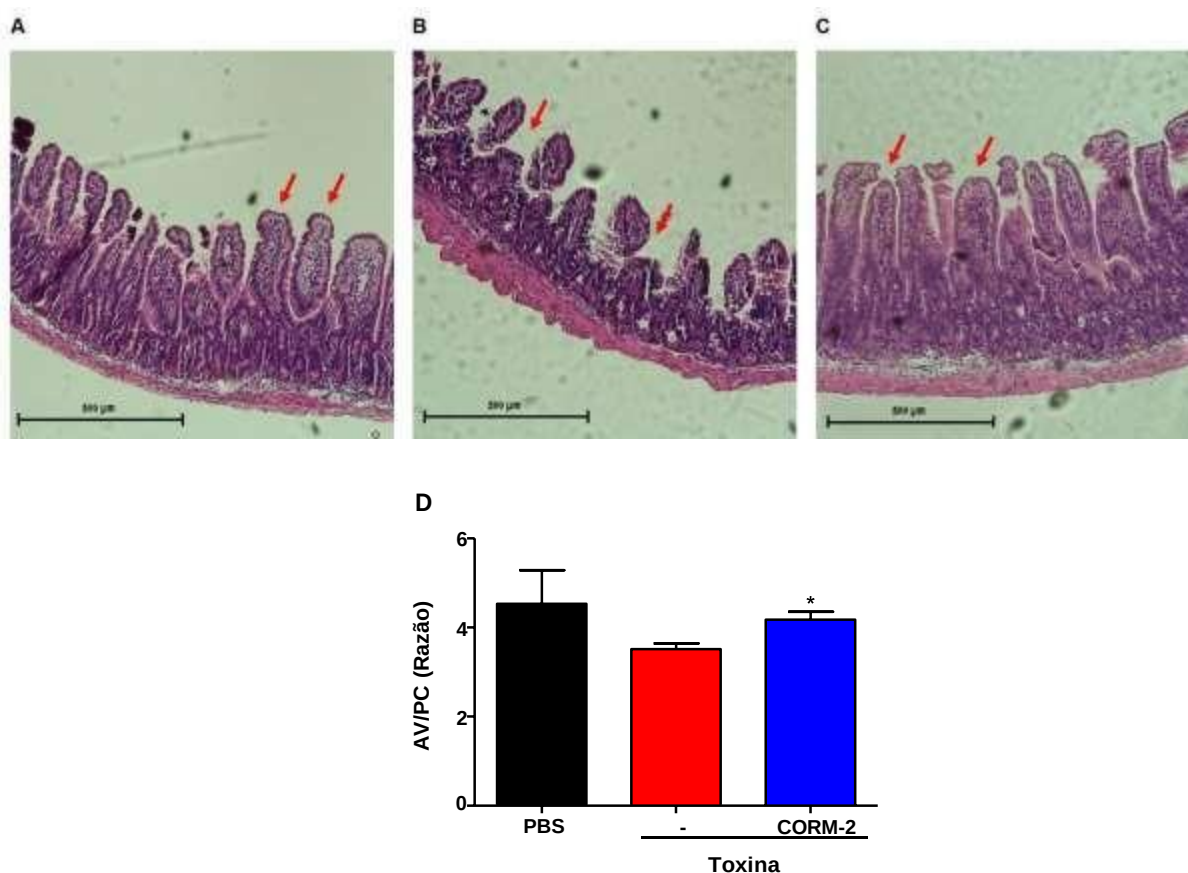
1.27 CO PROTEGE A ARQUITETURA DO EPITÉLIO INTESTINAL LOCAL ALTERADA PELA TOXINA DE *V. cholerae*

Na figura 21A, os animais do grupo PBS apresentaram o epitélio intestinal em condições normais, onde pode-se observar vilosidades e criptas intactas. No entanto, a inoculação da toxina de *V. cholerae* promoveu uma importante redução da altura das vilosidades e da profundidade das criptas (Figura 21B). Além disso, o tratamento com CORM-2 preservou as características morfológicas do tecido (Figura 21C).

Conforme a Figura 21D, a administração da toxina de *V. cholerae* diminuiu a razão vilo/cripta ($3,518 \pm 0,129 \mu\text{m}$), comparado ao grupo PBS ($4,530 \pm 0,758 \mu\text{m}$). No entanto, o tratamento com CORM-2 ($4,179 \pm 0,180 \mu\text{m}$) reverteu significativamente ($P < 0.05$) essa alteração.

Figura 21 – Efeito do CO sobre as alterações morfológicas promovida pela toxina de *V. cholerae*.

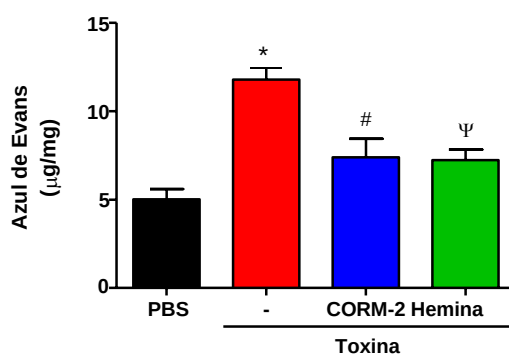
Fotomicrografia de animais que receberam PBS (A), inoculação da toxina de *V. cholerae* (B) e CORM-2 + toxina de *V. cholerae* (C). (D) razão vilosidade/cripta (AV/PC) * $P < 0,05$ vs. grupo toxina de *V. cholerae*. (N=6).



1.28 CO REDUZ A PERMEABILIDADE VASCULAR LOCAL ALTERADA PELA TOXINA DE *V. cholerae*

Considerando a perda da arquitetura do epitélio intestinal pode ser associada à microcirculação local alterada, analisamos a permeabilidade vascular no tecido intestinal. A Figura 22A demonstra que a toxina de *V. cholerae* ($11,80 \pm 0,65 \mu\text{g}$ de Evans Blue/mg de tecido) aumentou significativamente ($P < 0,05$) a permeabilidade vascular, comparado ao grupo PBS ($5,01 \pm 0,57 \mu\text{g}$ de Evans Blue/mg de tecido). Além disso, o efeito da toxina de *V. cholerae* foi prevenido em animais tratados com CORM-2 ($7,39 \pm 1,05 \mu\text{g}$ de tecido Evans Blue/mg) ou Hemina ($7,23 \pm 0,59 \mu\text{g}$ de Evans Blue/mg de tecido).

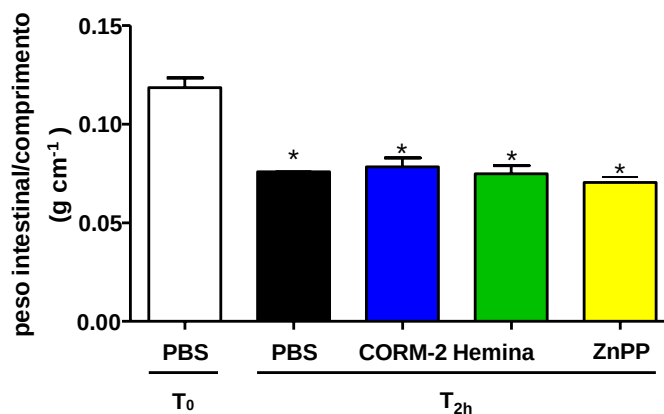
Figura 22 – Efeito do CO sobre as alterações da permeabilidade vascular promovida pela toxina de *V. cholerae* (1 μg). Fotomicrografia de animais que receberam PBS (A), inoculação da toxina de *V. cholerae* (B) e CORM-2 + toxina de *V. cholerae* (C). (D) razão vilosidade/crípta e (E) permeabilidade vascular intestinal. * $P < 0,05$ vs. grupo PBS; # $P < 0,05$ vs. grupo toxina. (N=6).



1.29 MODULADORES FARMACOLÓGICOS DA VIA HO-1/CO NÃO ALTERAM A ABSORÇÃO DE FLUIDO INTESTINAL

A figura 23 mostra o tempo basal T_0 ($0,118 \pm 0,005$ g/cm), e que no tempo T_{2h} , o grupo PBS ($0,074 \pm 0,003$ g/cm) apresentou absorção de fluido intestinal, que não foi alterada nos animais tratados com CORM-2 ($0,078 \pm 0,004$ g/cm), Hemina ($0,074 \pm 0,004$ g/cm) ou ZnPP ($0,070 \pm 0,002$ g/cm). Os veículos DMSO a 1% e NaOH a 1 mM também não apresentaram alteração na absorção intestinal.

Figura 23 – Efeito de moduladores da via HO-1/CO sobre a absorção de fluido intestinal. Relação peso/comprimento da alça intestinal de animais tratados com moduladores da via de sinalização de HO-1/CO. * $P < 0,05$ vs. tempo basal (T_0). (N=6).

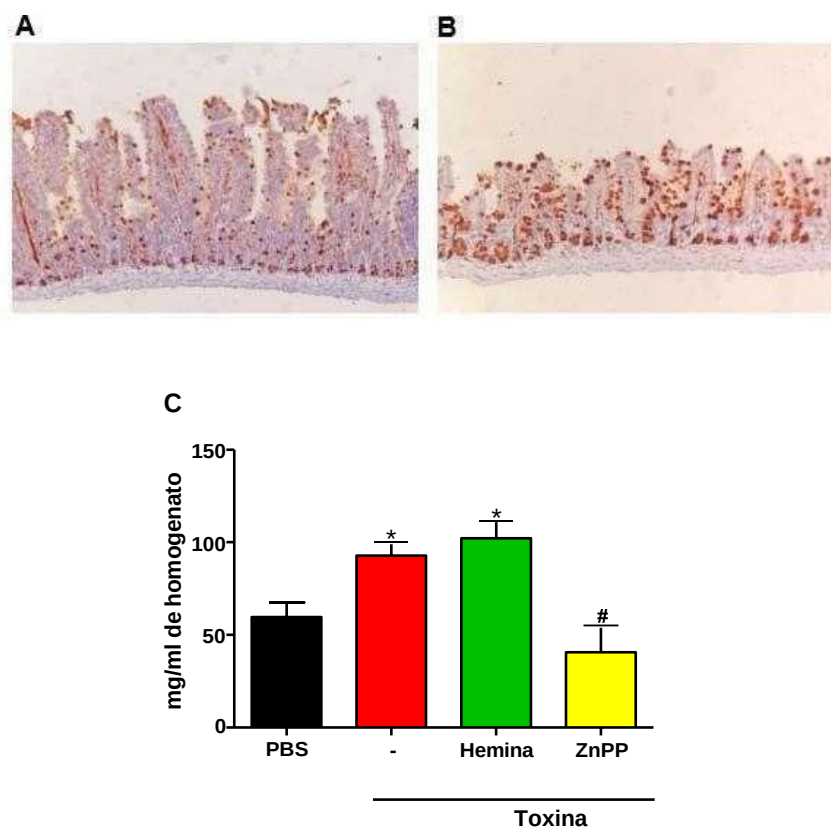


1.30 A TOXINA DE *V. cholerae* AUMENTA A IMUNOREATIVIDADE DE HO-1 E OS NÍVEIS DE BILIRRUBINA, UM PRODUTO DA DEGRADAÇÃO DA VIA HO-1/CO, NOTECIDO INTESTINAL

A análise imuno-histoquímica foi realizada para avaliar os efeitos da toxina de *V. cholerae* sobre a expressão de HO-1 intestinal. A Figura 24 mostra que a quantidade de células imunorreativas para HO-1 foi aumentada no epitélio intestinal de animais tratados com toxina de *V. cholerae* (Figura 24B), comparado ao grupo PBS (Figura 24A).

Na Figura 24C, os níveis de bilirrubina foram analisados como um marcador indireto da produção de CO, uma validação da sinalização mediada por HO-1. A inoculação da toxina de *V. cholerae* resultou em uma acumulação significativa ($P < 0,05$) de bilirrubina tecidual ($92,87 \pm 6,08$ mg/dL), comparado ao grupo PBS ($59,51 \pm 8,03$ mg/dL).

Figura 24 – Coloração imuno-histoquímica para HO-1 e níveis de bilirrubina de animais com inoculação de toxina de *V. cholerae*. Imunoreatividade para HO-1 intestinal de animais que receberam PBS (A) ou inoculação da toxina de *V. cholerae* (B). Níveis de bilirrubina (C). * $P < 0,05$ vs. grupo PBS; # $P < 0,05$ vs. grupo toxina. (N=6).

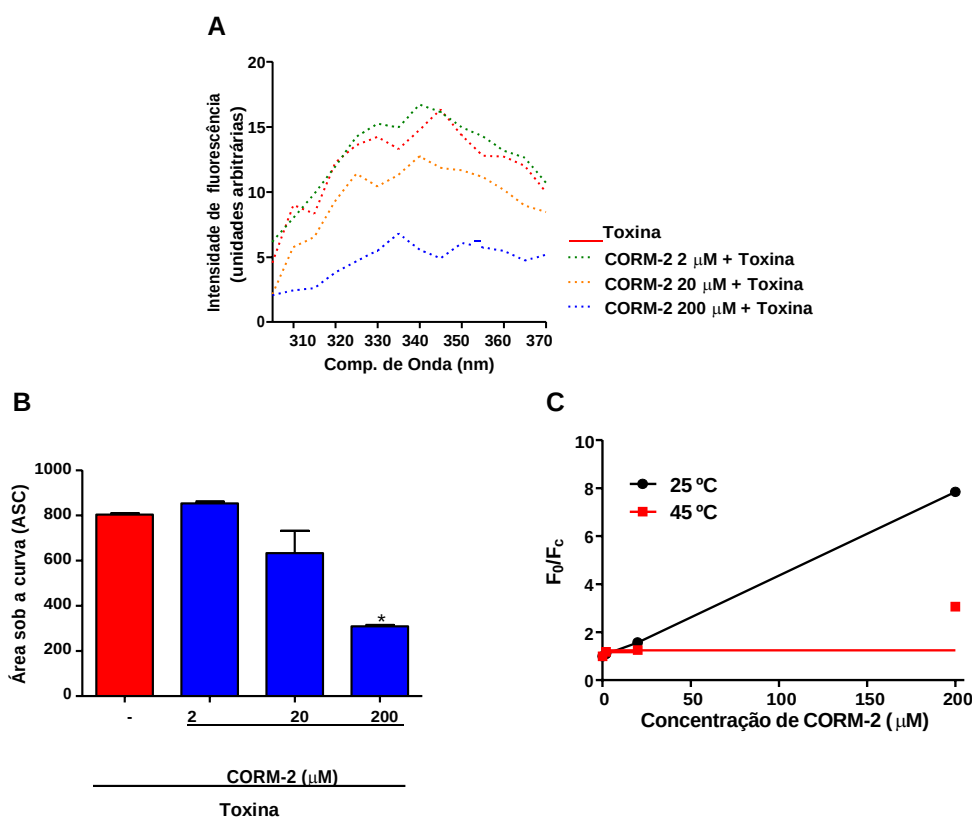


1.31 CO INTERAGE COM A TOXINA DE *V. CHOLERAE*

Uma análise de fluorescência foi realizada para investigar se o CO interage diretamente com a estrutura molecular da toxina de *V. cholerae*. Os resultados mostraram que a fluorescência emitida pela toxina incubada com o CORM-2 (200 μ M; $309,05 \pm 5,25$ ASC) foi significativamente ($P < 0,05$) menor quando comparado à fluorescência emitida apenas pela toxina ($805,0 \pm 4,35$ ASC) (Figuras 25A e B).

Para elucidar o mecanismo de interação entre a toxina de *V. cholerae* e o CO, foi elaborado um gráfico de Stern-Volmer para duas temperaturas (25 e 45°C) (Figura 25C). O perfil linear do gráfico indica que ocorreu apenas um tipo de perda de fluorescência da toxina na presença do CO, enquanto a inclinação decrescente com o aumento da temperatura sugere que o CO interage de maneira estática à toxina de *V. cholerae*, com a formação de um complexo.

Figura 25 – Interação molecular do CO com a toxina de *V. cholerae*. Intensidade de fluorescência emitida pela toxina de *V. cholerae* (3 μ M) incubada ou não com CORM-2 (2 μ M; 20 μ M e 200 μ M) (A). (B) Área sob a curva dos dados de intensidade de fluorescência. (C) Gráfico de Stern-Volmer com duas temperaturas distintas (25°C e 45°C). * $P < 0,05$ vs. grupo toxina de *V. cholerae*. (N=6).



DISCUSSÃO

No presente estudo, nós demonstramos que a via HO-1/CO tem um papel importante na regulação da diarreia provocada pela toxina de *V. cholerae* em camundongos. A modulação farmacológica com Hemina (um indutor de HO-1) ou CORM-2 (um doador de CO) teve um efeito significativo na redução da secreção do fluido intestinal e no efluxo luminal de íons Cl^- induzidos pela toxina de *V. cholerae*. Estes dados foram confirmados pela administração de ZnPP (um inibidor de HO-1), que além de promover reversão dos efeitos protetores da Hemina sobre a diarreia colérica, potencializou a secreção de fluido intestinal e Cl^- . Além disso, a análise da morfometria do epitélio intestinal mostrou que o CO protegeu a arquitetura das vilosidades e criptas alteradas pela toxina de *V. cholerae*, assim como reduziu a permeabilidade vascular local. A investigação deste mecanismo elucidou que o CO interage diretamente com a toxina de *V. cholerae*, inibindo seus efeitos lesivos sobre as células intestinais.

A literatura mostra que os mediadores gasosos, tais como o óxido nítrico (NO), o sulfeto de hidrogênio (H_2S) e o CO atuam em diversas ações fisiológicas no sistema digestório (KORBUT et al., 2020). Nesta perspectiva, o CO surge como um dos mais atrativos gasotransmissores terapêuticos devido à sua maior estabilidade e distribuição para tecidos mais distantes, além de não se comportar como um radical livre. O CO demonstrou uma ação citoprotetora do epitélio escamoso do esôfago contra os danos causados pela esofagite de refluxo (MAGIEROWSKA et al., 2020) e a via HO-1/CO mostrou um papel antioxidante contra os danos gástricos induzidos pelo alendronato (COSTA et al., 2013). Na porção mais distal do trato gastrointestinal, usando um modelo experimental de doença inflamatória intestinal (DII), TAKAGI e colaboradores (2020) mostraram que o CO inibiu a inflamação intestinal e promoveu a reestruturação epitelial da mucosa colônica (TAKAGI et al., 2020).

Além disso, os canais iônicos parecem ser um alvo potencial para a ação do CO nas membranas biológicas, influenciando no controle do equilíbrio eletrolítico e osmótico. Takasuka et al. (2011) demonstraram que o CO pode modular a secreção de HCO_3^- no lúmen intestinal e, desta forma, protege as células duodenais contra lesões causadas pelo conteúdo gástrico (TAKASUKA et al., 2011). Além disso, recentemente, em um estudo *in vitro* realizado por Rodrat et al. (2020), concluiu que o CO poderia inibir o fluxo de corrente iônica através da interação com o canal CFTR

(RODRAT et al., 2020), foi identificado um papel importante do CO no transporte de íons Cl^- .

Em conjunto, estes dados sugerem que o CO pode ter uma aplicação potencial no tratamento da diarreia induzida pela toxina de *V. cholerae*. Curiosamente, um efeito antissecretório contra a diarreia colérica foi observado a partir de doadores exógenos de H_2S , outro importante gasotransmissor (SOUZA et al., 2018; SOUZA et al., 2021), o que reforça ainda mais a importância da investigação do papel dos mediadores gasosos, e entre eles o CO, na modulação do efeito provocado pela toxina de *V. cholerae*.

Nossos dados mostraram que a modulação farmacológica da via HO-1/CO, por meio de um indutor da HO-1 ou um doador de CO, reduziram a secreção de fluido intestinal associada à diarreia por toxina de *V. cholerae*. Esse resultado pode estar diretamente relacionado a uma regulação do transporte epitelial intestinal de eletrólitos, um parâmetro imprescindível para determinação da composição e do movimento do fluido luminal. O transporte coordenado dos íons Na^+ , K^+ , Cl^- e HCO_3^- é mantido por moléculas como Na^+/K^+ -ATPase, canal CFTR e permutadores de ânions, respectivamente (VENKATASUBRAMANIAN et al., 2010). Contudo, a toxina de *V. cholerae* interfere especialmente na secreção de Cl^- , levando a um aumento no efluxo de Na^+ e água para o lúmen intestinal (VISWANATHAN et al., 2009). Nessa linha, nossos achados também demonstraram que o CO reduziu a concentração de Cl^- luminal, contribuindo para sustentar sua provável ação antissecretória contra a diarreia colérica. Esta conjectura sugere que o CO é capaz de modular o mecanismo de secreção aguda intestinal e poderá vir a ser uma excelente ferramenta na terapia da cólera.

A fim de confirmar que esse efeito antissecretório está intrinsecamente ligado ao CO, foi investigado os efeitos da inibição farmacológica da via HO-1/CO. Devido à sua semelhança estrutural com o grupo heme da hemoglobina, o ZnPP é um conhecido inibidor da HO-1 por competir pelo sítio ativo da enzima e bloquear seu efeito fisiológico, levando à redução da quantidade dos produtos da via, incluindo o CO (KAPPAS et al., 1986). Nossos resultados mostraram que a administração de ZnPP reverteu o efeito protetor da Hemina e potencializou o efeito secretório causado pela toxina de *V. cholerae*, com consequente aumento da concentração de Cl^- no fluido intestinal. Estes resultados corroboram com a literatura, que mostra que o ZnPP foi capaz de inibir o efeito protetor da HO-1 em modelos animais de inflamação

colônica (WANG et al., 2001) e dano gástrico induzido por ácido acetilsalicílico (ASA) (MAGIEROWSKI et al., 2016), aumentando a gravidade das lesões. Desta forma, nossos resultados sugerem um papel potencial do CO na proteção do epitélio intestinal contra a diarreia secretora induzida pela toxina de *V. cholerae*.

O próximo passo do nosso estudo foi avaliar se o efeito antissecretório promovido pelo CO envolvia alterações na absorção intestinal. Esta investigação é importante uma vez que diferentes enterotoxinas, incluindo a produzida por *V. cholerae*, são responsáveis por promover inibição da reabsorção de Na^+ e Cl^- , contribuindo para a acumulação de fluido intestinal e diarreia (YUN et al., 1997). Embora estudos indiquem que o CO pode interferir no transporte de Na^+ em alguns tecidos epiteliais, a sua ação na absorção de Na^+ no intestino ainda é pouco conhecida (ALTHAUS, 2012). Assim, nossos dados não mostraram quaisquer alterações na função absorptiva intestinal de camundongos tratados com CORM-2, Hemina, ZnPP ou seus respectivos veículos. Com isso, pode-se inferir que o efeito protetor mediado pelo CO contra a diarreia colérica não é secundário a um aumento da absorção intestinal, sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidos neste processo.

Corroborando com a literatura, nossas análises histopatológicas evidenciaram que a toxina de *V. cholerae* foi capaz de alterar a arquitetura do epitélio intestinal, resultando diretamente no encurtamento das vilosidades e na redução da profundidade das criptas. Esses achados são apoiados por estudos anteriores que mostraram que a sinalização intracelular mediada pela toxina de *V. cholerae* leva a um aumento dos níveis de AMPc e interfere com o tráfego intracelular de componentes críticos das junções aderentes, causando perturbação da barreira intestinal (IRETON et al., 2018). Desta forma, este mecanismo é fundamental para o efluxo paracelular de íons e água para a luz intestinal, contribuindo para o agravamento da diarreia. Por outro lado, nossos resultados também demonstraram que a arquitetura do epitélio intestinal foi restaurada após tratamento com CORM-2, um doador de CO, possibilitando a manutenção da organização estrutural das vilosidades e criptas. Esta descoberta demonstra que o CO é de suma importância para a proteção do epitélio intestinal contra a perda da arquitetura induzida pela toxina de *V. cholerae*. Corroborando com nossos dados, foi observado que a via HO-1/CO é fundamental para proteção da mucosa ileal contra os efeitos lesivos provocados pela toxina de *Clostridium difficile* (MEDEIROS et al, 2011; INUI et al., 2011).

Ainda nesta perspectiva, estudos relataram que as toxinas produzidas por *C.*

difficile e *Escherichia coli* podem aumentar a permeabilidade vascular local, promovendo aumento da pressão intravascular, dilatação dos vasos e angiogênese (HUANG et al., 2018; BRIGHAM et al., 1979). Nessa linha, nossos dados demonstraram que a toxina de *V. cholerae* promoveu aumento da permeabilidade dos capilares intestinais, evidenciada pela concentração aumentada do corante Azul de Evans tecidual. Estes dados sugerem que a desestabilização da barreira vascular pode contribuir ainda mais para a patogênese da cólera, uma vez que permite a saída de plasma e proteínas em direção ao lúmen intestinal. A literatura também mostra que a via da HO-1/CO é capaz de modular parâmetros relacionados ao processo inflamatório que, eventualmente, poderiam contribuir para a injúria vascular (IWATA et al., 2020), reduzindo a permeabilidade endotelial e inibindo a saída de plasma e o edema (ALCARAZ et al., 2003). A partir disso, no presente estudo também foi demonstrado que a administração de Hemina ou CORM-2 preveniu as alterações na permeabilidade vascular local causadas pela toxina de *V. cholerae*, reforçando o papel fundamental do CO na proteção da mucosa intestinal.

Em seguida, nosso trabalho investigou se a inoculação da toxina de *V. cholerae* altera a expressão de HO-1 intestinal. Esta enzima é endogenamente expressa a níveis basais relativamente baixos em vários tecidos de mamíferos, mas pode ser regulada positivamente no TGI devido à exposição contínua a agentes estressores, tais como antígenos alimentares, microrganismos e fármacos (PUENTES-PARDO et al., 2020). Neste contexto, dados na literatura mostram que o etanol (GOMES et al., 2010) e o alendronato (COSTA et al., 2013) podem causar injúria gástrica, enquanto o dextran sulfato de sódio (DSS) e o ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) são importantes modelos experimentais de colite em roedores (UDDIN et al., 2013; WANG et al., 2001). Em comum, estas lesões gastrointestinais são acompanhadas de um aumento da imunorreatividade para HO-1, o que leva a um aumento concomitante de CO celular. Esta descoberta pode ser correlacionada com o efeito protetor desempenhado pelo CO, indicando que a via HO-1/CO atua como mecanismo de defesa da mucosa gastrointestinal.

Os resultados do nosso trabalho mostraram que a inoculação da toxina de *V. cholerae* promoveu um aumento da imunorreatividade para HO-1 nas células epiteliais intestinais, sugerindo produção aumentada de CO e possivelmente um mecanismo de proteção intestinal (HEGAZI et al., 2005). Corroborando com nossos achados de potencialização da secreção de fluido intestinal e efluxo de Cl⁻ promovida pelo ZnPP

sobre a diarreia colérica, especulamos que a resposta tecidual aos efeitos lesivos da toxina de *V. cholerae* possibilitou a liberação endógena de baixos níveis de CO e que não foram suficientes para proteção eficaz do epitélio intestinal.

Considerando que a sinalização mediada por HO-1 resulta na produção equimolar de CO e biliverdina, e que este pigmento é convertido em bilirrubina (RYTER, 2019), nós avaliamos os níveis de bilirrubina no tecido intestinal após a inoculação da toxina de *V. cholerae*, baseando-se no pressuposto do aumento da concentração intestinal de bilirrubina poderia sugerir um aumento concomitante do CO endógeno (COSTA et al, 2013; GOMES et al., 2010). Dessa forma, nossos resultados mostraram que a concentração de bilirrubina no tecido intestinal aumentou significativamente após a inoculação da toxina de *V. cholerae*, sugerindo que a via HO-1/CO foi estimulada pela toxina e resultou em aumento dos seus produtos, incluindo o CO. Portanto, esse dado reforça a hipótese de que a via HO-1/CO pode atuar como um mecanismo fisiológico de proteção e garantia da integridade da mucosa intestinal.

Para elucidar o possível mecanismo de ação do CO sobre a diarreia induzida pela toxina de *V. cholerae*, nós hipotetizamos que o CO pode interagir diretamente com estrutura proteica da toxina. Para comprovar essa possibilidade, foi empregada a técnica de espectroscopia de fluorescência, visto a extinção de fluorescência é um dos processos amplamente utilizados para estudar as interações entre biomoléculas e ligantes (LAKOWICZ, 2006). Esta técnica se baseia na transição de moléculas com ligações conjugadas de um estado eletrônico excitado para um estado basal, emitindo-se, desse modo, luz na forma de fluorescência (MOCZ; ROSS; 2013). Curiosamente, proteínas, como a toxina de *V. cholerae*, possuem fluorescência intrínseca por parte de alguns aminoácidos de sua composição, como tirosina, fenilalanina e, principalmente, o triptofano. De acordo com estudos realizados por Mestrallet e colaboradores (1984), a emissão máxima de fluorescência do triptofano da toxina de *V. cholerae* é encontrada em aproximadamente 343 nm (MESTRALLET et al., 1984), o que corrobora com os resultados aqui demonstrados, cujo máximo de emissão de fluorescência foi observada a 345 nm. Além disso, a intensidade de fluorescência emitida pela toxina de *V. cholerae* diminuiu gradativamente quando a concentração de CORM-2 foi aumentada, indicando possíveis interação molecular com o CO.

Adicionalmente, foi utilizada a equação de Stern-Volmer para explorar a

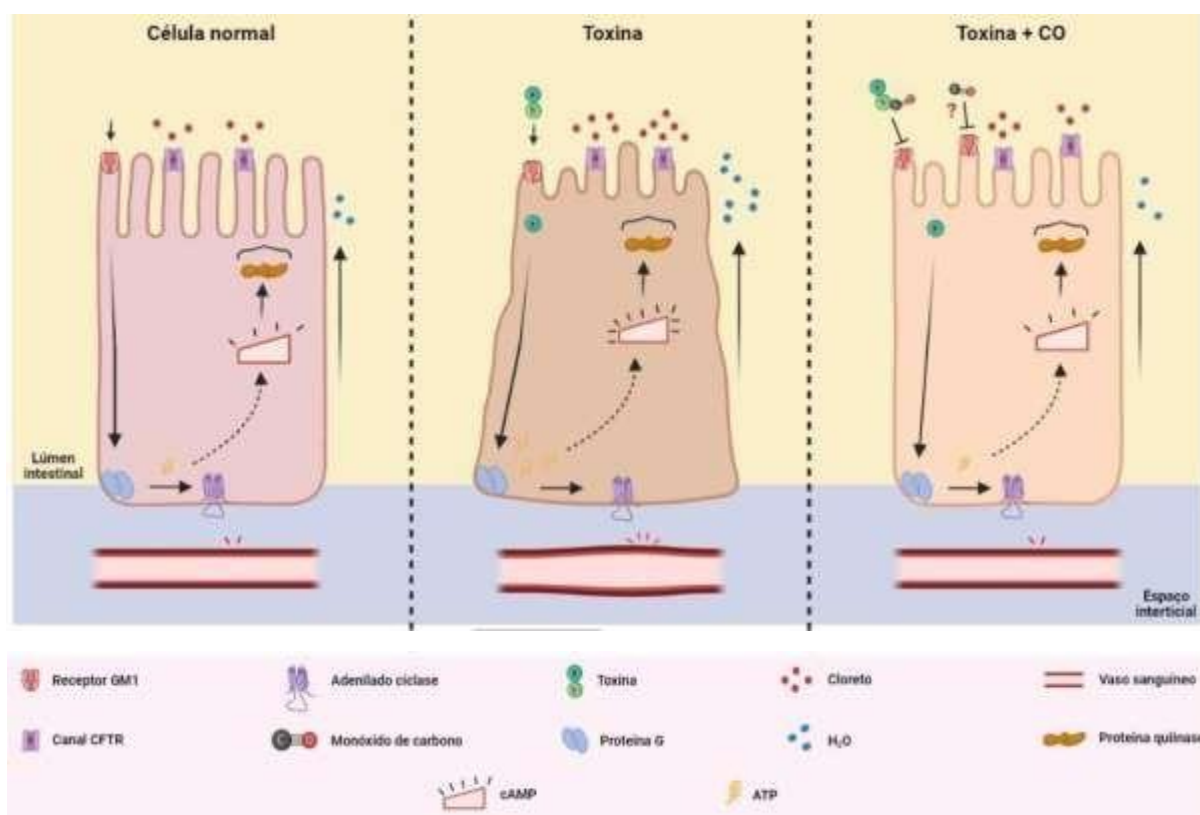
cinética de extinção de fluorescência emitida pela toxina de *V. cholerae* (HASSAN et al., 2020). Esta fórmula matemática se baseia na relação entre a intensidade de fluorescência emitida por determinada molécula (fluoróforo), com e sem a presença de um inibidor, para determinar o tipo de interação envolvida (MOCZ; ROSS; 2013). Nesta perspectiva, foi evidenciado que o CO interage de maneira estática com a toxina de *V. cholerae*, com consequente formação de complexos. Este resultado foi comprovado pela dependência da interação em função da temperatura, visto que a intensidade de fluorescência da toxina incubada com o CORM-2 foi maior a 45°C, quando comparado a 25°C, o que simboliza a dissociação dos complexos a partir da elevação da temperatura. Resultados similares também evidenciados por Sarwar et al. (2017), nos quais foi demonstrada a interação de nanopartículas de óxido de zinco com a toxina de *V. cholerae* (SARWAR et al., 2017). Baseado em evidências de Rodrat e colaboradores (2020), onde mostraram um efeito inibitório do CO sobre o canal CFTR em células epiteliais mamárias, em nosso estudo não descartamos inibição direta desse canal no epitélio intestinal. Entretanto, são necessários novos estudos para elucidar essa hipótese.

Em suma, nosso trabalho corrobora com a literatura e mostra que o CO é uma das moléculas mais promissoras para fins terapêuticos em desordens digestivas. Nossos dados demonstraram que o CO, tem efeito antissecretório como forma de proteção do epitélio intestinal contra injúrias causadas pela toxina de *V. cholerae*, sugerindo um novo efeito benéfico e perspectivas de tratamento futuro desta condição.

CONCLUSÕES

A via HO-1/CO é fundamental para proteção contra a diarreia aguda secretória induzida pela toxina de *V. cholerae*, inibindo a secreção de fluidos e o efluxo Cl^- na luz intestinal. O CO também preservou a arquitetura do epitélio intestinal e inibiu o aumento da permeabilidade vascular causada pela toxina de *V. cholerae*. Os dados também sugerem que o efeito antissecretório mediado pelo CO não se deve a uma maior absorção intestinal, e provavelmente ocorre por um mecanismo dependente da ligação molecular com a toxina. Assim, os nossos resultados sugerem perspectivas de utilização do CO como instrumento terapêutico para a diarreia colérica.

Figura 26. Modelo hipotético do efeito antissecretório do CO e sua possível ligação molecular com a toxina de *V. cholerae*.



Fonte: Autor (2022).

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, N. G. et al. The physiological significance of heme oxygenase. **The International journal of biochemistry**, v. 20, n. 6, p. 543–558, 1988.
- AKRIMAJIRACHOOTE, N. et al. Inhibition of CFTR-mediated intestinal chloride secretion by a fungus-derived arthroposide A: Mechanism of action and anti-diarrheal efficacy. **European Journal of Pharmacology**, v. 885, 15 out. 2020.
- ALCARAZ, M.; FERNANDEZ, P.; GUILLEN, M. Anti-Inflammatory Actions of the Heme Oxygenase-1 Pathway. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 30, p. 2541–2551, 23 mar. 2005.
- ALTHAUS, M. et al. Carbon monoxide rapidly impairs alveolar fluid clearance by inhibiting epithelial sodium channels. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 41, n. 6, p. 639–650, 1 dez. 2009.
- ALTHAUS, M. Gasotransmitters: Novel Regulators of Epithelial Na⁺ Transport? **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. 6, p. 639–650, dez. 2012.
- ALVARENGA, E. M. et al. Carvacryl acetate, a novel semisynthetic monoterpene ester, binds to the TRPA1 receptor and is effective in attenuating irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 69, n. 12, p. 1773–1785, 1 dez. 2017.
- BASU, I.; MUKHOPADHYAY, C. Insights into binding of cholera toxin to GM1 containing membrane. **Langmuir**, v. 30, n. 50, p. 15244–15252, 23 dez. 2014.
- BELCHER, J. D. et al. Heme oxygenase-1 is a modulator of inflammation and vaso-occlusion in transgenic sickle mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 3, p. 808–816, 1 mar. 2006.
- BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual Integrado de Vigilância Epidemiológica da Cólera. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2008.
- BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças diarreicas agudas (DDA). **Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dda>.
- BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Cólera. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/colera>.
- BRIGHAM, K. L.; BOWERS, R. E.; HAYNES, J. Increased sheep lung vascular permeability caused by Escherichia coli endotoxin. **Circulation Research**, v. 45, n. 2, p. 292–297, 1979.
- BROUARD, S. et al. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF- κ B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor- α -mediated apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 20, p. 17950–17961, 17 mai. 2002.

- CHAN, M. V.; WALLACE, J. L. Hydrogen sulfide-based therapeutics and gastrointestinal diseases: Translating physiology to treatments. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 305, n. 7, 1 out. 2013.
- CHENG, S. X. Calcium-sensing receptor: A new target for therapy of diarrhea. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 9, p. 2711-2724, 3 mar. 2016.
- CHEUVRONT, S. N. et al. Are oral rehydration solutions optimized for treating diarrhea? **Nutrition and Health**, v. 27, n. 4, p. 461–465, 2021.
- CHOWDHURY, F. et al. Diagnosis, Management, and Future Control of Cholera. **Clinical Microbiology Reviews**, 21 jun. 2022.
- CLEMENS, J. D. et al. Cholera. **The Lancet**, v. 390, n. 10101, p. 1539–1549, 2017.
- COCEANI, F.; KELSEY, L.; SEIDLITZ, E. Carbon monoxide-induced relaxation of the ductus arteriosus in the lamb: Evidence against the prime role of guanylyl cyclase. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, n. 7, p. 1689–1696, 1996.
- COSTA, N. R. D. et al. Role of soluble guanylate cyclase activation in the gastroprotective effect of the HO-1/CO pathway against alendronate-induced gastric damage in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 700, n. 1–3, p. 51–59, 2013.
- CUATRECASAS, P. Gangliosides and Membrane Receptors for Cholera Toxin. **Biochemistry**, v. 12, n. 18, p. 3558–3566, 1973.
- DAHL, C. A.; YAMADA, T. Global health inequity: Scientific challenges remain but can be solved. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1242-1243, 1 abr. 2008.
- DALLAS, M. L. et al. Carbon monoxide protects against oxidant-induced apoptosis via inhibition of Kv2.1. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 5, p. 1519–1530, 2011.
- DANIELAK, A. et al. Gaseous Mediators as a Key Molecular Targets for the Development of Gastrointestinal-Safe Anti-Inflammatory Pharmacology. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 29 abr. 2021.
- DAS, S.; JAYARATNE, R.; BARRETT, K. E. The Role of Ion Transporters in the Pathophysiology of Infectious Diarrhea. **Cmgh**, v. 6, n. 1, p. 33–45, 2018.
- DE ARAÚJO, S. et al. AMPK activation promotes gastroprotection through mutual interaction with the gaseous mediators H₂S, NO, and CO. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 78, p. 60–71, 2018.
- DEEN, J.; MENGEL, M. A.; CLEMENS, J. D. Epidemiology of cholera. **Vaccine**, v. 38, p. A31–A40, 2020.
- DOI, K. et al. Induction of haem oxygenase-1 by nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. **British Journal of Cancer**, v. 80, n. 12, p. 1945–1954, 1999.
- EDUARDO, M. B.; KATSUYA, E. M. Situação da cólera no mundo Situation of cholera in the world. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 15, n. 174, p. 13–24, 2018.

ELLIOTT, E. J. Acute gastroenteritis in children. **British Medical Journal**, v. 334, n. 7583, p. 35, 1 jan. 2007.

FARRUGIA, G.; SZURSZEWSKI, J. H. Carbon Monoxide, Hydrogen Sulfide, and Nitric Oxide as Signaling Molecules in the Gastrointestinal Tract. **Gastroenterology**, v. 147, n. 2, p. 303–313, ago. 2014.

FIELD, M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. **The Journal of clinical investigation**, v. 111, n. 7, p. 931–943, 1 abr. 2003.

FLACH, C. F. et al. Differential expression of intestinal membrane transporters in cholera patients. **FEBS Letters**, v. 581, n. 17, p. 3183–3188, 2007.

FLOREZ, I. D.; NIÑO-SERNA, L. F.; BELTRÁN-ARROYAVE, C. P. Acute Infectious Diarrhea and Gastroenteritis in Children. **Current Infectious Disease Reports**, v. 22, n. 2, 2020.

FORESTI, R.; BANI-HANI, M. G.; MOTTERLINI, R. Use of carbon monoxide as a therapeutic agent: promises and challenges. **Intensive care medicine**, v. 34, n. 4, p. 649–658, abr. 2008.

FUJITA, T. et al. Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis. **Nature Medicine**, v. 7, n. 5, p. 598–604, maio 2001.

GIBBONS, S. J. et al. Carbon monoxide in gastrointestinal physiology and its potential in therapeutics. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 38, n. 7, p. 689, out. 2013.

GIBBONS, S. J.; FARRUGIA, G. The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. **The Journal of Physiology**, v. 556, n. 2, p. 325–336, abr. 2004.

GOMES, A. S. et al. Gastroprotective effect of heme-oxygenase 1/biliverdin/CO pathway in ethanol-induced gastric damage in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 642, n. 1–3, p. 140–145, 2010.

GRIGGS, D. W. et al. Pharmacologic comparison of clinical neutral endopeptidase inhibitors in a rat model of acute secretory diarrheas. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 357, n. 2, p. 423–431, 1 mai. 2016.

HARRIS, J. et al. NIH Public Access - Cholera. **The Lancet**, v. 379, n. 9835, p. 22, 2012.

HASAN, S. M. T. et al. Taking care of a diarrhea epidemic in an urban hospital in Bangladesh: Appraisal of putative causes, presentation, management, and deaths averted. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 11, 15 nov. 2021.

HASSAN, S. A. E. M. et al. Spectrofluorimetric study on fluorescence quenching of tyrosine and l-tryptophan by the aniracetam cognition enhancer drug: quenching mechanism using Stern–Volmer and double-log plots. **Luminescence**, v. 35, n. 5, p. 728–737, 2020.

HAYASHI, S. et al. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: Role of bilirubin generated by the enzyme. **Circulation Research**, v. 85, n. 8, p. 663–671, 15 out. 1999.

HEGAZI, R. A. F. et al. Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase 1–dependent pathway. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 12, p. 1703–1713, 19 dez. 2005.

HOQUE, K. M.; BINDER, H. J. Zinc in the Treatment of Acute Diarrhea: Current Status and Assessment. **Gastroenterology**, v. 130, n. 7, p. 2201–2205, 2006.

HUANG, J. et al. Clostridium difficile toxins induce VEGF-A and vascular permeability to promote disease pathogenesis. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 269–279, 2019.

INUI, M. et al. Protective Roles of CX3CR1-Mediated Signals in Toxin A-Induced Enteritis through the Induction of Heme Oxygenase-1 Expression. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 1, p. 423–431, 1 jan. 2011.

IRETON, K.; VAN NGO, H.; BHALLA, M. Interaction of microbial pathogens with host exocytic pathways. **Cellular Microbiology**, v. 20, n. 8, 20 ago. 2018.

IWATA, M. et al. The protective role of localized nitric oxide production during inflammation may be mediated by the heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 23, 1 set. 2020.

KAPPAS, A.; DRUMMOND, G. S. Control of heme metabolism with synthetic metalloporphyrins. **Journal of Clinical Investigation**, v. 77, n. 2, p. 335–339, 1986.

KATADA, K. et al. Carbon Monoxide Liberated from CO-Releasing Molecule (CORM-2) Attenuates Ischemia/Reperfusion (I/R)-Induced Inflammation in the Small Intestine. **Inflammation**, v. 33, n. 2, p. 92–100, 20 abr. 2010.

KORBUT, E.; BRZOZOWSKI, T.; MAGIEROWSKI, M. Carbon Monoxide Being Hydrogen Sulfide and Nitric Oxide Molecular Sibling, as Endogenous and Exogenous Modulator of Oxidative Stress and Antioxidative Mechanisms in the Digestive System. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–14, 15 abr. 2020.

LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. **Springer**, p. 1–954, 2006.

MAGIEROWSKA, K. et al. Evidence for Cytoprotective Effect of Carbon Monoxide Donor in the Development of Acute Esophagitis Leading to Acute Esophageal Epithelium Lesions. **Cells**, v. 9, n. 5, p. 1203, 12 mai. 2020.

MAGIEROWSKA, K.; BRZOZOWSKI, T.; MAGIEROWSKI, M. Emerging role of carbon monoxide in regulation of cellular pathways and in the maintenance of gastric mucosal integrity. **Pharmacological Research**, v. 129, p. 56–64, 2018.

MAGIEROWSKI, M. et al. Interaction between endogenous carbon monoxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastroprotection against acute aspirin-induced gastric damage. **Pharmacological Research**, v. 114, p. 235–250, 1 dez. 2016.

MCCOUBREY, W. K.; HUANG, T. J.; MAINES, M. D. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. **European journal of biochemistry**, v. 247, n. 2, p. 725–732, 1997.

MEDEIROS, C. A. et al. Role of the haem oxygenase/carbon monoxide pathway in Clostridium difficile toxin A-induced enteritis in mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 8, p. 1146–1154, 2011.

MESTRALLET, M. G. et al. Tryptophan fluorescence properties of cholera toxin upon interacting with ganglioside GD1b. **Journal of Neuroscience Research**, v. 12, n. 2–3, p. 335–341, 1984.

MOCZ, G.; ROSS, J. A. Fluorescence techniques in analysis of protein-ligand interactions. **Methods in Molecular Biology**, v. 1008, p. 169-210, 2013.

MOON, C. et al. Drug-induced secretory diarrhea: A role for CFTR. **Pharmacological Research**, v. 102, p. 107-112, 1 dez. 2015.

MUANPRASAT, C.; CHATSUDTHIPONG, V. Cholera: Pathophysiology and emerging therapeutic targets. **Future Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 7, p. 781-798, 2013.

NADEEM, A. et al. Protein-lipid interaction at low pH induces oligomerization of the MakA cytotoxin from Vibrio cholerae. **eLife**, v. 11, p. 1–27, 2022.

OLAS, B. Carbon monoxide is not always a poison gas for human organism: Physiological and pharmacological features of CO. **Chemico-Biological Interactions**, v. 222, p. 37-43, 5 out. 2014.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, **Cholera Fact Sheet**, n. 107, 2015.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Cholera**, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cholera>>.

OTTERBEIN, L. E. et al. Heme oxygenase-1: Unleashing the protective properties of heme. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 8, p. 449-455, 1 ago. 2003.

PIANTADOSI, C. A. Biological chemistry of carbon monoxide. **Antioxidants & redox signaling**, v. 4, n. 2, p. 259–270, 2002.

PONKA, P. Cell Biology of Heme. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 318, n. 4, p. 241, out. 1999.

PUNTES-PARDO, J. D. et al. Heme Oxygenase-1 in Gastrointestinal Tract Health and Disease. **Antioxidants**, v. 9, n. 12, p. 1214, 2 dez. 2020.

RADU, M.; CHERNOFF, J. An in vivo assay to test blood vessel permeability. **Journal of visualized experiments**, n. 73, 2013.

RODRAT, M. et al. Carbon monoxide-releasing molecules inhibit the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 319, n. 6, p. L997–L1009, 1 dez. 2020.

RYTER, S. W. Heme oxygenase-1/carbon monoxide as modulators of autophagy and inflammation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 678, 2019.

SACK, D. A. et al. **Cholera**. Lancet, v. 363, n. 9404, p. 223-233, 17 jan. 2004.

SÁNCHEZ, J.; HOLMGREN, J. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 9, p. 1347–1360, 2008.

SARWAR, S. et al. Zinc oxide nanoparticles provide anti-cholera activity by disrupting the interaction of cholera toxin with the human GM1 receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 44, p. 18303–18311, 2017.

SINAN - SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO. Cólera. **Sistema de Vigilância em Saúde**, 2016. Disponível em: <http://www.portalsinan.saude.gov.br/colera>.

SOUSA, F. B. M. et al. H₂S is a key antisecretory molecule against cholera toxin-induced diarrhoea in mice: Evidence for non-involvement of the AC/cAMP/PKA pathway and AMPK. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 76, p. 152–163, 2018.

SOUSA, F. B. M. et al. A comprehensive review of therapeutic approaches available for the treatment of cholera. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 12, p. 1715–1731, 1 dez. 2020.

SOUSA, F. B. M. et al. Mechanism of preservation of the intestinal mucosa architecture and NF- κ B/PGE₂ reduction by hydrogen sulfide on cholera toxin-induced diarrhea in mice. **Life Sciences**, v. 284, 2021.

STANFIELD, C. L. **Fisiologia Humana**. 5ª Edição. São Paulo: Editora Pearson, 2014.

STEIDLE, J.; DIENER, M. Effects of carbon monoxide on ion transport across rat distal colon. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 300, n. 2, p. G207–G216, 1 fev. 2011.

SUN, B. et al. CO-releasing molecules (CORM-2)-liberated CO attenuates leukocytes infiltration in the renal tissue of thermally injured mice. **International Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 3, p. 176–183, 16 jun. 2008.

TAKAGI, T. et al. Rectal administration of carbon monoxide inhibits the development of intestinal inflammation and promotes intestinal wound healing via the activation of the Rho-kinase pathway in rats. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 107, p. 19–30, 2021.

TAKASUKA, H. et al. Carbon monoxide involved in modulating HCO₃⁻ secretion in rat duodenum. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 337, n. 1, p. 293–300, 2011.

THIAGARAJAH, J. R.; VERKMAN, A. S. CFTR pharmacology and its role in intestinal fluid secretion. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 3, n. 6, p. 594-599, 2003.

TRADTRANTIP, L.; KO, E.-A.; VERKMAN, A. S. Antidiarrheal Efficacy and Cellular Mechanisms of a Thai Herbal Remedy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. e2674, 13 fev. 2014.

UDDIN, MD. J. et al. Carbon Monoxide Attenuates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis via Inhibition of GSK-3 β Signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

UNICEF - FUNDO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA INFÂNCIA. **900 mil doses da vacina contra a cólera chegam à Beira**. 2019. Disponível em: <<https://www.unicef.org/brazil/comunicados-de-imprensa/900-mil-doses-da-vacina-contra-colera-chegam-a-beira>>.

VANDEN BROECK, D.; HORVATH, C.; DE WOLF, M. J. S. *Vibrio cholerae*: Cholera toxin. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 10, p. 1771–1775, 2007.

VENKATASUBRAMANIAN, J.; AO, M.; RAO, M. C. Ion transport in the small intestine. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 26, n. 2, p. 123–128, 2010.

VICENTE, A. M.; GUILLÉN, M. I.; ALCARAZ, M. J. Participation of heme oxygenase-1 in a model of acute inflammation. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, n. 5, p. 514–516, 2003.

VISWANATHAN, V. K.; HODGES, K.; HECHT, G. Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 110–119, 31 fev. 2009.

WALLACE, J. L.; IANARO, A.; DE NUCCI, G. Gaseous Mediators in Gastrointestinal Mucosal Defense and Injury. **Digestive diseases and sciences**, v. 62, n. 9, p. 2223–2230, 1 set. 2017.

WANDS, A. M. et al. Fucosylation and protein glycosylation create functional receptors for cholera toxin. **eLife**, v. 4, 29 out. 2015.

WANG, R.; WANG, Z.; WU, L. Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, n. 5, p. 927–934, jul. 1997.

WANG, W. P. et al. Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 281, n. 2 44-2, p. 586–594, 2001.

WEIL, A. A.; HARRIS, J. B. *Vibrio Cholerae*. **Molecular Medical Microbiology**, p. 1079–1098, 29 mai. 2022.

WEIL, A. A.; LAROCQUE, R. C. Cholera and Other Vibrios. **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases**, p. 486–491, 2020.

WEIL, A. A.; RYAN, E. T. Cholera: Recent updates. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 31, n. 5, p. 455–461, 2018.

WOLF, A. A. et al. Attenuated endocytosis and toxicity of a mutant cholera toxin with decreased ability to cluster ganglioside GM1 molecules. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 4, p. 1476–1484, abr. 2008.

YACHIE, A. et al. Heme oxygenase-1 production by peripheral blood monocytes during acute inflammatory illnesses of children. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, n. 5, p. 550-556, 2003.

YUN, C. H. C. et al. cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na⁺ /H⁺ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 7, p. 3010–3015, abr. 1997.

APÊNDICE A – CARBON MONOXIDE IS A KEY REGULATOR OF DIARRHEA PROMOTED BY TOXIN FROM *Vibrio cholera*: PERSPECTIVE FOR ITS USE AS A THERAPEUTIC TOOL

Carbon monoxide is a key regulator of diarrhea promoted by toxin from *Vibrio cholera*: Perspective for its use as a therapeutic tool

Lorena D. Silva ^a, João Lucas S. Pinheiro ^a, Lucas H.M. Rodrigues ^a, Victória M.R. Santos ^a, Jamille L.F. Borges ^a, Raiany R. Oliveira ^a, Dayane A. Gomes ^a, Eduardo C. Lira ^a, Thiago S.L. Araújo ^b, Conceição S. Martins ^c, Marcellus H.L.P. Souza ^d, Jand-Venes R. Medeiros ^b, Renan O.S. Damasceno ^{a,*}

^a *Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil*

^b *Biotechnology and Biodiversity Center Research, Federal University of Parnaíba Delta, Parnaíba, PI, Brazil*

^c *Department of Morphology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil*

^d *Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil*

* Corresponding to: Laboratory of Investigation of Digestive Disorders – LIDD, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, PE, Brazil
E-mail address: renan.oliveirasilva@ufpe.br (R.O.S. Damasceno)

ABSTRACT

In the present study, we evaluated the effect of a gaseous mediator, the carbon monoxide (CO), in an experimental model of choleric toxin-induced diarrhea and its possible action mechanism. The treatment with CORM-2 (a Carbon monoxide [CO] donor) or Hemin (a heme oxygenase 1 [HO-1] inducer), but not iCORM (an inactive CORM-2), decreased the intestinal fluid secretion and Cl^- efflux increased by cholera toxin. In contrast, ZnPP administration (a HO-1 inhibitor), reversed the antisecretory effect of Hemin and potentiated cholera toxin-induced intestinal secretion, contributing to diarrhea. In addition, CORM-2 also prevented the change of intestinal epithelial architecture and local vascular permeability promoted by cholera toxin. Additionally, the intestinal absorption was not altered in animals treated with CORM-2, Hemin or ZnPP. Cholera toxin inoculation also had increased HO-1 expression and bilirubin levels, a possible protective physiological response. Thus, our results showed that CO is a key molecule for protection against choleric diarrhea and suggest the use this gaseous mediator as a possible therapeutic tool.

Keywords: Carbon monoxide; Cholera toxin; Diarrhea.

1. Introduction

Diarrheal diseases are a global public health problem that leads to increased morbidity and mortality, mainly in developing countries. Large epidemics of diarrhea have been documented in human history, primarily caused by bacterial infections, such as *Escherichia coli*, *Shigella* and especially *Vibrio cholerae* (HASAN et al., 2021). Cholera is an intestinal disorder characterized by acute watery diarrhea caused by one of more than 200 serogroups of *V. cholerae* (CLEMENS et al., 2017). Its transmission occurs through the ingestion of contaminated water and food, common in countries with limited access to potable water and inefficient sanitation system (WHO, 2018).

The production and release of cholera toxin consist in one of the main factors responsible for the virulence of *V. cholerae* to mammalian hosts, this molecule is formed by an active toxic A subunit (CTA) linked to pentameric B subunit (CTB) (SÁNCHEZ; HOLMGREN, 2008). The interaction to intestine cells occurs from the binding of CTB to ganglioside GM1 (GM1), resulting in entry of the toxin by endocytosis (CUATRECASAS, 1973; MIDDLEBROOK; DORLAND, 1984). Within the cell, CTA upregulates adenylate cyclase, which result in increased cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels, protein kinase A (PKA) activation and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) opening, a Cl^- channel, culminating in intense water and electrolyte loss (DAS et al., 2018).

In this sense, gaseous mediators are highlighted due to their endogenous production and biological activities. Carbon monoxide (CO) is a gasotransmitter produced from degradation of the heme via heme-oxygenase 1 (HO-1, an enzyme inducible) and heme-oxygenase 2 (HO-2, an enzyme constitutive). A third subunit, heme-oxygenase 3 (HO-3), appears to be derived from the transcription of HO-2 (ELBIRT; BONKOVSKY, 1999). This reaction also produces ferrous iron and biliverdin, which is converted to bilirubin by the biliverdin reductase enzyme.

CO has important role in the gastrointestinal (GI) tract, being involved in maintaining mucosal integrity, modulation of local blood flow and secretion (WALLACE et al., 2017). Additionally, CO can modulate ion transport, such as Ca^{2+} -activated K^+ channels in the vascular musculature (WANG et al., 1997) and Cl^- and HCO_3^- colonic channels (STEIDLE; DIENER, 2011). Recently, it has been shown that CO has a direct action on the CFTR channel, which results in impeding channel gating and obstruction of Cl^- efflux (RODRAT et al., 2020). In this line, we hypothesized that CO may play a

protective role against choleric diarrhea.

Thus, the present study aimed to evaluate the implications of HO-1/CO signaling pathway on cholera toxin-induced diarrhea and possible action mechanisms. Here, we demonstrated that CO reduces cholera toxin-induced intestinal fluid secretion and Cl⁻ efflux. This result was confirmed by the pharmacological inhibition of HO-1, which potentiated the secretory response produced by the cholera toxin. In addition, CO protected the integrity of the intestinal epithelium and reduced local vascular permeability, altered by the cholera toxin. Finally, our results suggest that the probable protective effect of CO against choleric diarrhea is mediated by molecular interaction with cholera toxin.

2. METHODS

2.1. Drugs and reagents

Tricarbonyldichlororuthenium (II) (CORM-2), Chloroproporphyrin IX iron (III) (Hemin), Zinc Protoporphyrin IX (ZnPP) and toxin from *V. cholera* were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Inactive CORM-2 (iCORM-2) was prepared by keeping the stock solution of CORM-2 in 1% DMSO for 18 h at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere to liberate CO (SUN et al., 2008). CORM-2 was dissolved in 1% DMSO. Hemin and ZnPP were dissolved in 1 mM NaOH. Cholera toxin was dissolved in phosphate buffered saline (PBS). All other chemicals and reagents were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

2.2. Animals

Balb/c mice (7-8 weeks) were housed in temperature-controlled room, 12h light/12h dark cycle and free access to standard pellet diet and water. Mice were fasted for 12 h before the experiments, with free access to water. All procedures were performed in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) and approved by the ethics committee at Federal University of Pernambuco (Protocol No. 17/2019).

2.3. *Experimental protocol*

Mice were initially anesthetized with xylazine and ketamine, a median laparotomy was performed, and a portion of small intestine was isolated and closed with double knots, forming a loop. Intestinal loops were inoculated with cholera toxin (100 μ L; 1 μ g/loop). The control group received only PBS (100 μ L/loop). Four hours post-surgery, the animals were euthanized, the intestinal loop was removed, photographed, measured, and weighed (TRADTRANTIP et al., 2014). The intestinal fluid was collected to electrolyte analysis, and the intestine tissue was used for histopathological and morphometric analysis, immunohistochemistry for HO-1 and determination of bilirubin concentration.

2.4. *Role of HO-1/CO pathway on cholera toxin-induced intestinal fluid secretion*

The animals were treated with CORM-2 (a CO donor; 0.5, 1.5 or 5 mg/kg, p.o.), iCORM-2 (an inactive CORM-2; 5 mg/kg, p.o.), Hemin (a HO-1 inducer; 1, 3 or 10 mg/kg, i.p.) or ZnPP (an HO-1 inhibitor; 1, 3 or 10 mg/kg, i.p.). Thirty minutes later, the surgical procedure for inoculation of cholera toxin (100 μ L; 1 μ g/loop) was performed as above described. In other experimental design, the mice received ZnPP (3 or 10 mg/kg, i.p.), next inoculation of cholera toxin (100 μ L; 0.5 μ g/loop), 30 min later. Mice control received only PBS, DMSO or NaOH. After 4 h, the animals were euthanized, and the loop removed. The intestinal fluid secretion was measured from the loop weight/length ratio (g of tissue/cm). The intestinal fluid and tissue were collected for further analysis.

2.5. *Electrolyte analysis*

The concentrations of Cl^- in the intestinal fluid were measured using Labtest biochemical kits (Labtest, São Paulo, Brazil), according to the manufacturer's instructions. Briefly, the supernatant was collected from intestinal loop was centrifuged at 4,000 rpm for 10 min. The supernatants were mixed with kits specific reagent and electrolyte concentration measured using a plate reader. The results were expressed in mEq/L.

2.6. Histopathological and morphometric analyses

Samples from intestinal loop were fixed in 10% formalin, dehydrated in 70% alcohol, and embedded in paraffin. Sections (5- μ m-thick) were deparaffinized, stained with hematoxylin and eosin (H&E) and analyzed using a light microscope. Intestinal villi and crypt lengths (8 to 10 per slide) were measured using ImageJ 1.4 software (NIH, Bethesda, MD, USA). Results were expressed in micrometer (μ m) (ALVARENGA et al., 2017).

2.7. Intestinal absorption

Initially, the mice received CORM-2 (a CO donor; 5 mg/kg, p.o.), Hemin (a HO-1 inducer; 10 mg/kg, i.p.) or ZnPP (an HO-1 inhibitor; 10 mg/kg, i.p.). Thirty minutes later, a surgical procedure for instillation of PBS (200 μ L/loop) in the intestinal loops was performed. Control animals received only PBS, DMSO or NaOH. The intestinal absorption was analyzed at baseline (time 0) and two hours post-surgery, using a loop weight/length ratio (g of tissue/cm) (AKRIMAJIRACHOOTE et al., 2020).

2.8. Vascular permeability

The mice received CORM-2 (a CO donor; 5 mg/kg, p.o.) or Hemin (a HO-1 inducer; 10 mg/kg, i.p.). After 30 min, the surgical procedure for inoculation of cholera toxin (100 μ L; 1 μ g/loop) was performed. Mice control received only PBS. After 4 h, the animals received Evans blue (25 mg/kg; 150 μ L, i.v.) and the intestinal loop collected 30 min later. The tissue was weighed and placed in formamide (at 37 °C for 24 h). The samples were mixed and analyzed using a plate reader at 620 nm. The results were expressed as microgram of Evans blue per milligram of tissue (μ g of Evans blue/mg tissue) based on a standard curve (RADU, CHERNOFF et al, 2013).

2.9. HO-1 expression

Sections (5- μ m-thick) from intestinal loop were immersed in citrate buffer (pH 6.0) for 20min at 95°C. Endogenous peroxidase was blocked with 3% (v/v) H₂O₂ for 20 min. Then, the sections were washed in PBS and incubated with anti-HO-1 (1:200)

antibody for 1 h. The sections were washed in PBS and incubated with polymer (DAKO) for 30 min. After wash, the sections were stained with 3,3-diaminobenzidine (DAB; DAKO). Sections incubated with antibody diluent without primary antibody were used as negative control. The images were captured using a light microscope.

2.10. Bilirubin concentration

The bilirubin concentration in the intestinal tissue was quantified according to the manufacturer's instructions (Labtest, São Paulo, Brazil). Briefly, the intestinal loop was homogenized in PBS and centrifuged at 4,000 rpm for 10 min. The supernatant was incubated with 5.75 mmol/L sulphanic acid, 72.5 mmol/L sodium nitrite, 130 mmol/L caffeine; 260 mmol/L sodium benzoate and sodium acetate 460 mmol/L, for 5 min and bilirubin concentration measured using a plate reader at 525 nm. The results were expressed in milligrams per deciliter (mg/dL).

2.11. Fluorimetric spectroscopy

The fluorescence spectrum of cholera toxin was studied on a fluorescence microplate reader (Varioskan Flash, Thermo Fisher) at specified temperatures (23°C or 45°C). The excitation (282 nm) and emission (290 to 430 nm) spectra. For fluorescence quenching measurements, CORM-2 was added successively to cholera toxin and the final fluorescence values were corrected for the inner filter effect (LAKOWICZ, 2006).

2.12. Statistical analysis

Data were expressed as the mean $\pm$ standard error of mean. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism® (Version 5.0) software. Statistical significance was determined by One-way analysis of variance (ANOVA) followed by multiple comparisons using Newman-Keuls test. Statistical differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. CO reduces intestinal fluid secretion increased by cholera toxin

Because cholera toxin causes exacerbated intestinal fluid secretion, we evaluated whether the CO prevents this effect. For this, we used CORM-2 (a CO donor), its inactive molecule (iCORM-2) or Hemin (a HO-1 inducer). Fig. 1A demonstrates loop weight/length ratio increased by cholera toxin (0.093 ± 0.006 g/cm), compared to PBS group (0.053 ± 0.003 g/cm). However, animals treated with CORM-2 (0.064 ± 0.004 g/cm) had significant ($P < 0.05$) reduction of the intestinal fluid secretion caused by cholera toxin. Additionally, iCORM-2 administration (0.086 ± 0.007 g/cm), a molecule that does not release CO, did not change the loop weight/length ratio, compared to cholera toxin. In the Fig. 1B, the treatment with Hemin (0.071 ± 0.007 g/cm) decreased loop weight/length ratio, compared to cholera toxin group (0.102 ± 0.011 g/cm). However, the pretreatment with ZnPP (0.110 ± 0.009 g/cm) reversed this effect of Hemin. Additionally, control groups treated only with CORM-2 (0.056 ± 0.004 g/cm), iCORM-2 (0.062 ± 0.007 g/cm), Hemin (0.054 ± 0.007 g/cm), ZnPP (0.055 ± 0.006 g/cm), DMSO (0.055 ± 0.006 g/cm) or NaOH (0.050 ± 0.002 g/cm), had no significant changes in the loop weight/length ratio. Fig. 1C shows representative images of the intestinal loops from each experimental group.

3.2. Pharmacological inhibition of HO-1 potentiates intestinal fluid secretion promoted by cholera toxin

Considering our result, in which CO reduces intestinal fluid secretion increased by cholera toxin, we decided to evaluate the effects of HO-1 pharmacological inhibition with ZnPP. Fig. 2A exhibits a significant ($P < 0.05$) increase in the loop weight/length ratio in animals inoculated with cholera toxin ($1 \mu\text{g}/\text{loop}$; 0.091 ± 0.008 g/cm) compared to PBS group (0.056 ± 0.003 g/cm). Furthermore, there was no statistical difference with ZnPP treatment (3 or 10 mg/kg), compared to cholera toxin group. However, when a submaximal dose of cholera toxin ($0.5 \mu\text{g}/\text{loop}$; 0.069 ± 0.003 g/cm) was used (Fig. 2B), there was a significant ($P < 0.05$) increase in the loop weight/length ratio by ZnPP (0.104 ± 0.015 g/cm) administration.

3.3. CO decreases Cl^- concentration in the intestinal fluid increased by cholera toxin

Due to stimulatory effect of cholera toxin on intestinal secretion of Cl^- ion, we analyzed the concentration of this ion in the closed-loop to confirm the possible antisecretory effect of CO. Cholera toxin (24.63 ± 4.13 mg/dL) significantly ($P < 0.05$) increased the Cl^- concentration in the intestinal fluid, compared to PBS group (2.66 ± 0.68 mg/dL). However, compared to cholera toxin group, animals treated with CORM-2 (10.51 ± 1.03 mg/dL) or Hemin (12.23 ± 0.82 mg/dL) presented significant ($P < 0.05$) reduction in the concentration of this ion (Figs. 3A and 3B). Furthermore, ZnPP (23.50 ± 3.57 mg/dL) administration significantly ($P < 0.05$) reversed this effect of Hemin (Fig. 3B). Therefore, we evaluated the effect of HO-1 inhibition with ZnPP on Cl^- concentration. Fig 3C demonstrate that ZnPP treatment (30.36 ± 7.32 mg/dL) not significantly change the concentration of this ion in intestinal fluid when cholera toxin was inoculated at 1 $\mu\text{g}/\text{loop}$ (28.79 ± 7.93 mg/dL) but potentiated when a submaximal dose of cholera toxin (0.5 $\mu\text{g}/\text{loop}$; 14.78 ± 2.55 mg/dL versus 25.36 ± 4.89 mg/dL for ZnPP) was used.

3.4. CO maintains intestinal epithelium architecture and reduces local vascular permeability altered by cholera toxin

To assess the intestinal epithelium architecture, we performed morphometric analysis. According to Fig. 4A, cholera toxin administration significantly ($P < 0.05$) decreased villus/crypt ratio (3.518 ± 0.129 μm), compared to PBS group (4.530 ± 0.758 μm). Although, CORM-2 treatment (4.179 ± 0.180 μm) significantly ($P < 0.05$) reversed the decrease of villus/crypt ratio promoted by cholera toxin. Considering that the loss of intestinal epithelium architecture can be associated with altered local microcirculation, we analyzed the vascular permeability in the intestinal tissue. Fig 4B demonstrate that cholera toxin (11.80 ± 0.65 μg of Evans Blue/mg tissue) significantly ($P < 0.05$) increased the vascular permeability, compared to PBS group (5.01 ± 0.57 μg of Evans Blue/mg tissue). Furthermore, the effect of cholera toxin was prevented in animals treated with CORM-2 (7.39 ± 1.05 μg of Evans Blue/mg tissue) or Hemin (7.23 ± 0.59 μg of Evans Blue/mg tissue).

3.5. Pharmacological modulators of HO-1/CO pathway do not alter intestinal fluid absorption

The effect of modulators of HO-1/CO pathway on intestinal fluid absorption were

examined to demonstrate whether the antisecretory effect of CO on cholera toxin-induced diarrhea is due an increased intestinal fluid absorption. Compared to baseline time (0.118 ± 0.005 g/cm), the PBS group at 2 h (0.074 ± 0.003 g/cm) had intestinal fluid absorption, which was not alter in animals treated with CORM-2 (0.078 ± 0.004 g/cm), Hemin (0.074 ± 0.004 g/cm) or ZnPP (0.070 ± 0.002 g/cm) (Fig 5).

3.6. Cholera toxin increases HO-1 immunoreactivity and its product in the intestine tissue

Immunohistochemistry analysis was performed to evaluate the effect of cholera toxin on intestinal HO-1 expression. The amount of HO-1 immunoreactive cells were increased in the intestinal epithelium of animals treated with cholera toxin (Fig. 6B), compared to baseline levels in the PBS group (Fig. 6A). In order, we evaluated bilirubin levels as an indirect marker of the CO production, a validation of HO-1-mediated signaling. Cholera toxin inoculation resulted in a significant ($P < 0.05$) accumulation of tissue bilirubin (92.87 ± 6.08 mg/dL), compared to PBS group (59.51 ± 8.03 mg/dL) (Fig. 6C).

3.7. Fluorimetric analysis

A fluorescence analysis was performed to investigate whether CO directly interacts with the molecular structure of the cholera toxin. The results showed that the fluorescence emitted by the toxin incubated with CORM-2 (200 μ M; 309.05 ± 5.25 ASC) was significantly ($P < 0.05$) lower when compared to the fluorescence emitted by the toxin alone (805.0 ± 4.35 ASC) (Figures 7A and B).

To elucidate the mechanism of interaction between the cholera toxin and CO, a Stern-Volmer plot was prepared for two temperatures (25 and 45°C) (Figure 7C). The linear profile of the graph indicates that only one type of toxin fluorescence loss occurred in the presence of CO, while the decreasing slope with increasing temperature suggests that CO interacts statically with the cholera toxin, with the formation of a complex.

4. Discussion

In the present study, we demonstrate that HO-1/CO pathway have a key role in the regulation of choleric diarrhea. The pharmacological modulation with Hemin (a HO-1 inducer) or CORM-2 (a CO donor) had a significant effect against intestinal fluid secretion and luminal efflux of Cl^- ions, decreasing the accumulation of cholera toxin-induced secretory content. This result was confirmed by ZnPP administration, a HO-1 inhibitor, which reversed the effect of Hemin and potentiated the intestinal fluid and Cl^- secretion. In addition, the histopathological analysis showed that CO protected the villi and crypt architecture altered by the cholera toxin, inhibiting its harmful effects on the intestinal epithelium

The literature shows that gaseous mediators, such as nitric oxide (NO), hydrogen sulfide (H_2S) and CO acts in a variety of physiological actions in the digestive system (KORBUT et al., 2020). In this perspective, CO emerges as one of the most therapeutically attractive gasotransmitter due to its greater stability and distribution to more distant tissues, in addition to not behaving as a free radical. CO demonstrated a cytoprotective action of the esophageal squamous epithelium against damage caused by acute reflux esophagitis (MAGIEROWSKA et al., 2020) and the HO-1/CO pathway showed to have an antioxidant role against alendronate-induced gastric damage (COSTA et al., 2013). In the most distal portion of the GI tract, CO inhibited intestinal inflammation and promoted colonic mucosal epithelial restructuring in an experimental model of inflammatory bowel disease (IBD) (TAKAGI et al., 2020).

Furthermore, ion channels appear to be a potential target for CO action in biological membranes, influencing the control of electrolyte and osmotic balance. Takasuka et al. (2011) demonstrated that CO can modulate HCO_3^- secretion in the duodenal lumen, protecting cells against injury caused by acidic stomach contents (TAKASUKA et al., 2011). Moreover, an important role of CO in the Cl^- ions transport was identified in an *in vitro* study performed by Rodrat et al. (2020), who concluded that CO could inhibit the ionic current flow by interacting with the CFTR channel molecule (RODRAT et al., 2020). Together, these data suggested that CO may have a potential application in the treatment of *V. cholerae* induced diarrhea. This hypothesis reinforced by previous results of our research group, which showed that H_2S donors demonstrated anti-secretory effect against choleric diarrhea and maintenance of intestinal epithelium architecture (SOUZA et al., 2018; SOUZA et al., 2021).

In this way, our results showed that CO reduces intestinal fluid secretion increased by cholera toxin. This finding may be directly related to the intestinal epithelial transport

of electrolytes, as this is a crucial factor for the composition and movement of luminal fluid. The coordinated transport of the main ions, sodium (Na^+), K^+ , Cl^- and HCO_3^- , is maintained by molecules such as Na^+/K^+ -ATPase, CFTR channel and anion exchangers, respectively (VENKATASUBRAMANIAN et al., 2010). However, the toxin produced by *V. cholerae* adversely interferes with Cl^- secretion and, consequently, with the coupled absorption of Na^+/Cl^- , leading to altered water transport (VISWANATHAN et al., 2009). This conjecture allows us to establish that agents that can modulate this secretory mechanism are promising for treating cholera. Additionally, our results also demonstrated that CO decreases the luminal Cl^- concentration, contributing to explain the anti-secretory action promoted by CO in the choleric diarrhea.

Thus, to confirm the antisecretory effect of CO endogenously produced by HO-1 against cholera toxin-induced diarrhea, the mice were initially treated with ZnPP. Due to its structural similarity with the heme group of hemoglobin, ZnPP is a well-known HO-1 inhibitor by competing for its active site. In this sense, ZnPP can act as an enzymatic substrate for HO-1, leading to reduced reaction products, including CO (KAPPAS et al., 1986). Therefore, our results showed that ZnPP administration reversed the protective effect of Hemin and potentiated the secretory effect caused by the cholera toxin, also evidenced by the increased Cl^- concentration in the intestinal lumen. These results corroborate with the literature, which shows that ZnPP was able to inhibit the protective effect of HO-1 on colonic inflammatory damage, aggravating colitis (WANG et al., 2001) and acetylsalicylic acid (ASA)-induced gastric damage (MAGIEROWSKI et al., 2016) in animal models. In this way, our results suggest a potential role of CO in the protection of the intestinal epithelium against cholera toxin-induced secretory diarrhea.

To assess whether the anti-secretory effect of CO involved changes in the intestinal absorption, we analyzed this physiological function in animals treated with pharmacological modulators of HO-1/CO pathway. This investigation is important since enterotoxins, including produced by *V. cholerae*, promoted an inhibition of Na^+ and Cl^- absorption, contributing to accumulation of intestinal fluid (YUN et al., 1997). Although studies indicate that CO can affect Na^+ transport in some epithelial tissues, its action on Na^+ absorption in the intestine is still poorly understood (ALTHAUS, 2012). In the present study, no change in intestinal absorptive function was observed in our study when CORM-2, Hemin, ZnPP or their vehicles were administered, invalidating this hypothesis. Thus, the protective effect mediated by CO against choleric diarrhea is not

secondary to an increased intestinal absorption, suggesting that other mechanisms may be involved in this process.

Corroborant to literature, from histopathological and morphometric analyses of intestinal epithelium, we demonstrated that the cholera toxin altered the tissue architecture, resulting in shortening of the villi and crypt depths. These findings are supported by the literature, which show that cholera toxin-mediated intracellular signaling leads to increased cAMP levels and interferes with the intracellular traffic of critical components of adherent junctions, disrupting the intestinal barrier function (IRETON et al., 2018). In this way, this condition provides a potential mechanism for the paracellular efflux of ions and water into the intestinal lumen, contributing to the worsening of diarrhea. On the other hand, our results also showed that CO restored intestinal epithelium architecture, maintaining the structural organization of villi and crypts. This finding suggests that CO has a crucial effect in protecting the loss of the intestinal epithelium organization by cholera toxin inoculation, like ileal mucosa protection against the disruptive effects of the toxin from *Clostridium difficile* (MEDEIROS et al, 2011; INUI et al., 2011).

In addition, other studies have reported that toxins produced by *Clostridium difficile* and *Escherichia coli* may increase vascular permeability by promoting increased intravascular pressure, vessel dilation and angiogenesis (HUANG et al., 2018; BRIGHAM et al., 1979). In parallel, our results showed that the *V. cholerae* toxin was also capable of altering the permeability of intestinal capillaries, confirmed by the increase in tissue Evan's blue concentration. These data lead us to suggest that the loss of the vascular barrier may further contribute to the pathogenesis of cholera, as it allows the outflow of plasma and proteins into the intestine. In contrast, it has been shown that HO-1 and its product, CO, are able to modulate parameters related to inflammatory processes that contribute to the disruption of the intestinal epithelium (IWATA et al., 2020), reducing endothelial permeability and inhibiting the plasma leakage and edema (ALCARAZ et al., 2003). Therefore, we demonstrated that the administration of Hemin or CORM-2 prevented the changes in local vascular permeability caused by the cholera toxin. This result reinforces the fundamental role of CO in protecting the gastrointestinal mucosa microenvironment against cholera toxin-induced damage.

Based on the protective role of CO on choleric diarrhea, we investigated whether the inoculation of cholera toxin affects intestinal HO-1 expression. This enzyme is

endogenously expressed at relatively low basal levels in various mammalian tissues, but it can be upregulated in the GI tract, due to its continuous exposure to stressors agents, such as food antigens, microorganisms, and drugs (PUENTES-PARDO et al., 2020). In this context, literature data shows that ethanol and alendronate (GOMES et al., 2010; COSTA et al, 2013) can cause gastric damage, while dextran sulfate sodium (DSS) and trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) are important experimental model of colitis in rodents (UDDIN et al., 2013; WANG et al., 2001). In common, these gastrointestinal injuries are accompanied of increased HO-1 immunoreactivity, which leads to a concomitant increase in CO in intestinal cells. This finding was correlated with protective effect of CO, suggesting that the HO-1/CO pathway may act as a biological defense mechanism of the gastrointestinal mucosa. Thus, the data of present study showed that cholera toxin inoculation promoted increased HO-1 immunostaining in intestinal epithelial cells, indicating active production of CO via HO-1 as an intestinal protective mechanism (HEGAZI et al., 2005). Despite this, it is possible that there is endogenous release of CO at low levels, which are not sufficient to fully protect the intestinal epithelium against cholera toxin. In this line, our results showed that pharmacological modulation of the HO-1/CO pathway with CO donors or HO-1 inducers potentiates its protective effect against choleric diarrhea, while HO-1 inhibition potentiates intestinal disorder.

Additionally, considering that HO-1-mediated signaling results in equimolar production of CO and biliverdin, and that this pigment is converted into bilirubin (RYTER, 2019), the increase in its concentration in the intestinal tissue could suggest a concomitant increase in endogenous CO (COSTA et al, 2013; GOMES et al., 2010). Thus, we evaluated the bilirubin levels in the intestinal tissue after inoculation of the cholera toxin. Our results showed that tissue bilirubin concentration was increased significantly after cholera toxin administration, suggesting that cholera toxin-stimulated HO-1 leads to increased CO production. Therefore, this finding confirms the hypothesis that increased HO-1 expression results in the increased heme catabolism products, including CO, suggesting a protective mechanism.

Our work showed that CO is one promising molecules for therapeutic approach in digestive disorders. In this perspective, we show that CO has an antisecretory effect as a way of protecting the intestinal epithelium from damage caused by *V. Cholerae* toxin, suggesting a new beneficial effect and perspectives for the future treatment of this condition. In addition to the use of CO-releasing molecules, another possibility that

has also gained prominence for its promising results is the administration of CO by inhalation, allowing to modulate, for example, numerous functions of the cardiovascular system, leukocyte adhesion to vascular endothelium and platelet aggregation. The regulation of the amount of CO involved in the treatment is important because it generates a delivery mechanism in optimal amounts, directed to the target tissue, and with low toxicity to other organs. Therefore, the clinical implementation of CO in the therapy of human diseases, such as cholera, seems to be an increasingly evident and potentially effective reality. However, it is worth noting that more studies are needed so that new discoveries are reached for a better elucidation of the current results.

5. Conclusions

Our findings demonstrated that CO exhibits protective response against cholera toxin-induced secretory diarrhea by inhibiting fluid secretion and Cl⁻ efflux into the intestinal lumen. CO also preserved the architecture of the intestinal epithelium and prevents the increased vascular permeability caused by cholera toxin. The data also suggest that CO-mediated antisecretory effect is not due to an increased intestinal absorption, and probably occurs by a mechanism dependent of molecular interaction with toxin from *V. cholera*. Thus, our results suggest perspectives to use of CO as a therapeutic tool for choleric diarrhea.

Funding

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Process 409693/2018-9, Brazil). Lorena D. Silva is recipient of a fellowship from Foundation for Science and Technology Support of the State of Pernambuco (FACEPE, Brazil).

CRedit authorship contribution statement

Lorena D. Silva, João Lucas S. Pinheiro, Lucas H.M. Rodrigues: Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Visualization; Victória M.R. Santos, Jamille L.F. Borges, Raiany R. Oliveira, Thiago S.L. Araujo, Paulo S.A. Sousa, Conceição S.

Martins: Methodology, Validation, Investigation, Writing - Original Draft, Visualization; Dayane A. Gomes, Eduardo C. Lira, Marcellus H.L.P. Souza, Jand-Venes R. Medeiros: Conceptualization, Resources, Writing - Review & Editing; Renan O.S. Damasceno: Conceptualization, Resources, Writing - Review & Editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that do not have conflict of interest or commercial or financial relationship that could have appeared to influence the work submitted.

References

- AKRIMAJIRACHOOTE, N. et al. Inhibition of CFTR-mediated intestinal chloride secretion by a fungus-derived arthropsoide A: Mechanism of action and anti-diarrheal efficacy. **European Journal of Pharmacology**, v. 885, 15 out. 2020.
- ALCARAZ, M.; FERNANDEZ, P.; GUILLEN, M. Anti-Inflammatory Actions of the Heme Oxygenase-1 Pathway. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 30, p. 2541–2551, 23 mar. 2005.
- ALTHAUS, M. Gasotransmitters: Novel Regulators of Epithelial Na⁺ Transport? **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. 6, p. 639–650, 2012.
- ALVARENGA, E. M. et al. Carvacryl acetate, a novel semisynthetic monoterpene ester, binds to the TRPA1 receptor and is effective in attenuating irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 69, n. 12, p. 1773–1785, 1 dez. 2017.
- BRIGHAM, K. L.; BOWERS, R. E.; HAYNES, J. Increased sheep lung vascular permeability caused by Escherichia coli endotoxin. **Circulation Research**, v. 45, n. 2, p. 292–297, 1979.
- CLEMENS, J. D. et al. Cholera. **The Lancet**, v. 390, n. 10101, p. 1539–1549, 2017.
- COSTA, N. R. D. et al. Role of soluble guanylate cyclase activation in the gastroprotective effect of the HO-1/CO pathway against alendronate-induced gastric damage in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 700, n. 1–3, p. 51–59, 2013.
- CUATRECASAS, P. Gangliosides and Membrane Receptors for Cholera Toxin. **Biochemistry**, v. 12, n. 18, p. 3558–3566, 1973.
- DAS, S.; JAYARATNE, R.; BARRETT, K. E. The Role of Ion Transporters in the Pathophysiology of Infectious Diarrhea. **Cmgh**, v. 6, n. 1, p. 33–45, 2018.

ELBIRT, K. K.; BONKOVSKY, H. L. Heme oxygenase: Recent advances in understanding its regulation and role. **Proceedings of the Association of American Physicians**, v. 111, n. 5, p. 438–447, 1999.

GOMES, A. S. et al. Gastroprotective effect of heme-oxygenase 1/biliverdin/CO pathway in ethanol-induced gastric damage in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 642, n. 1–3, p. 140–145, 2010.

HASAN, S. M. T. et al. Taking care of a diarrhea epidemic in an urban hospital in Bangladesh: Appraisal of putative causes, presentation, management, and deaths averted. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 11, p. e0009953, 15 nov. 2021.

HEGAZI, R. A. F. et al. Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase 1-dependent pathway. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 12, p. 1703–1713, 19 dez. 2005.

HUANG, J. et al. Clostridium difficile toxins induce VEGF-A and vascular permeability to promote disease pathogenesis. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 269–279, 2019.

INUI, M. et al. Protective Roles of CX3CR1-Mediated Signals in Toxin A-Induced Enteritis through the Induction of Heme Oxygenase-1 Expression. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 1, p. 423–431, 1 jan. 2011.

IRETON, K.; VAN NGO, H.; BHALLA, M. Interaction of microbial pathogens with host exocytic pathways. **Cellular Microbiology**, v. 20, n. 8, 20 ago. 2018.

IWATA, M. et al. The protective role of localized nitric oxide production during inflammation may be mediated by the heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 23, 1 set. 2020.

KAPPAS, A.; DRUMMOND, G. S. Control of heme metabolism with synthetic metalloporphyrins. **Journal of Clinical Investigation**, v. 77, n. 2, p. 335–339, 1986.

KORBUT, E.; BRZOZOWSKI, T.; MAGIEROWSKI, M. Carbon Monoxide Being Hydrogen Sulfide and Nitric Oxide Molecular Sibling, as Endogenous and Exogenous Modulator of Oxidative Stress and Antioxidative Mechanisms in the Digestive System. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–14, 15 abr. 2020.

LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. **Springer**, p. 1-954, 2006.

MAGIEROWSKA, K. et al. Evidence for Cytoprotective Effect of Carbon Monoxide Donor in the Development of Acute Esophagitis Leading to Acute Esophageal Epithelium Lesions. **Cells**, v. 9, n. 5, p. 1203, 12 mai. 2020.

MAGIEROWSKI, M. et al. Interaction between endogenous carbon monoxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastroprotection against acute aspirin-induced gastric damage. **Pharmacological Research**, v. 114, p. 235–250, 1 dez. 2016.

MEDEIROS, C. A. et al. Role of the haem oxygenase/carbon monoxide pathway in Clostridium difficile toxin A-induced enteritis in mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 8, p. 1146–1154, 2011.

MIDDLEBROOK, J. L.; DORLAND, R. B. Bacterial toxins: Cellular mechanisms of action. **Microbiological Reviews**, v. 48, n. 3, p. 199–221, 1984.

PUENTES-PARDO, J. D. et al. Heme Oxygenase-1 in Gastrointestinal Tract Health and Disease. **Antioxidants**, v. 9, n. 12, p. 1214, 2 dez. 2020.

RADU, M.; CHERNOFF, J. An in vivo assay to test blood vessel permeability. **Journal of visualized experiments**, n. 73, 2013.

RODRAT, M. et al. Carbon monoxide-releasing molecules inhibit the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 319, n. 6, p. L997–L1009, 1 dez. 2020.

RYTER, S. W. Heme oxygenase-1/carbon monoxide as modulators of autophagy and inflammation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 678, 2019.

SÁNCHEZ, J.; HOLMGREN, J. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 9, p. 1347–1360, 2008.

SOUSA, F. B. M. et al. H₂S is a key antisecretory molecule against cholera toxin-induced diarrhoea in mice: Evidence for non-involvement of the AC/cAMP/PKA pathway and AMPK. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 76, p. 152–163, 2018.

SOUSA, F. B. M. et al. Mechanism of preservation of the intestinal mucosa architecture and NF- κ B/PGE₂ reduction by hydrogen sulfide on cholera toxin-induced diarrhea in mice. **Life Sciences**, v. 284, 2021.

STEIDLE, J.; DIENER, M. Effects of carbon monoxide on ion transport across rat distal colon. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 300, n. 2, p. G207–G216, 1 fev. 2011.

SUN, B. et al. CO-releasing molecules (CORM-2)-liberated CO attenuates leukocytes infiltration in the renal tissue of thermally injured mice. **International Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 3, p. 176–183, 16 jun. 2008.

TAKAGI, T. et al. Rectal administration of carbon monoxide inhibits the development of intestinal inflammation and promotes intestinal wound healing via the activation of the Rho-kinase pathway in rats. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 107, n. May 2020, p. 19–30, 2021.

TAKASUKA, H. et al. Carbon monoxide involved in modulating HCO₃⁻ secretion in rat duodenum. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 337, n. 1, p. 293–300, 2011.

TRADTRANTIP, L.; KO, E.-A.; VERKMAN, A. S. Antidiarrheal Efficacy and Cellular Mechanisms of a Thai Herbal Remedy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, 13 fev. 2014.

UDDIN, MD. J. et al. Carbon Monoxide Attenuates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis via Inhibition of GSK-3 β Signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

VENKATASUBRAMANIAN, J.; AO, M.; RAO, M. C. Ion transport in the small intestine. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 26, n. 2, p. 123–128, 2010.

VISWANATHAN, V. K.; HODGES, K.; HECHT, G. Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 110–119, 31 fev. 2009.

WALLACE, J. L.; IANARO, A.; DE NUCCI, G. Gaseous Mediators in Gastrointestinal Mucosal Defense and Injury. **Digestive diseases and sciences**, v. 62, n. 9, p. 2223–2230, 1 set. 2017.

WANG, R.; WANG, Z.; WU, L. Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, n. 5, p. 927–934, jul. 1997.

WANG, W. P. et al. Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 281, n. 2 44-2, p. 586–594, 2001.

WHO. Ending cholera: A global roadmap to 2030. **Ending Cholera, a Global Roadmap To 2030**, p. 32, 2017.

YUN, C. H. C. et al. cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na⁺ /H⁺ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 7, p. 3010–3015, abr. 1997.

Figure legends

Figure 1. Effect of HO-1/CO pathway on cholera toxin-induced intestinal secretion. Loop weight/length ratio of animals treated with CORM-2 (A) or Hemin (B), followed by inoculation of cholera toxin. Representative images of intestinal loops from each group in study (C). * $p < 0.05$ vs. control group; # $p < 0.05$ vs. toxin group; $\Psi p < 0.05$ vs. Hemin (10 mg/kg) group. Values were determined by one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls test.

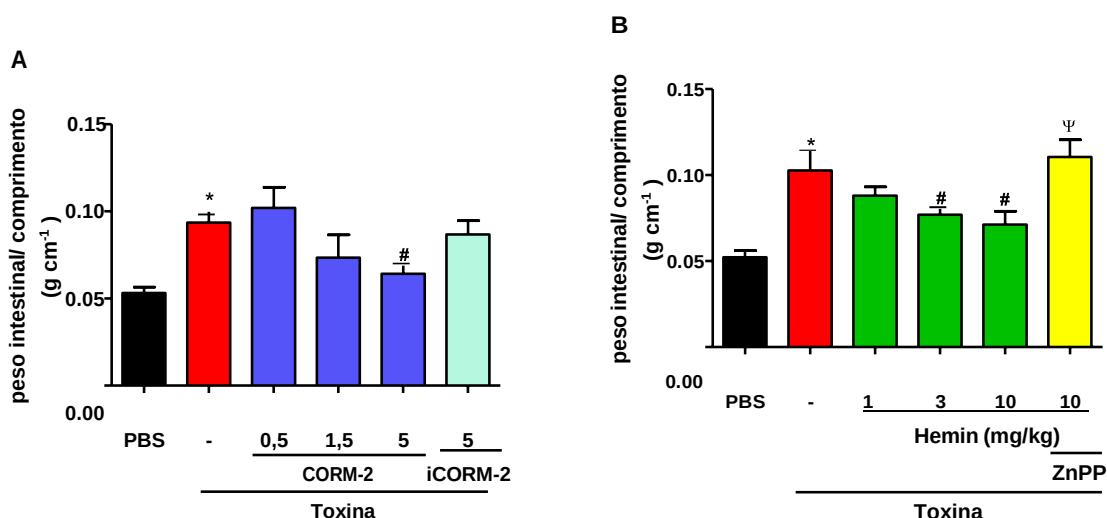


Figure 2. Effect of pharmacological inhibition of HO-1 on cholera toxin-induced intestinal secretion. Loop weight/length ratio of animals treated with ZnPP and inoculation of cholera toxin at 1 μ g/loop (A) or 0.5 μ g/loop (B). * $p < 0.05$ vs. control group; # $p < 0.05$ vs. toxin group (0.5 μ g/loop). Values were determined by one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls test.

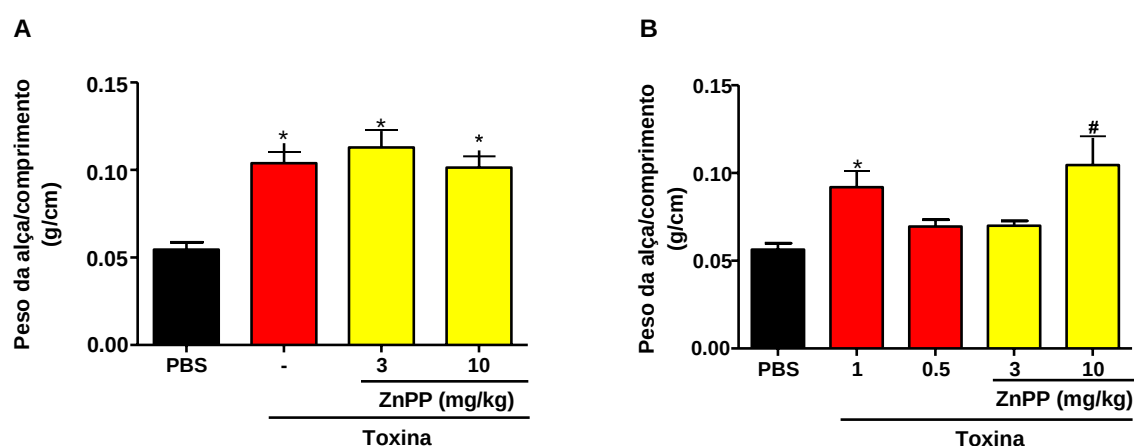


Figure 3. Effect of HO-1/CO pathway on Cl⁻ concentration in the intestinal fluid.

Cl⁻ concentration in the intestinal fluid of animals CORM-2 (A), Hemin (B), or ZnPP, followed by inoculation of cholera toxin at 1 µg/loop (C) or 0.5 µg/loop (D). **p* < 0.05 vs. control group; #*p* < 0.05 vs. toxin (1 µg/loop) group; Ψ*p* < 0.05 vs. Hemin (10 mg/kg) group; #*p* < 0.05 vs. toxin (0.5 µg/loop) group. Values were determined by one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls test.

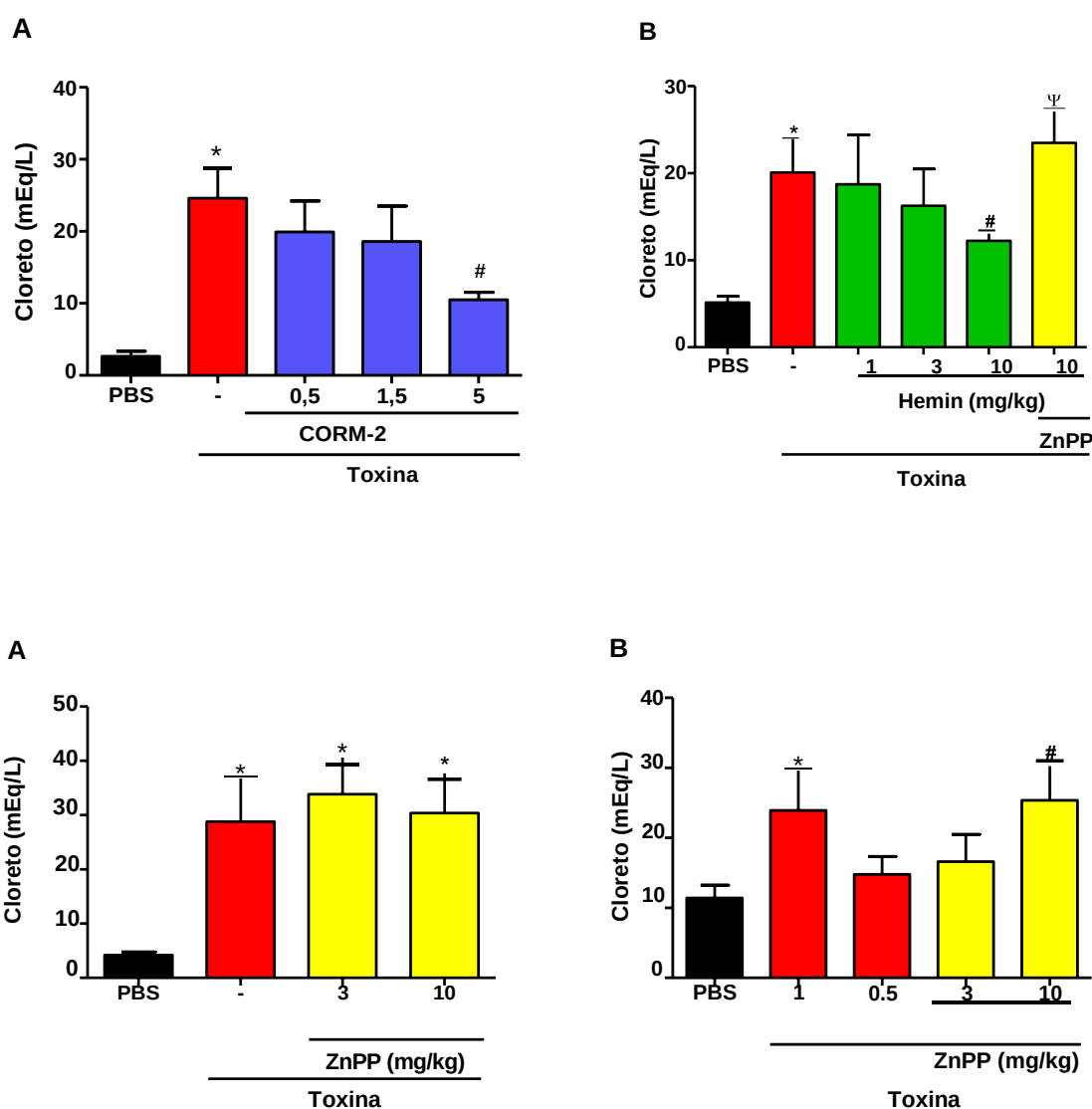


Figure 4. Effect of CO on histological and morphometric changes and increased vascular permeability promoted by cholera toxin. Photomicrography of animals that received PBS (A), inoculation of cholera toxin (B) and CORM-2 plus cholera toxin(C). (D) Villus/crypt ratio and (E) Intestinal vascular permeability. * $p < 0.05$ vs. control group; # $p < 0.05$ vs. toxin group. Values were determined by one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls test.

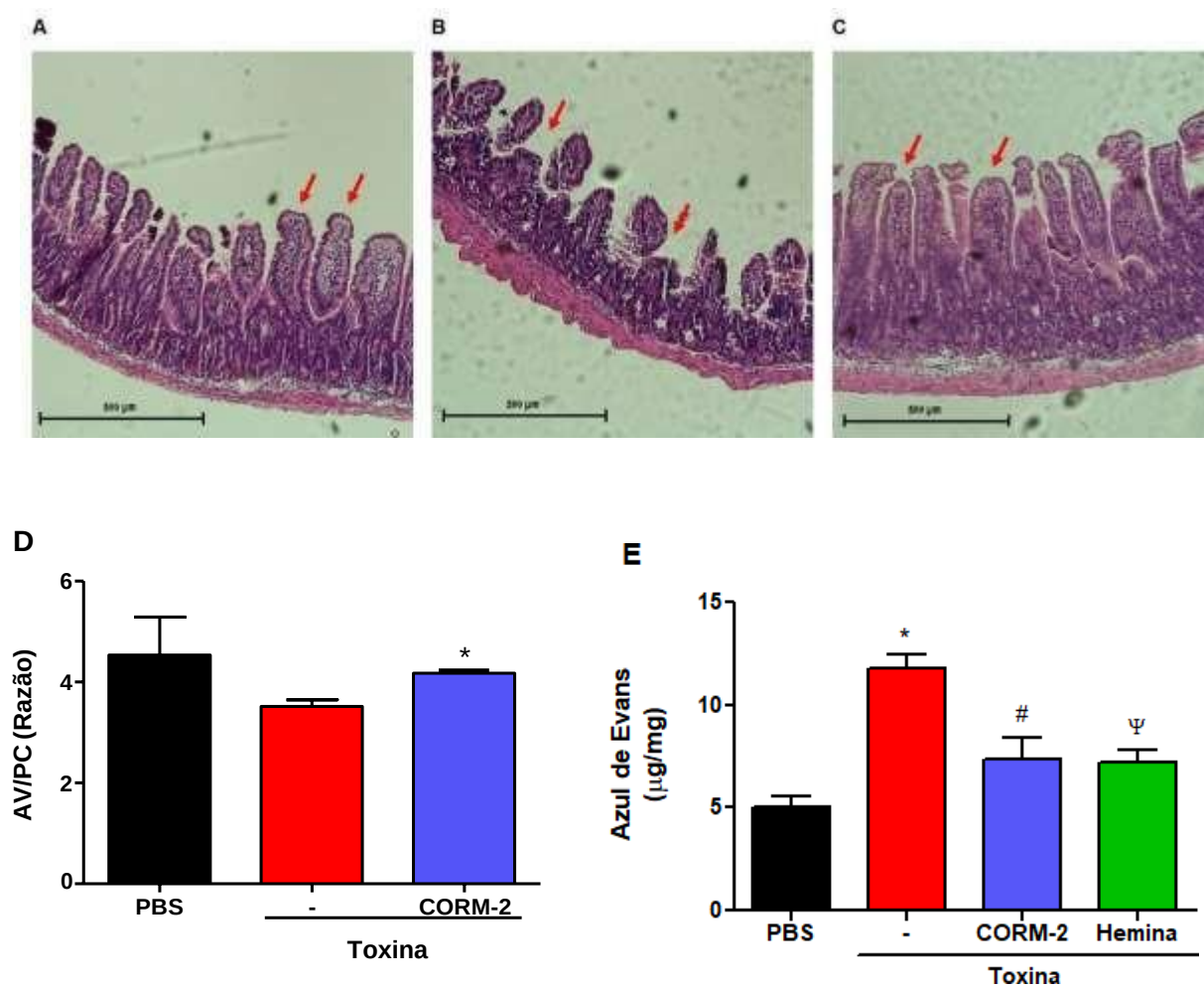


Figure 5. Effect of HO-1/CO pathway on intestinal fluid absorption. Loop weight/length ratio of animals treated with modulators of HO-1/CO signaling pathway. * $p < 0.05$ vs. baseline time. Values were determined by one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls test.

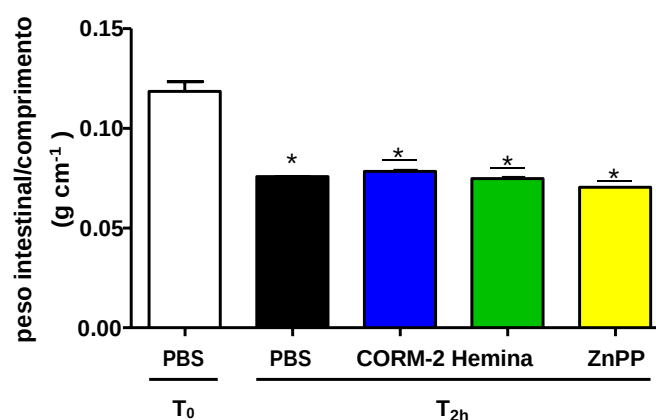


Figure 6. Immunohistochemical staining for HO-1 and bilirubin levels of animals with inoculation of cholera toxin. HO-1 immunoreactivity of animals that received PBS (A), inoculation of cholera toxin (B). Bilirubin levels (C). * $p < 0.05$ vs. control group; # $p < 0.05$ vs. toxin group. Values were determined by one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls test.

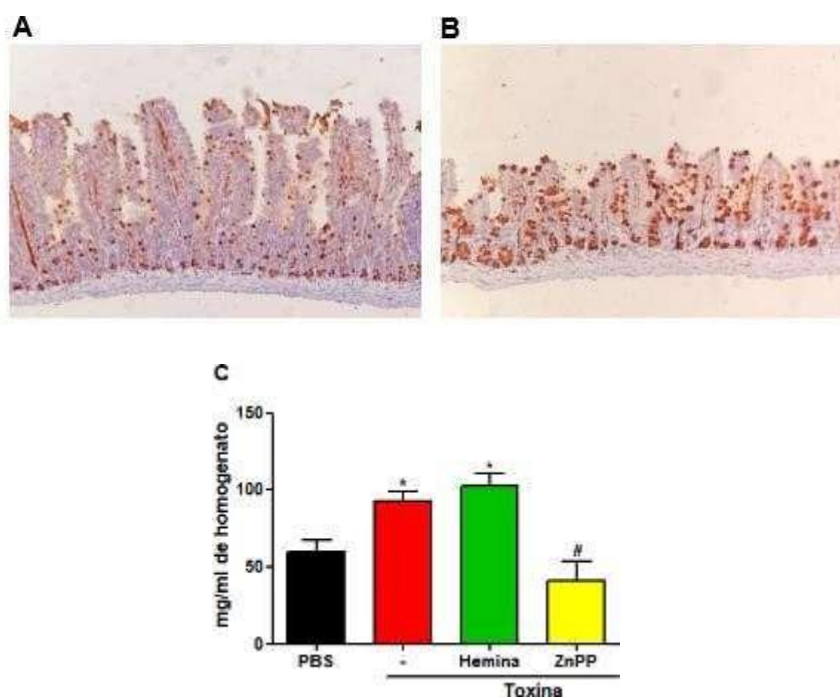
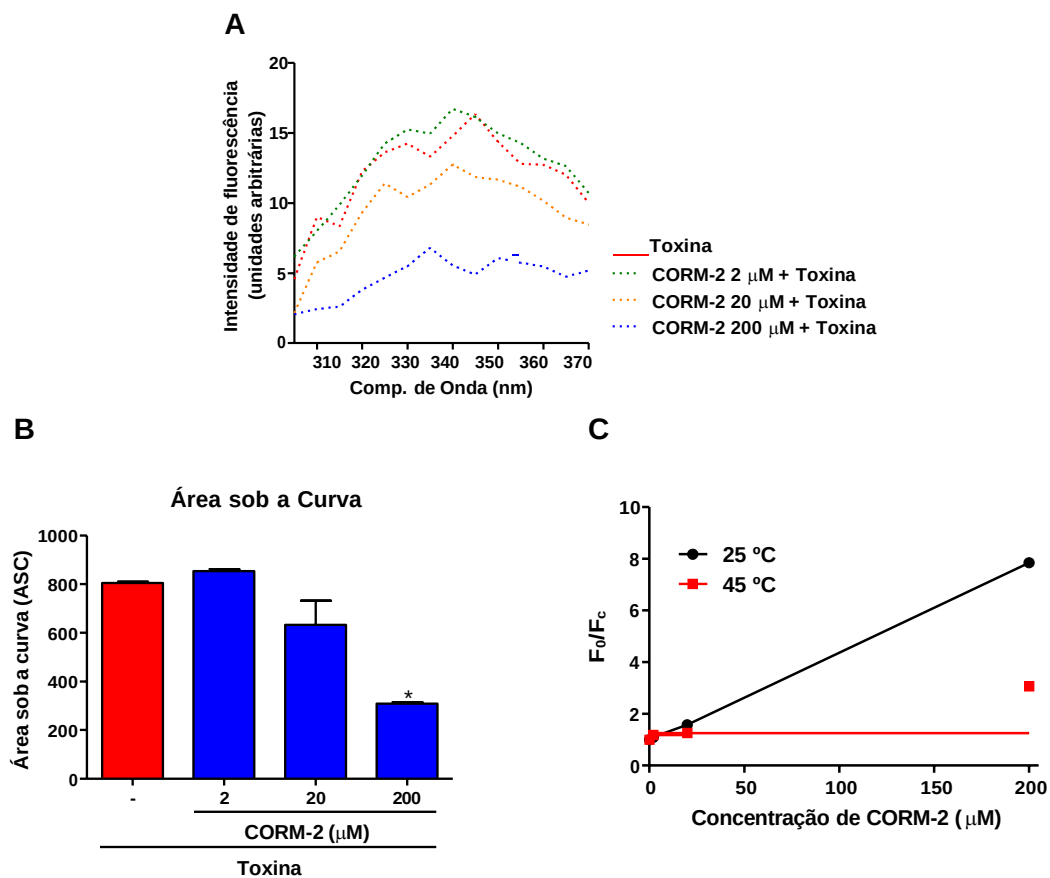


Figure 7. Molecular interaction of CO with *V. cholerae* toxin. Fluorescence intensity emitted by cholera toxin incubated or not with CORM-2 (A). (B) Area under the fluorescence intensity data curve. (C) Stern-Volmer graph with two different temperatures (25 and 45°C). * $P < 0.05$ vs. toxin group of *V. cholerae*.



ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife – PE – Brasil
Fones: 2126 8842
ceua@ufpe.br

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Renan Oliveira Silva**
Departamento de Fisiologia e Embriologia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 0017/2019

Certificamos que a proposta intitulada "**papel do eixo heme oxigenase i/caveolina-1 na patogênese da diarreia provocada por toxina do vibrio cholerae: um estudo morfofuncional e da resposta inflamatória,**" registrado com o nº 0017/2019 sob a responsabilidade de **Prof. Renan Oliveira Silva** o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 24/09/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	24/09/2019 A 30/07/2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogenico
Nº de animais	480
Peso/Idade	25-30g/ 3 meses
Sexo	Macho (480)
Origem: Biotério de Criação	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691

