

MARESINA 2 REDUZ DOR E INFLAMAÇÃO INDUZIDAS PELA PEÇONHA DE *Bothrops jararaca* EM CAMUNDONGOS

Beatriz Hoffmann Salles Bianchini¹; Kassy Lenno Sousa Dantas¹; Matheus Deroco Veloso da Silva¹, Maiara Piva¹, Jessica Aparecida Carneiro¹, Patricia Bianca Calissa², Rubia Casagrande³, Waldiceu A. Verri¹

¹Laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer do Departamento de Patologia da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil – beatriz.hoffmann@uel.br; kassylenno@outlook.com; matheus.deroco@gmail.com; maiarapiva@gmail.com; jessicacarneiro@uel.br; waverri@uel.br; ²Laboratório de Imunologia, Instituto Butantan, São Paulo, São Paulo, Brasil – ; ³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil - rubiaca@uel.br

A peçonha de *Bothrops jararaca* (BjV) causa dor intensa e prolongada que não é revertida pelo antiveneno. Dessa forma, mediadores lipídicos pró-resolução (MLPRs), como a Maresina 2 (MaR2), se torna uma abordagem promissora em casos de acidentes ofídicos envolvendo esta serpente. Inicialmente, camundongos Swiss fêmeas de 20-25g foram estimulados com 3 doses de BjV (0.01, 0.1 e 1 µg/i.pl.). A hiperalgesia mecânica e térmica foi avaliada nos tempos 0, 1, 3, 5 e 7 horas após o estímulo e, diariamente pelos próximos quatro dias. A dose de 1 µg/pata de BjV foi selecionada para os seguintes experimentos. Posteriormente, os animais foram tratados com 3 doses de MaR2 (0.3ng, 1ng e 3ng/animal, i.p.), 30 minutos antes do estímulo com BjV e através dos mesmos testes, a dose de 3ng foi selecionada para os seguintes experimentos. O teste de instabilidade foi avaliado através do Static Weight Bearing (SWB) nos mesmos tempos apontados anteriormente. Os animais foram eutanasiados após a 7^a hora para a coleta de tecido plantar e realizados os ensaios de atividade da mieloperoxidase (MPO), produção do ânion superóxido (NBT) e propriedades antioxidantes totais (ensaio ABTS) por meio de técnicas colorimétricas, além da avaliação imunoenzimática por ELISA dos níveis de citocinas (CEUA nº 103/2021). Com base nos testes de hiperalgesia térmica e mecânica, a dose de 1 µg/pata do estímulo com BjV e a dose de 3ng de MaR2 para o tratamento foram selecionados para os seguintes experimentos. O pré-tratamento se demonstrou eficiente no retorno da distribuição de peso entre as patas traseiras, foi capaz de reduzir o infiltrado de neutrófilos, estresse oxidativo e níveis de citocinas pró-inflamatórias após estímulo com BjV. Os resultados demonstram o potencial terapêutico da MaR2 no contexto de acidentes ofídicos, particularmente aqueles envolvendo o veneno de *Bothrops jararaca*.

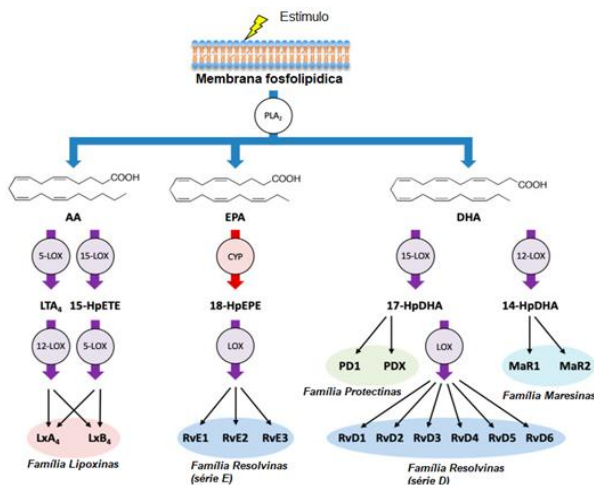
Palavras-chave: Peçonha *Bothrops jararaca*; Dor; Inflamação.

Introdução. Serpentes do gênero *Bothrops jararaca* pertencem à família Viperidae do gênero *Bothrops* e apresentam como características uma cabeça triangular, corpo robusto e cauda curta, além disso, a coloração destes animais variam entre tons de marrom, cinza e verde (Instituto Butantan, 2022). A peçonha de *Bothrops jararaca* (BjV) é constituída por diversos peptídeos e proteínas com propriedades farmacologicamente ativas que desencadeiam uma reação inflamatória significativa no local da picada, muitas vezes resultando em rubor, edema e dor intensa, sinais cardinais característicos da inflamação aguda. A dor é um dos sinais clínicos mais comuns da inflamação, sendo altamente relatado nos acidentes ofídicos envolvendo a *Bothrops jararaca* (Abbas, Pillai e Lichtman, 2019; Ferraz *et al.*, 2021). Neste contexto, o sintoma de dor pode resultar tanto da ativação neuronal direta pelo estímulo quanto da interação neuroimune decorrente da ativação da resposta inflamatória (Abbas, Pillai e Lichtman, 2019). Assim, tratamentos que apresentem potenciais antiinflamatórios, antioxidantes e analgésicos podem contribuir para a

manutenção da integridade tecidual e limitação de sinais e sintomas decorrentes de acidentes ofídicos envolvendo a *B. jararaca*, por exemplo.

Evidências demonstraram que os Mediadores Lipídicos Pró-resolução Especializados (MLPRs) orquestram ativamente o processo de resolução da inflamação (Serhan *et al.*, 2014). Esta nova classe de mediadores lipídicos é derivada da transformação dos ácidos graxos essenciais do ômega-3 como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosaenóico (DHA) e ômega 6 como o ácido araquidônico (AA), em mediadores lipídicos pró-resolução – subdivididos nas famílias das resolvinas, protectinas e maresinas (Fig.1).

Figura 1. Vias biossintéticas dos mediadores lipídicos pró-resolução especializados (MLPRs).



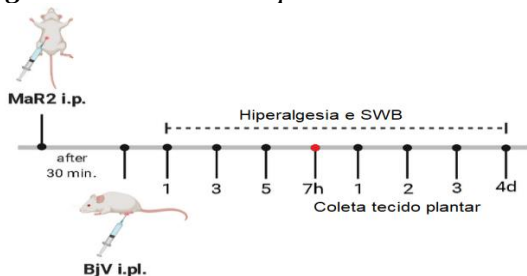
Fonte: Adaptado de Yasukawa *et al.*, 2020.

Sendo um membro da quarta família dos MLPRs, a Maresina 2 (MaR2) é produzida por macrófagos a partir do DHA e foi evidenciada e reconhecida por possuir capacidades anti-inflamatórias, analgésicas e pró-resolutivas (Dengue *et al.*, 2014); se mostrando uma abordagem farmacológica adicional a ser investigada para aprimorar o gerenciamento das reações locais associadas aos envenenamentos.

Materiais e métodos. Para este trabalho foram utilizados camundongos Swiss fêmeas de 20-25g e todos os protocolos experimentais (Fig. 2) foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA nº 103/2021). Primeiramente, foi delineada uma curva de dose-resposta para determinação da dose de BjV mais eficiente para indução do modelo, assim, os animais foram estimulados com 3 doses de BjV (0.01, 0.1 e 1 µg/i.pl.). A hiperalgisia mecânica foi avaliada pela versão eletrônica do método dos Filamentos de Von Frey e a hiperalgisia térmica foi avaliada pelo método de Placa Quente aquecida à uma temperatura de 52°C ± 1°C no tempo 0 (basal), e nos intervalos de 1, 3, 5 e 7 horas após o estímulo com BjV, e diariamente pelos próximos quatro dias. A dose de 1 µg/pata de BjV foi eleita para os seguintes experimentos. Em seguida, para determinar a melhor dose do tratamento, os animais foram tratados com 3 doses de MaR2 (0.3ng, 1ng e 3ng/animal, i.p.), 30 minutos antes do estímulo com BjV e através dos testes de hiperalgisia mecânica e térmica a dose de 3ng foi selecionada para os seguintes experimentos. Buscou-se avaliar através do SWB a distribuição de peso entre as patas traseiras após o tratamento com 3ng de MaR2 no tempo 0 (basal), e nos intervalos de 1, 3, 5 e 7

horas após o estímulo com BjV, e diariamente pelos próximos quatro dias. Para avaliar possíveis efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do pré-tratamento com MaR2, os animais foram eutanasiados e o tecido plantar foi coletado 7 horas após o estímulo com BjV e foram realizados ensaios colorimétricos de MPO, NBT e ABTS, bem como, a quantificação de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 por meio do ensaio imunoenzimático ELISA sanduíche.

Figura 2. *Protocolo Experimental*



Fonte: o próprio autor.

Resultados e discussão. Baseando-se nos testes de hiperalgisia mecânica e térmica a dose de 1 μ g/pata foi selecionada para investigar os efeitos analgésicos do tratamento com MaR2. Através do tratamento com MaR2 nas doses de 0,3, 1 ou 3ng/i.pl., 30 minutos antes do estímulo com BjV os testes de hiperalgisia mecânica e térmica foram conduzidos. O grupo salina apresentou ausência de hiperalgisia nos testes de Von Frey e placa quente. O BjV induziu hiperalgisia mecânica em todos os momentos observados, enquanto a hiperalgisia térmica esteve presente até a 7^a hora. Em relação ao tratamento, a dose de 1ng de MaR2 reduziu a hiperalgisia mecânica até o primeiro dia, enquanto a dose de 3ng foi capaz de reduzir a hiperalgisia mecânica (38,54%) e prolongar esse efeito até o segundo dia de medição. A hiperalgisia térmica foi reduzida até a 7^a hora (25,21%). Portanto, a dose de 3ng foi selecionada para os seguintes experimentos.

Com o objetivo de avaliar a dor espontânea, mudanças na distribuição de peso das patas traseiras foram observadas através do SWB. O estímulo com BjV faz com que os animais apresentem dor e, conseqüentemente, a distribuição de peso entre as duas patas traseiras se torna desigual, sendo o peso aplicado na pata sem dor. Este padrão pode ser observado da 1^a até a 7^a hora após o estímulo, enquanto o grupo previamente tratado com MaR2 foi capaz de tornar esta distribuição mais igualitária a partir da 3^a hora (34,75%), indicando em conjunto com os resultados anteriores seu papel analgésico.

Nos estágios iniciais da resposta inflamatória aguda, leucócitos polimorfonucleares (PMNs), essencialmente neutrófilos, são recrutados. PMNs no tecido inflamado podem intensificar a resposta inflamatória, além de contribuírem para o dano tecidual através da ação de suas enzimas proteolíticas e produção de radicais livres (Abbas, Pillai e Lichtman, 2019). O estímulo com BjV causou um aumento no recrutamento de neutrófilos para o tecido plantar, conforme revelado pela quantificação indireta dessas células através da presença da enzima mieloperoxidase (MPO), a elevação da produção do ânion superóxido e a redução de antioxidantes totais. Além disso, houve um aumento nos níveis das citocinas pró-inflamatórias. O tratamento com MaR2 por outro lado, foi capaz de reduzir o recrutamento de neutrófilos (42,72%) e inibiu a produção de ânion superóxido (34,58%). Além disso, houve aumento nos níveis totais de antioxidantes (29,56%) e a redução das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (100%), IL-1 β (59,39%) e IL-6 (55,73%), indicando em conjunto, os efeitos anti-inflamatórios do pré-tratamento com 3ng de MaR2.

Conclusão. Pela primeira vez, evidenciamos que o pré-tratamento com MaR2 reduz eficazmente efeitos característicos dos acidentes ofídicos envolvendo a *Bothrops jararaca* como a migração de leucócitos, a produção de espécies reativas de oxigênio e de citocinas pró-inflamatórias, ao mesmo tempo em que fortalece as defesas antioxidantes. Assim, a MaR2 se mostra uma opção promissora para o tratamento de condições inflamatórias e dolorosas associadas a picadas de serpentes, abrindo novas possibilidades para futuras intervenções terapêuticas para esse problema crítico de saúde.

Agradecimentos. Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, à CAPES, FINEP, CNPq, Fundação Araucária, e Governo do Estado do Paraná, Conselho Paranaense de Ciência e Tecnologia, e Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia, e Ensino Superior (SETI) (dotação orçamentária # 4560.19.571.06.6153; e protocolo 21.234.745-0).

Referências

Abbas, A. K.; Pillai, S.; Lichtman, A. H. *Imunologia celular e molecular*. 9. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

Deng, B., Wang, C. W., Arnardottir, H. H., Li, Y., Cheng, C. Y., Dalli, J., & Serhan, C. N. (2014). Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages. *PloS one*, 9(7), e102362. DOI: 10.1371/journal.pone.0102362

Ferraz, C. R., Carvalho, T. T., Fattori, V., Saraiva-Santos, T., Pinho-Ribeiro, F. A., Borghi, S. M., Manchope, M. F., Zaninelli, T. H., Cunha, T. M., Casagrande, R., Clissa, P. B., & Verri, W. A., Jr (2021). Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces mechanical hyperalgesia in mice with the neuroinflammatory contribution of spinal cord microglia and astrocytes. *International journal of biological macromolecules*, 179, 610–619. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.178

Instituto Butantan. Uma jararaca nada comum: conheça a maior causadora de acidentes com cobras do Brasil. butantan.gov.br, 2022. Disponível em: <<https://butantan.gov.br/bubutantan/uma-jararaca-nada-comum-conheca-a-maior-causadora-de-acidentes-com-cobras-do-brasil>>. Acesso em: Fev., 2024.

Serhan C. N. (2014). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, 510(7503), 92–101. DOI: 10.1038/nature13479