

O papel do gás sulfeto de hidrogênio no dano local agudo induzido por peçonha de *Bothrops jararacussu*

Danilo Costa Geraldes¹, Igor Rapp Ferreira da Silva¹, Mariana Leite Tamascia¹, Simone Aparecida Teixeira², Leandro Rodrigues², Marcelo Nicolas Muscará², Soraia Katia Pereira Costa², Stephen Hyslop¹

¹Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP; ²Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas I, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Sulfeto de Hidrogênio – Dano Local – *Bothrops jararacussu*

Contato: danilo.geraldes8@gmail.com

1 – INTRODUÇÃO

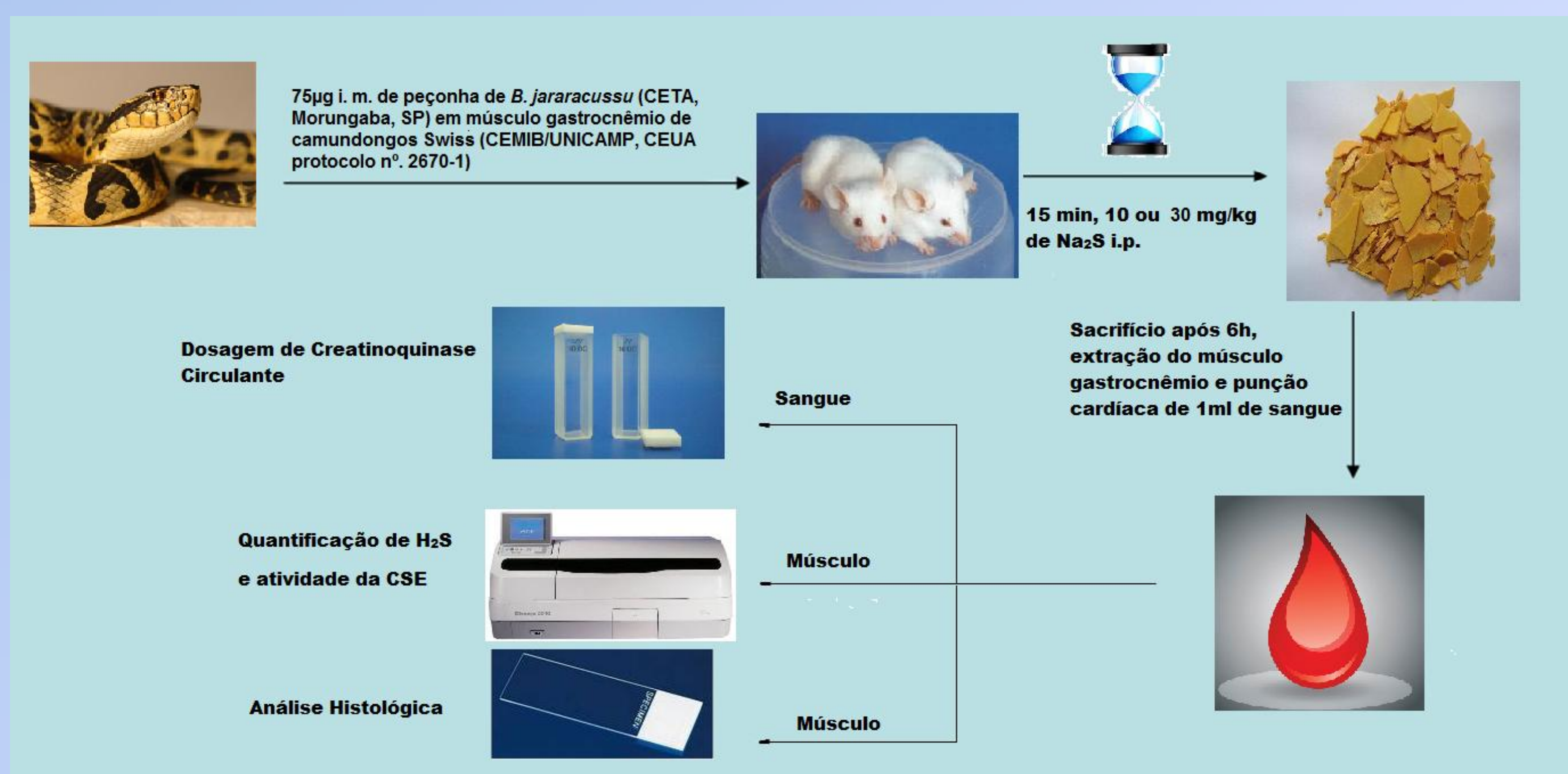
O sulfeto de hidrogênio (H₂S) endógeno é um gás volátil liberado durante a degradação da L-cisteína pela cistionina-γ-liase (CSE) e cistionina-β-liase (CBS), enzimas que são expressas em diversos tecidos de mamíferos. Vários estudos demonstram que o H₂S funciona como um gasotransmissor nos sistemas nervoso e cardiovascular. Além dos seus efeitos como vasodilatador e neurotransmissor, o H₂S possui propriedades anti-inflamatórias como a diminuição da ativação do fator nuclear κβ (NF-κβ), o que reduz a produção de mediadores inflamatórios como IL-1β e TNF-α, e na inibição da adesão e migração de leucócitos.

O envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* é caracterizado por extenso dano local que inclui dor, edema, inflamação, hemorragia e necrose. Este dano se deve principalmente à ação de fosfolipases A₂ (PLA₂) e metaloproteases. Diversos estudos têm mostrado que a lesão local é mediada pela formação e liberação de mediadores endógenos como aminas (principalmente histamina), prostaglandinas, peptídeos como a bradicinina, citocinas como interleucinas (IL)-1, -6 e -10, interferon (IFN)-γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), e o gás volátil óxido nítrico.

Tendo em vista que vários dos mediadores envolvidos na resposta local ao envenenamento botrópico são alvos de modulação pelo H₂S, neste trabalho investigamos o envolvimento deste gás na inflamação e dano local causados pela peçonha *Bothrops jararacussu* (jararacuçu), espécie amplamente distribuída no sudeste do Brasil e conhecida pela forte ação local da sua peçonha.

2 – METODOLOGIA

2.1 – Tratamento dos animais



2.2 – Quantificação de H₂S e da atividade da enzima CSE

A quantificação enzimática foi realizada conforme descrita em Zhang *et al.* (2010) e lida em fluorímetro de microplacas Spectramax M5 (excitação: 290 nm; emissão: 695 nm) (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

2.3 – Dosagem de creatinoquinase (CK)

Os níveis de CK plasmático foram determinados em amostras de sangue coletadas no momento do sacrifício (6 h após injeção da peçonha). A atividade de CK foi determinada utilizando-se kits comerciais (Bioclim, Belo Horizonte, MG, Brasil) e os resultados foram expressos em unidades de CK por litro (U/L), onde uma unidade corresponde à fosforilação de 1 nmol de creatina/min, a 37 °C.

2.4 – Análise histológica

As amostras de músculo foram fixadas em paraformaldeído 4% durante 18 h e então processados por métodos convencionais e incluídos em parafina. Secções transversais de 5 µm de espessura foram cortadas em micrótomo Leica, coradas com hematoxilina e eosina (HE), e examinadas em microscópio de luz Leica DM500B. As imagens foram captadas usando uma câmara Leica DFC 300FX CCD, e processadas e analisadas com o software de imagem Leica Q Win Plus v.3.2.0.

2.5 – Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média ± EPM, e as análises estatísticas foram feitas usando-se o teste t de Student ou ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Valores de p<0,05 indicaram significância.

3 - Resultados

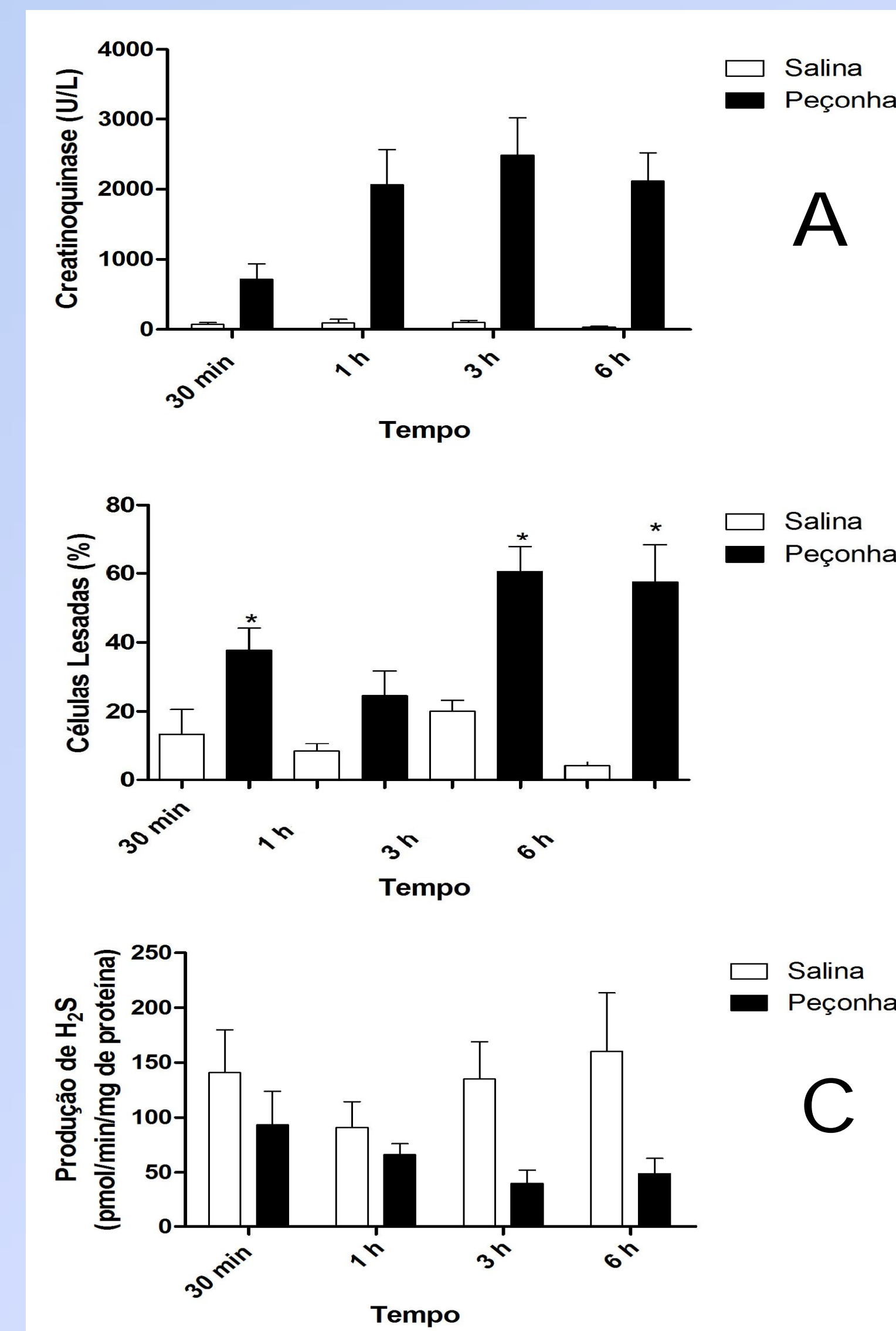


Figura 1. (A) Atividade de CK plasmático, (B) percentual de fibras musculares lesadas e (C) produção de H₂S em camundongos injetados com 75 µg de peçonha de *B. jararacussu* no músculo gastrocnêmio. As colunas representam a média ± EPM de 8-12 (A) e 3-6 (B, C) camundongos. *p<0,05 comparado com o grupo salina (controle) correspondente.

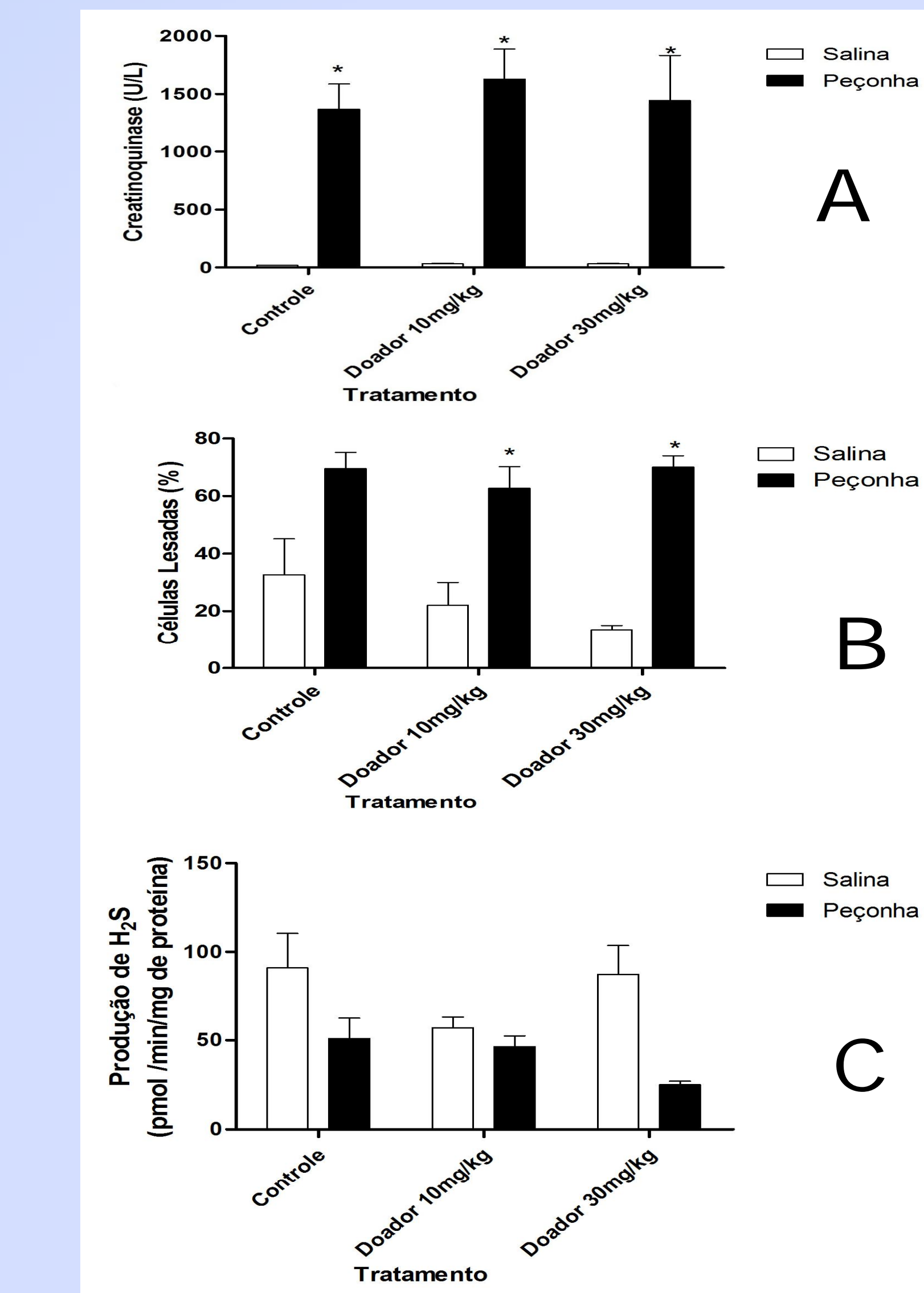
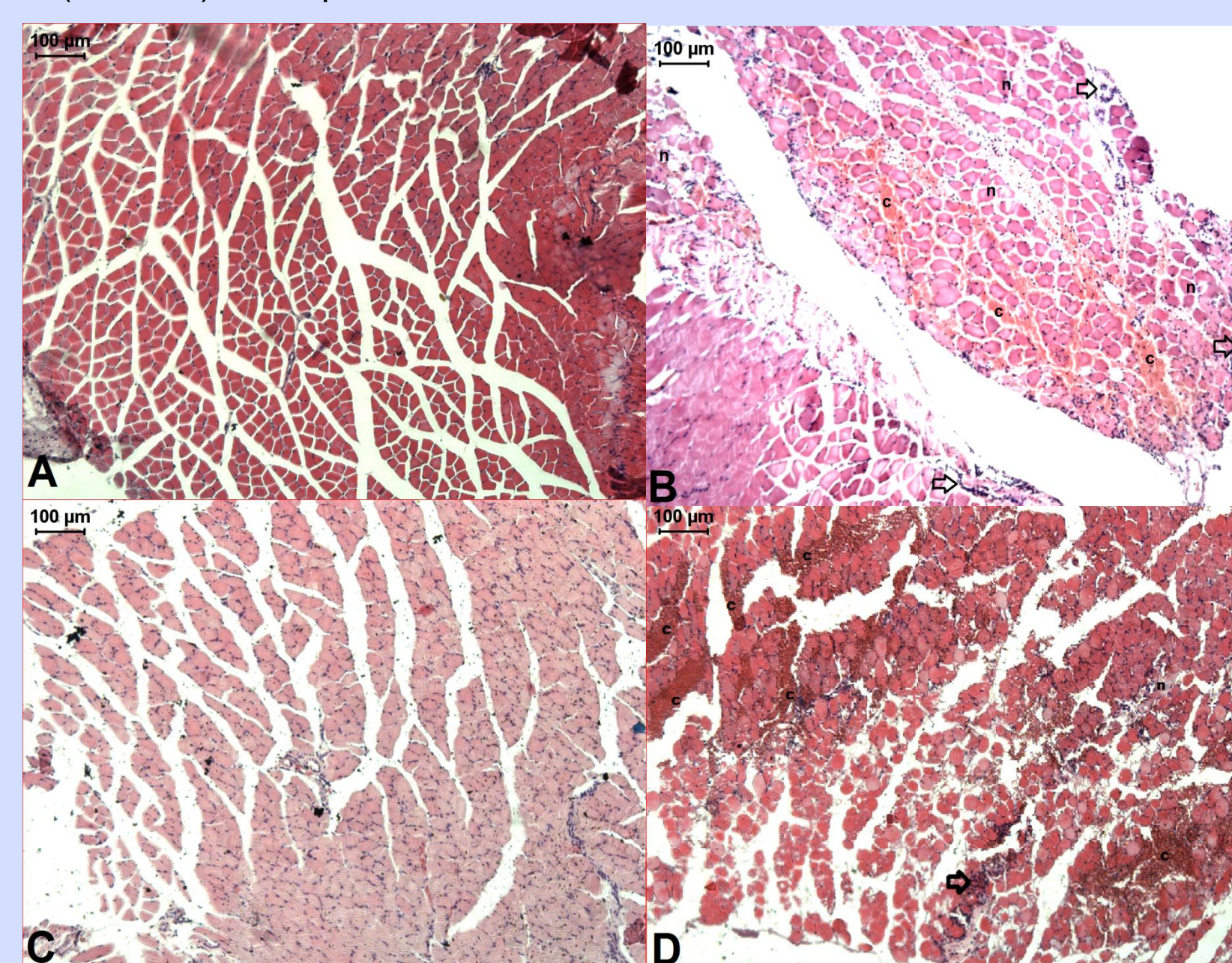


Figura 2. (A) Atividade de CK plasmático, (B) percentual de fibras musculares lesadas e (C) produção de H₂S em camundongos injetados com 75 µg de peçonha de *B. jararacussu* no músculo gastrocnêmio e que receberam de Na₂S (10 mg/kg ou 30 mg/kg, i.p.). As colunas representam a média ± EPM de 8-9 (A), 3-4 (B) e 3-5 (C) animais. *p<0,05 comparado com o grupo salina correspondente.

Figura 3. Músculo gastrocnêmio de camundongos tratados com salina (A), peçonha (75 µg; B), salina+Na₂S (30 mg/kg, i.p.; C) e peçonha+Na₂S (D). Tempo de sacrifício: 6 h. Setas: células inflamatórias (infiltrado), c: hemorragia; n: necrose. Coloração: HE.

4 – Conclusão

Os resultados deste estudo mostram que a lesão local causada pela peçonha de *B. jararacussu* em músculo esquelético de camundongo é acompanhada por uma redução na produção do gás H₂S. O tratamento dos animais com Na₂S 15 min após a injeção de peçonha não modificou de forma significativa a lesão muscular e os níveis circulantes de CK. Estes achados apontam para um papel reduzido do H₂S na lesão local causada por peçonha botrópica, especialmente quando comparado com o óxido nítrico, cujo papel neste fenômeno é bem conhecido.

Referências

- Milani Júnior R, Jorge MT, de Campos FP, Martins FP, Bouso A, Cardoso JL *et al.* (1997) *Q. J. Med.* **90**, 323-334.
Whiteman M, Winyard PG (2011) *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **4**, 13-22.
Zhang J, Sio SWS, Moochhala S, Bhatia M (2010) *Mol. Med.* **16**, 417-424.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES, FAPESP