

NANCY GIMENES DA SILVA

Efeito do veneno de *Crotalus durissus terrificus* no edema crônico induzido na pata de camundongos pela injeção de Bacilo Calmette-Guérin (BCG)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**São Paulo
2012**

NANCY GIMENES DA SILVA

Efeito do veneno de *Crotalus durissus terrificus* no edema crônico induzido na pata de camundongos pela injeção de Bacilo Calmette-Guérin (BCG)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:

Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador:

Dr. Luís Roberto de Camargo Gonçalves

**São Paulo
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Silva, Nancy Gimenes da

Efeito do veneno de *Crotalus durissus terrificus* no edema crônico induzido na pata de camundongos pela injeção de bacilo Calmette-Guérin (BCG) / Nancy Gimenes da Silva - São Paulo, 2012.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientador: Luís Roberto de Camargo Gonçalves

1. *Crotalus* 2. Inflamação 3. Edema 4. Lipoxinas 5. Crotoxina
6. Ações farmacológicas

SES/CCD/CD-262/12

DEDICATÓRIA

A Deus

“Deus é o autor da ciência. As pesquisas científicas abrem a mente vastos campos de pensamento e informação, habilitando-nos a ver a Deus em Suas obras criadas”.

A ignorância pode tentar apoiar o ceticismo apelando para a ciência; mas em vez de apoiar o ceticismo, a verdadeira ciência contribui com novas evidências da sabedoria e poder de Deus. Devidamente compreendida, a ciência e a palavra escrita concordam, e cada uma faz incidir luz sobre a outra. Juntas, levam-nos a Deus, ensinando-nos algo das sábias e beneficentes leis por intermédia das quais Ele opera . E.G.White.

Aos meus pais

“A verdadeira educação não desconhece o valor dos conhecimentos científicos ou aquisições literárias; mas acima da instrução aprecia a capacidade, acima da capacidade a bondade, e acima das aquisições intelectuais o caráter. O mundo não necessita de homens de grande intelecto, como de nobre caráter. Necessita de homens em que a habilidade é dirigida por princípios firmes”. E.G.White

Obrigada, pai e mãe, por ter mostrado estes princípios em suas vidas.



AGRADECIMENTOS



To Sir with Love - Luis

Those school girl days
Of telling tales
And biting nails are gone
But in my mind
I know they will still live on and on
But how do you thank someone
Who has taken you from crayons to perfume
It isn't easy, but I'll try



If you wanted the sky I'd write across the sky in letters
That would soar a thousand feet high
To Sir, with love

The time has come
For closing books
And long last looks must end
And as I leave
I know that I am leaving my best friend
A friend who taught me right from wrong
And weak from strong
That's hard to learn
What, what can I give you in return?



If you wanted the moon I'd try to make a star
But I would rather you let me give my heart
To Sir, with love



Pensamento

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.” (Carl Gustav Jung)

RESUMO

Diferentemente do observado em outros envenenamentos por serpentes da família Viperidae, nos causados pela Cdt não se observam sinais inflamatórios significativos no local da picada. Estudos prévios mostram que o VCdt inibe a resposta inflamatória aguda e algumas atividades biológicas de macrófagos, principal célula do processo inflamatório crônico. Nesse trabalho verificou-se o efeito do VCdt sobre o edema de pata crônico induzido pela injeção intraplantar de BCG em camundongos. Na concentração utilizada, o BCG evoca um edema crônico que é significativamente inibido pelo pré-tratamento dos animais com o VCdt (s.c.). Essa inibição persistiu por todo o período estudado (15 dias). O grupo que recebeu o veneno 1 h após a injeção de BCG também apresentou perfil de edema inibido em relação ao grupo controle, de forma semelhante ao observado no grupo pré-tratado com o veneno. Os grupos tratados com o VCdt 6 ou 11 dias após a injeção do BCG apresentavam edema de magnitude semelhante até o dia da injeção do veneno, sendo observada uma inibição significativa desse edema no dias subseqüentes à injeção do veneno. Uma vez constatado esse efeito inibitório do VCdt sobre o edema inflamatório crônico induzido pelo BCG, estudou-se qual a fração do veneno seria responsável por esse efeito. Os resultados indicam que a crotoxina, e não outros componentes deste veneno seja a responsável por essa inibição. Estudando-se possíveis mecanismos envolvidos nessa inibição, a reversão da inibição induzida pelo VCdt observada em grupos pré-tratados com dexametazona e zileuton, sugerem fortemente a participação de mediadores originados na via das lipoxigenases, no efeito inibitório do VCdt sobre esse modelo de inflamação crônica. Em conclusão, os resultados indicam que a crotoxina do VCdt possui uma significativa ação inibitória sobre o edema crônico induzido pelo BCG, possivelmente pela geração de mediadores antiinflamatórios da via das lipoxigenases.

Palavras-Chave: inflamação crônica; *edema*; *BCG*; *Crotalus durissus terrificus*; *veneno de serpente*; *crotoxina*

ABSTRACT

Unlike others envenoming induced by Viperidae snakebites, in the one caused by *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) significant inflammatory signs at the site of the bite are not observed. Previous studies have shown that the venom (V) of this snake inhibits the acute inflammatory response induced by other phlogistic agents, such as thioglycollate and carrageenan, as well as inhibits some biological activities of macrophages, the main cell in the chronic inflammatory process. Here, we study the effect of VCdt on the chronic paw edema induced by intraplantar injection of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) in mice. At the concentration used, BCG evokes a chronic edema, which was significantly diminished in animals pretreated subcutaneously with VCdt. This inhibition persisted throughout the study period (14 days). In group that received the venom 1 h after injection of BCG the edema profile was also diminished when compared to the control group, as observed in the group pre-treated with the venom. In mice treated with VCdt 6 or 11 days after injection of BCG, we observed a significant inhibition of edema only in the days after the venom injection. Once verified the inhibitory effect of the VCdt on chronic inflammatory edema induced by BCG, we studied what fraction or toxin would be responsible for this effect. The results indicate that crotoxin, and not other components of this venom, is the responsible by this effect. Studying possible mechanisms involved in this inhibition, we observed that pre-treatment with dexamethasone or zileuton abrogate the inhibitory effect of VCdt on the edema induced by BCG. These results strongly suggest that the VCdt can stimulate the generation of mediators from the lipoxygenase pathway, which can act on the edema of this model of chronic inflammation. In conclusion, the results indicate that crotoxin of the VCdt has a significant inhibitory effect on BCG-induced chronic edema, possibly by the generation of inflammatory mediators from the lipoxygenase

Key Words: chronic inflammation; edema; BCG; Crotalus durissus terrificus; snake venom; crotoxin

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	antiinflamatórios não-esteroides
AP-1	ativador proteína 1
a.c.	antes de Cristo
ADP	difosfato de adenosina
BCG	bacilo calmette guérin
CA	crotoxina A
CB	crotoxina B
Cdt	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
COX 1	ciclo-oxigenase 1
COX 2	ciclo-oxigenase 2
CK	creatinina quinase
CTX	crotoxina
C3b	fragmentos do sistema complemento
d.c.	depois de Cristo
DHL	dehidrogenase láctica
DNA	ácido desoxirribonucleico
Dexa	dexametasona
E(%)	aumento percentual
et.al	em conjunto com
FPLC	cromatografia líquida de rápido desempenho
FLA2	fosfolipase A2
Fc	fator complemento
g	grama
h	hora
HCl	cloreto de hidrogênio
HETE	ácido hidro-eicosatetraenóico
HPETE	ácido hidroxiperoxi-eicosatetraenóico
IFN γ	interferon γ
IL	interleucina
indo	indometacina

iNOS	óxido nítrico síntese induzido
i.p	intra peritoneal
i.pl	intra plantar
Kappa	receptor opióide
KDa	quilodalton
Kg	quilograma
M	mol
MCP-1	quimiocina - 1
MF	medida final
mg	miligrama
MI	medida inicial
min	minuto
ml	mililitro
mM	mimolar
NaCl	cloreto de sódio
PGD2	prostaglandina D2
PGE2	prostaglandina E2
PGI	prostaciclina
s.c.	sub cutâneo
SDC-PAGE	gel de poliacrilamida com dodocil sulfato de sódio
TGF α	fator transformante de crescimento α
TNF α	fator de necrose tumoral α
Vcdt	veneno crotalus durissus terrificus
v.o.	via oral
μ g	micrograma
μ l	microlitro
%	percentual

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	14
Figura 2 - Geração dos metabólitos do ácido aracdônico e seu papel na inflamação.....	21
Figura 3 - Vias de medicações e seu bloqueios.....	22
Figura 4 - Camundongos receberam VCdt (s.c.) 1 hora antes a injeção i.pl de BCG (8×10^5 bacilos/pata em 30 μ L) e o edema foi medido com paquímetro urante 15 dias e comparados a grupos controle tratados com salina; n= 5 animais/grupo; *p<0.05 (ANOVA 1 via seguido de Bonferroni).....	32
Figura 5 - Camundongos receberam VCdt (s.c.) 1 hora após a injeção i.pl de BCG (8×10^5 bacilos/pata em 30 μ L) e o edema foi mensurado com paquímetro durante 15 dias e comparados a grupos controle tratados com salina. N= 5 animais/grupo; *p<0.05 (ANOVA 1 via seguido de Bonferroni).	32
Figura 6 - Camundongos receberam VCdt (s.c.) 6 dias após a injeção i.pl de BCG (8×10^5 bacilos/pata em 30 μ L) e o edema foi mensurado com paquímetro durante 15 dias e comparados a grupos controle tratados com salina; n= 5 animais/grupo; *p<0.05 (ANOVA 1 via seguido de Bonferroni). 33	33
Figura 7 - Camundongos receberam VCdt (s.c.) 11 dias após a injeção i.pl de BCG (8×10^5 bacilos/pata em 30 μ L) e o edema foi mensurado com paquímetro durante 15 dias e comparados a grupos controle tratados com salina; n= 5 animais/grupo; *p<0.05 (ANOVA 1 via seguido de Bonferroni). 33	33
Figura 8 - Grupos pré-tratados (1 hora antes) com salina (controle), VCdt (controle de inibição positiva) ou frações – PI, PII (crotoxina - CTX), PIII. O edema induzido pela injeção i.pl de BCG (8×10^5 bacilos/pata em 30 μ L) foi medido com paquímetro durante 24 horas; n=5/grupo; *p<0.05 (ANOVA 1 via seguido de Bonferroni).	34
Figura 9 - Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de BCG (8×10^5 bacilos/pata em 30 μ L) em grupos tratados com dexametasona (Dexa) - 1mg/kg, i.p., 1 hora antes de receberem, pela via s.c., VCdt ou salina. O BCG foi injetado 1 hora após o tratamento com VCdt ou salina e o edema foi medido com paquímetro durante 48 horas; n=4/grupo; *p<0.05 (ANOVA uma via seguido de Bonferroni).	36
Figura 10 - Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de BCG (8×10^5 bacilos/pata em 30 μ L) em grupos tratados com indometacinana (Indo) – 3 mg/kg, i.p., 1 hora antes de receberem, pela via s.c., VCdt ou salina. O BCG foi injetado 1 hora após o tratamento com VCdt ou salina e o edema foi	

medido com paquímetro durante 48 horas; n=4/grupo; *p<0.05 (ANOVA uma via seguido de Bonferroni). 37

Figura 11 - Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de BCG (8×10^5 bacilos/pata em 30 μ L) em grupos tratados com zileuton (Zyle) – 100 mg/kg, v.o., 1 hora antes de receberem, pela via s.c., VCdt ou salina. O BCG foi injetado 1 hora após o tratamento com VCdt ou salina e o edema foi medido com paquímetro durante 48 horas; n=4/grupo; *p<0.05 (ANOVA uma via seguido de Bonferroni). 37

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	14
1.1 Inflamação	18
1.2 Mediadores da inflamação	18
1.3 Fármacos anti-inflamatórios	21
1.4 Inflamação Crônica	22
1.5 Inflamação e veneno crotálico	22
2. OBJETIVO	26
2.1 Como objetivo específico	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Animais	27
3.2 Veneno e Toxinas	27
3.3 Agente flogístico	28
3.4 Planejamentos Experimentais	28
3.5 Edema	29
3.6 Análise Estatística	30
4. RESULTADOS	31
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	43
7. BIBLIOGRAFIA	44
ANEXOS	

INTRODUÇÃO

No Brasil, as serpentes do gênero *Crotalus* causam o segundo maior número de acidentes por ofídicos peçonhentos notificados, com cerca de 8% dos casos, sendo que, no estado de São Paulo (região de Ribeirão Preto e Botucatu), a porcentagem de acidentes por esta sub-espécie aumenta para 25% (Barravieira,1990). A maioria destes acidentes é provocada pela espécie *Crotalus durissus terrificus* (Cdt), e são considerados os acidentes ofídios mais graves em nosso País (Ministério da Saúde, 2001).



Figura 1 - Serpente *Crotalus durissus terrificus*

Por possuir um veneno predominantemente neurotóxico, miotóxico, os sintomas observados em pacientes após a picada pela Cdt caracterizam-se pelo aparecimento do chamado “facies miastênico” ou “facies neurotóxico”, com ptose palpebral, diplopia, flacidez da musculatura facial e paralisia dos nervos cranianos (Rosenfeld, 1971; Azevedo-Marques et al., 2009). Além destes sintomas neurotóxicos, esse envenenamento pode

apresentar distúrbios hemostáticos, rabdomiólise, e alterações renais, podendo haver insuficiência renal em casos graves (Azevedo-Marques et al., 2009).

A resposta sistêmica desse envenenamento resulta da ação das principais toxinas identificadas no veneno de Cdt. Dentre elas estão a crotoxina, a giroxina, a crotamina e a convulxina.

A crotoxina é o componente majoritário presente no veneno de Cdt, tendo sido esta a primeira toxina isolada de um veneno ofídico (Slotta e Franquel-Conrad, 1938). Essa toxina é uma β -neurotoxina heterodimérica, formada pela união não covalente de duas subunidades, uma fosfolipase A₂ (FLA₂-CB) e uma proteína chaperona, sem atividade tóxica ou enzimática, denominada de crotapotina (CA). A crotoxina apresenta uma massa molecular de 24 a 26 KDa, ponto isoelétrico de 4,7 e apresenta atividade neurotóxica que, pela sua ação nas terminações nervosas motoras, inibe a liberação de acetilcolina pelos impulsos nervosos, sendo a responsável pelo bloqueio neuromuscular (Vital Brazil, 1972). Possui também uma potente atividade miotóxica sistêmica (Gopalakrishnakone, 1984; Stoker, 1990).

A crotapotina (subunidade CA) possui massa molecular de 8.9 KDa, com ponto isoelétrico de 3.4, não possui atividade enzimática e tóxica. Em relação a sua função, existem evidências de que CA pode agir como uma molécula carreadora, potencializando atividade letal de CB, porém com diminuição da atividade enzimática dentro do complexo crotoxina (Bon et al., 1989; Choumet et al., 1996).

A giroxina, assim denominada por induzir em camundongos movimentos giratórios ao longo do seu eixo longitudinal (Barrio, 1961), foi posteriormente identificada como o componente do veneno que apresenta atividade coagulante do tipo-trombina (Alexander et al., 1988), sendo a responsável pelo quadro de incoagulabilidade sanguínea presente em aproximadamente 40% dos pacientes envenenados. A giroxina, uma glicoproteína com massa molecular de 33 a 35 KDa, é um componente tóxico e não letal do veneno crotálico.

Crotamina e convulxina são outras toxinas isoladas do veneno de

Cdt, porém seus efeitos não são identificados nas manifestações do envenenamento humano. A crotamina causa paralisia espástica, quando injetada na cavidade peritoneal de camundongos (Barrio e Brazil, 1950; Laure, 1975). É uma proteína com massa molecular de 4.8 KDa e ponto isoelétrico de 10.3, representa 17% do peso do veneno total (Moura-Gonçalves e Arantes, 1956). Já a convulxina é uma glicoproteína que representa 5% do peso do veneno e está associada a crises convulsivas quando injetada pela via endovenosa em camundongos. Essa toxina mostrou-se um potente agente agregante sobre plaquetas (Prado-Franceschi e Vital Brazil, 1981).

Ação miotóxica do veneno de Cdt é atribuída à crotoxina e à crotamina. A capacidade de produzir lesões sistêmicas no tecido muscular esquelético foi comprovada pela biópsia de material retirado em local diferente do da picada, onde a microscopia óptica apresentou fibras necróticas misturadas a fibras aparentemente normais (Salvini et al, 2001). Alterações séricas de CK e DHL e suas isoenzimas, sugeriam também agressão preferencial as fibras do tipo I ou IIa, mas existem fortes evidências que não ocorram lesões ao músculo cardíaco (Azevedo Marques et al., 2009).

Diferente do observado em outros envenenamentos por serpente da família Viperidae, nos causados pela Cdt não se observam sinais significativos no local da picada (Amorim et al, 1951; Rosenfeld, 1971; Azevedo-Marques et al., 2009). Informações colhidas da literatura têm mostrado que o veneno de Cdt ou substâncias isoladas deste veneno são capazes de interferir na resposta inflamatória e imune, além de um potente efeito analgésico do tipo opióide (Giorgi e col, 1993).

Além de não causar dor intensa, o veneno mostrou-se capaz de causar analgesia em humanos, sendo utilizado no tratamento de algias de origem neoplásica, principalmente no início do século passado (Brazil, 1934; Brazil, 1950). Estudos demonstraram a participação de receptores opióides (Giorgi et al., 1993) do tipo *delta* (Picolo et al., 2000) no efeito analgésico observando em modelo de placa quente. Tem sido demonstrada a ação

analgésica do veneno de Cdt em dores crônicas. Exemplo disto são as dores neuropáticas, como também as de origem neoplásica (Nogueira Neto et al., 2008 ; Sampaio et al., 2010).

Os efeitos sobre o sistema imune foi evidenciado que o veneno de Cdt ou a crotoxina apresentam ação supressora sobre a resposta imunológica humoral (Cardoso & Mota, 1997), onde foi observado decréscimo nos níveis de anticorpos anti-ovoalbumina e que a ausência de resposta inflamatória local em envenenamentos experimentais não está relacionada à produção endógena de glicocorticóides (Cardoso e Mota, 1997; Cardoso et al, 2001).

Estudos sugerem que a crotapotina (componente CA da crotoxina) inibe, *in vitro*, a proliferação de linfócitos, e este efeito é atribuído à produção de prostaglandina E₂ por macrófagos (Garcia et al., 2003).

Além disso, Landucci e colaboradores (1995) mostraram que a crotapotina inibe o edema de pata de ratos induzido por carragenina ou por fosfolipases A₂ isoladas de venenos animais.

Sousa-e-Silva et al (1996) e Sampaio et al (2001) demonstraram que o veneno de Cdt injetado no subcutâneo de animais, além de não induzir uma resposta inflamatória significativa, inibe o efeito de espraiamento e a atividade fagocítica de macrófagos, um importante componente do processo inflamatório agudo e crônico. Estudos posteriores demonstraram que a crotoxina é a responsável por esse efeito inibitório (Sampaio et al., 2003) e existem fortes evidências de que esta inibição seja mediada pela geração de lipoxina (Sampaio et al, 2006). A administração de VCdt em camundongos, imediatamente após a administração intraperitoneal de tioglicolato, induz a diminuição do número de leucócitos que migram para a cavidade peritoneal, além de induzir a inibição *in vitro* do espraiamento e da capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais (Sousa-e-Silva, 1996).

Experimentos mostram que o veneno de Cdt e a crotoxina diminuem a intensidade do edema de pata agudo induzido por carragenina. Essa resposta inibitória é de longa duração e depende da ativação de receptores de peptídeos formílicos (Nunes et al, 2007, Nunes et al., 2010).

1.1 Inflamação

Há relatos históricos e arqueológicos que estas descrições clínicas da inflamação foram encontradas em papiros egípcios, aproximadamente 3000 a. C.

Celsius, século I d.c., foi o primeiro autor a relatar os quatro sinais cardiais da inflamação, que devido ao aumento de fluxo sanguíneo e a dilatação dos vasos, apresenta: rubor; devido ao aumento da permeabilidade vascular: tumor; como resultado do aumento da temperatura local: calor e pela passagem de células do sangue circulante no local da injúria: dor (Rocha-e-Silva e Garcia-Leme, 1972). Posteriormente, a perda de função foi acrescentada por Virchow, como o quinto sinal clínico.

Define-se a inflamação como uma reação do tecido vivo vascularizado a uma injúria, podendo a lesão ser causada por estímulos mecânicos, químicos, por invasão de microorganismos ou a hipersensibilidade (Kumar et al. 2005). Trata-se de um processo fisiológico, que inclui a liberação de substâncias pró- e anti-inflamatória pelo organismo afetado, na tentativa de regular o processo, retornando a homeostasia (Cabral et al., 2005). Dependendo do tipo e persistência do agente lesivo, a resposta inflamatória pode ser classificada como aguda ou crônica (Kumar et al., 2005).

Diferente da resposta imune, a inflamação é uma resposta inespecífica e não possui memória (Rankin, 2004), e encontramos comprometimentos de eventos vasculares, celulares e linfáticos (Osborn, 1990).

1.2 Mediadores da inflamação

Vários eventos se apresentam na resposta inflamatória caracterizada por uma vasoconstrição imediata seguida de um aumento do fluxo sanguíneo devido à vasodilatação. O aumento da permeabilidade

vascular é presente neste momento levando a um extravasamento de proteínas plasmáticas, ocasionando formação de edema e também a migração de células inflamatórias para o local. (Kumar et. al. 2005).

Estes eventos ocorrem principalmente devido a presença de substâncias endógenas liberadas após o estímulo que levou a lesão, os quais denominaram de mediadores inflamatórios (Saadi et al.,2002).

Os primeiros mediadores a serem liberados no processo inflamatórios são as aminas vasoativas, histamina e serotonina. A histamina pré-formada se faz presente em mastócitos e é liberada pela desgranulação dessas células após estímulo vários, tendo como consequências a dilatação das arteríolas e o aumento na permeabilidade das vênulas. A serotonina (5-hidroxitriptamina) é um mediador que se assemelha á histamina, sendo liberada por plaquetas quando ocorre agregação plaquetária após contato com colágeno, trombina, difosfato de adenosina (ADP) ou complexo antígeno-anticorpo (Kumar et al.,2005).

Pela ação da enzima fosfolipase A_2 sobre fosfolípidios de membrana são produzidos os mediadores lipídicos, ocorrendo degradação de ácido araquidônico e liberação de seus derivados, os eicosanoides que são mediadores de diversas condições patológicas especialmente nos processos inflamatórios (Cabral et al., 2005).

Dentre os eicosanoides, a prostaglandina E_2 (PGE_2), está envolvida no processo de dor, possui efeito vasodilatador que, em combinação com outros agentes, causa extravasamento de fluídos para tecidos adjacente provocando edema. Outro derivado é a prostaciclina (PGI_2) encontrada na parede dos vasos, além de ser um inibidor de agregação plaquetária, possui efeito vasodilatador e causa aumento do fluxo em vênulas pós-capilares (Majno e Joris, 2004). A PGD_2 é o principal metabólito da via da ciclooxigenase e causa vasodilatação e aumento da permeabilidade das vênulas pós-capilares potencializando o edema (Kumar et. al., 2005).

As lipoxinas, mediadores também gerados, pela via das lipoxigenase, também possuem atividade anti-inflamatórias. A lipoxina A_4

inibe a migração de neutrófilos, a liberação de interleucinas-1 β (1L-1 β) por essas células (Moncada, 1992) e ainda estimula a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos (Godson et al, 2000). As lipoxinas A4 e B4 são geradas pela ação das enzimas 12-lipoxigenase de plaquetas ou da 5-lipoxigenase de macrófagos sobre o leucotrieno A4 liberado pelos neutrófilos (Serhan e Sheppard, 1990; Levy et al., 1993; Bonnans et al., 2002) .

As principais ações das lipoxinas são inibir o recrutamento leucocitário e os componentes celulares da inflamação, retardando a entrada de novos leucócitos nos locais inflamados, inibindo a quimiotaxia dos neutrófilos e sua adesão ao endotélio (Kumar et. al., 2005; Serhan e Savill, 2005). As lipoxinas que possuem uma relação inversa entre a quantidade de leucotrienos formados, sugerindo que as mesmas possam ser reguladores negativos da ação dos leucotrienos (Serhan e Savill, 2005).

No processo inflamatório há ainda uma nova classe de mediadores derivados do ácido araquidônico, as resolvinas, elas inibem o recrutamento e ativação dos leucócitos, em parte através da inibição das citocinas (Kumar et. al., 2005; Serhan e Savill, 2005).

Em conjunto, a ação dos mediadores pró- e anti-inflamatórios podem conduzir a resposta inflamatória aguda para a sua resolução completa. Caso haja uma considerável destruição tecidual, pode haver a substituição do tecido afetado por tecido conjuntivo, ou seja, por uma cicatrização do tecido. Ainda, caso a resposta inflamatória persista devido à persistência do agente flogístico ou ausência de cicatrização, pode haver uma evolução para um processo inflamatório crônico (Kumar et al., 2005).

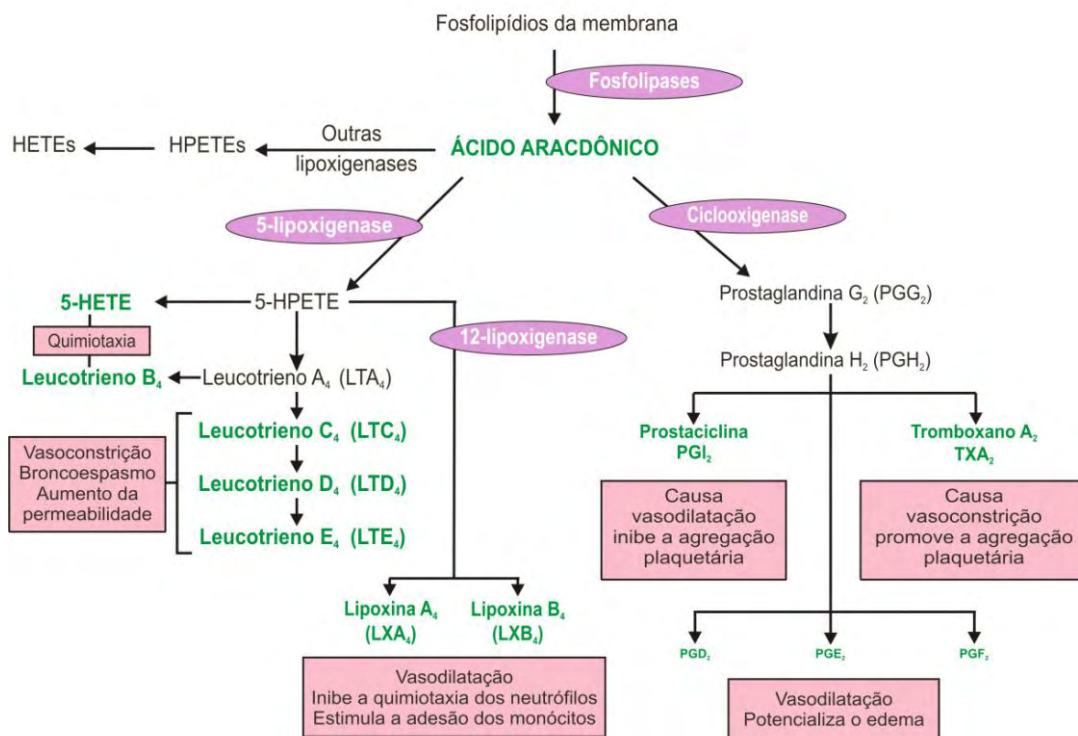


Figura 2 - Geração dos metabólitos do ácido araquidônico e seu papel na inflamação

1.3 Fármacos anti-inflamatórios

Dexametasona – é um fármaco anti-inflamatório esteroide, que age ligando-se a receptores específicos de alta afinidade que após a interação o receptor ativado migra para o núcleo e liga-se a elementos de resposta aos esteroides no DNA. Ocorre repressão ou indução da transcrição gênica, a repressão é obtida através da inibição da ação de fatores de transcrição como AP-1 (ativador protein-1) e NF- κ B (nuclear fator-Kappa B), que inibem os genes da COX-2, de várias citocinas e fatores de moléculas de adesão, bem como a iNOS (Rang et al., 2004). A indução da transcrição gênica promove o aumento da síntese de uma proteína, a lipocortina-1 ou anexina-1, que exerce efeito de inibição sobre a expressão da fosfolipase A2, seguido de uma diminuição da produção de produtos derivados do ácido araquidônico, tanto os gerados pela via da ciclooxygenase como da lipoxigenase (Czock et al., 2005).

Indometacina – fármaco anti-inflamatório não esteroidais (AINES)

que inibe as enzimas COX-1 e COX-2 impedindo dessa forma a síntese de prostanóides e tromboxanos (Rang et al., 2004).

Encontramos também entre os anti-inflamatórios não esteroidais o Celecoxib que inibe especificadamente a COX-2, que impede a síntese de prostaglandinas, evitando reações adversas que afetam particularmente o trato gastrointestinal como observado como o uso de um anti-inflamatório não seletivo para cicloxigenase (Rang et. al., 2004).

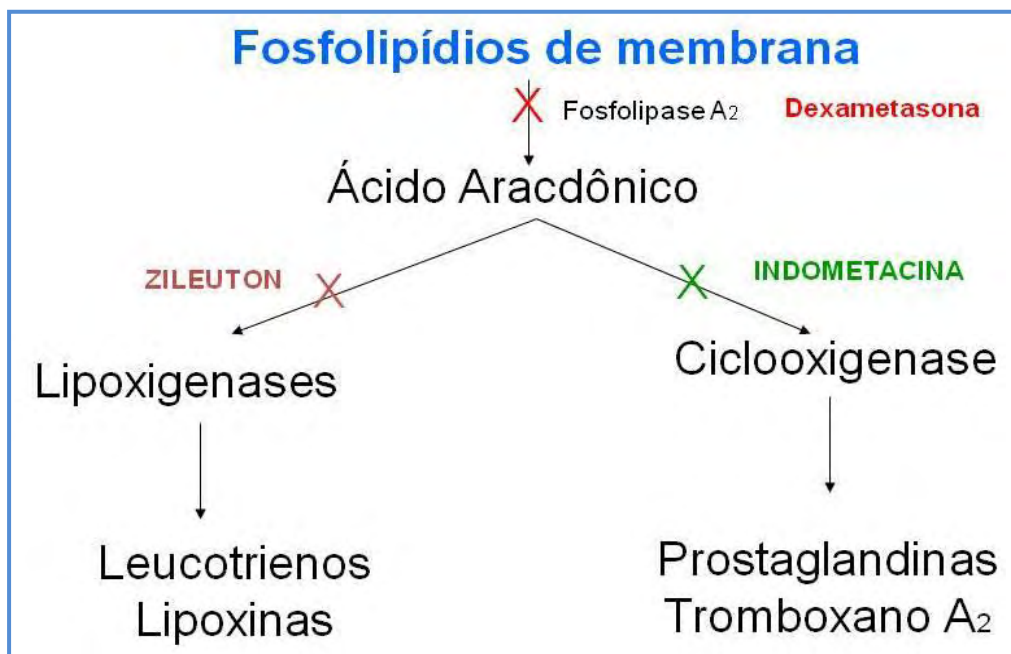


Figura 3 - Vias de medicações e seu bloqueios

1.4 Inflamação Crônica

Embora haja dificuldades em definir efetivamente uma inflamação crônica ela é considerada uma inflamação prolongada, onde ocorrem simultaneamente a inflamação ativa, a destruição de tecido e a tentativa de reparar a injuria. A inflamação crônica, embora seja decorrente de uma inflamação aguda, ocorre de maneira insidiosa, assintomática e com uma reação não tão intensa (Kumar et al., 2005).

A inflamação crônica pode ser decorrente de infecções persistentes pela presença determinados microrganismos, vírus, fungos e

parasitas; da exposição prolongada a substâncias tóxicas, exógenas ou endógenas; ou de doenças autoimunes.

Diferente da inflamação aguda, em que observamos alterações vasculares e infiltrado celular predominante de neutrófilos, a inflamação crônica é caracterizada por presença de infiltrado de células mononucleares, como macrófagos, plasmócitos e linfócitos. Pode haver também destruição tecidual, como resultado da presença persistente do agente nocivo ou pela presença das células inflamatórias e a substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, com o objetivo de efetuar a cicatrização, resultado da angiogênese e, em particular, fibrose.

Na inflamação crônica, diferente da aguda, ocorre um acúmulo de macrófagos que se mantêm onde há diversos fatores agindo. Os macrófagos presente, na sua maioria são recrutados entre os monócitos circulantes. Este recrutamento é resultado da expressão das moléculas de adesão e fatores quimiotáticos, sendo os macrófagos uma vez ativados por citocinas das células T, especialmente o IFN γ ou por outro estímulo sendo este não imunológico, como a endotoxina, e outros tipos de células ativadas – MCP-1: fatores de crescimento e TGF- α ; fragmentos da degradação do colágeno e fibronectina; e fibrinopeptídeos todos podem estar ou não envolvidos depende da situação (Kumar et al., 2005).

Os macrófagos são componentes do sistema mononuclear fagocitário. Este sistema consiste em células intimamente relacionadas que se originam na medula óssea, incluindo monócitos sanguíneos e macrófagos teciduais (Kumar et al., 2005). Os macrófagos são caracterizados morfológicamente como uma célula grande, medindo entre 25-50 μ m de diâmetro, núcleo irregular e excentricamente posicionado, com um ou dois nucléolos e cromatina dispersa (Ross e Auger, 2002). Apresenta complexo de Golgi bem desenvolvido, em posição justa nuclear, número variável de vesículas, caracterizadas pela sua ação secretora, pela mobilidade e por serem células com grande capacidade fagocítica (Gordon, 1986; Ross e Auger, 2002)

Essas células têm um importante papel na resposta inflamatória e

imunológica e são encontradas em diversos órgãos e tecidos, bem como em cavidades serosas como o peritônio. Em tecidos ou órgãos, estas células permanecem quiescentes como células residentes, com baixa atividade funcional, e tornam-se ativadas através de estimulação inflamatória ou imunológica (Hamilton, 2002).

Os microrganismos, agentes nocivos ao organismo são eliminados pelos produtos dos macrófagos ativados e a seguir inicia-se a processo de reparação, sendo também responsáveis em grande parte pela lesão tecidual na inflamação crônica. Estes mesmos produtos tóxicos para o microrganismo também o são para as células do hospedeiro ou matriz extracelular (proteases); algumas causam liberação de citocinas e/ou fatores quimiotáticos; enquanto outras causam proliferação de fibroblastos, com deposição de colágeno e angiogênese (Kumar et.al.,2005)

A proliferação local dos macrófagos ocorre de maneira efetiva em algumas lesões inflamatórias crônicas, como as placas de ateroma como também através de determinadas citocinas e lipídios oxidados podem levar a imobilização dos macrófagos no local de inflamação.

1.5 Inflamação e Veneno Crotálico

Estudos demonstram que o veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* possui um efeito anti-inflamatório quando utilizado em modelos de inflamação aguda, mas, até o momento, não existem informações sobre o possível efeito desse veneno sobre a inflamação crônica.

Estudos preliminares sugerem que no veneno crotálico possa interferir em processos inflamatórios crônicos, uma vez que, em animais tratados sistematicamente com este veneno ocorre uma inibição da migração de macrófago para membranas de nitrocelulose ou lamínulas implantadas no tecido subcutâneo (Rosa, 2002), com a inibição da formação de células gigantes multinucleadas (Rosa, 2002; Schnyder e Gonçalves, 2008). Esse efeito do VCdt é presente, mesmo quando o veneno é aplicado dias após o implante de lamínulas no tecido subcutâneo de camundongos

(Schnyder e Gonçalves, 2008)

O modelo de implante de lamínulas no tecido celular subcutâneo se mostra ideal para o estudo da participação celular nesse processo inflamatório. Já o modelo de edema de pata seria mais apropriado para o estudo da mediação farmacológica envolvida nesse efeito inibitório do veneno de Cdt no processo inflamatório crônico e, por esse motivo, estudaremos o efeito do VCdt no edema inflamatório crônico induzido pela injeção intraplantar de Bacilo Calmette-Guérin (BCG).

Quando injetado no tecido celular subcutâneo do coxim plantar de camundongos, o BCG induz uma resposta inflamatória edematogênica crônica, caracterizada pela participação de um intenso infiltrado mononuclear.

O fato do veneno de Cdt não induzir uma resposta inflamatória significativa e interferir na atividade de células importantes da regulação inflamatória, deste veneno pode resultar uma ferramenta para desenvolvimento de estudo de novos agentes farmacológicos que regulem as diferentes fases da resposta inflamatória.

2. OBJETIVO

Assim sendo, o presente projeto tem por objetivo geral, estudar uma possível ação inibitória do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* e seus componentes, sobre o desenvolvimento de uma resposta inflamatória crônica induzida por BCG em camundongos.

2.1 Como objetivo específico

2.1.1 Estudar os efeitos do VCdt sobre a resposta inflamatória crônica induzida pela injeção intraplantar de BCG em camundongos.

2.1.2 Identificar a toxina responsável pelo efeito inibitório.

2.1.3 Caracterizar o mecanismo dessa inibição, utilizando fármacos anti-inflamatórios.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, com peso entre 18-22g, obtidos no Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Fisiopatologia, com livre acesso a água e ração, pelo menos dois dias antes dos experimentos, para prevenir os efeitos decorrentes da variação ambiental. A utilização dos animais seguiu as recomendações éticas preconizadas pela Sociedade Internacional de Toxicologia e pela Sociedade Brasileira de Ciência em animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e os protocolos experimentais foram realizados após aprovação na Comissão de ética no uso de Animais de Experimentação do Instituto Butantan (CEUAIB).

3.2 Veneno e Toxinas

Foi usado veneno de serpentes da espécie *Crotalus durissus terrificus* (VCdt), liofilizado, extraído de vários exemplares adultos, fornecido pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. O veneno foi mantido a -20°C e as soluções preparadas, com salina estéril (NaCl 0.15 M), no momento da utilização. Em todos os modelos experimentais, os animais foram tratados com 1,5µg/100µL de VCdt por via subcutânea (s.c) no dorso do animal, em dose única, e os resultados foram comparados aos obtidos em animais controle injetados com o mesmo volume de salina, pela mesma via.

As frações do veneno utilizadas nesse estudo foram gentilmente cedidas pela Dra. Maisa Splendore Della Casa, do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan. O veneno foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em coluna de troca aniônica (MONO-Q HR 5/5, em sistema FPLC), conforme descrito previamente Rangel-Santos et al, (2004). Frações (1 mL/ min) foram eluídas por um gradiente linear de NaCl (0 a 1M) em um tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7.0. Com esse procedimento,

três picos são obtidos, sendo o pico II o correspondente à crotoxina. A homogeneidade da crotoxina foi checada por eletroforese em SDS-PAGE (Laemmli, 1970) e a sua atividade, testada pela sua ação letal e pela ação fosfolipásica (Santoro et al. , 1999). As frações tóxicas dos picos I e III foram utilizadas, inicialmente, sem purificação posterior.

3.3 Agente flogístico

Foi utilizado como agente flogísticos o ONCO-BCG (bacilo Calmete-Guerin), preparado com bacilos vivos atenuados de *Mycobacterium bovis*, cepa Moreau, cujo lote-mãe foi fornecido pelo Statens Seruminstitut de Copenhague, Dinamarca e mantido no Instituto Butantan como lote-semente, sua apresentação é na forma liofilizada. O BCG foi injetado em uma concentração de 8×10^5 de BCG em 30 μ l de solução salina no coxim plantar de camundongos. Essa concentração foi baseada em dados de literatura (Moura e Mariano, 1996).

O ONCO-BCG (bacilo Calmete-Guerin) produz reação inflamatória no local de aplicação, também usado como tratamento adjuvante imunoterápico, não específico, para o tratamento de pacientes com carcinoma superficial de células de transição ou com carcinoma papilar da bexiga. O BCG induz no indivíduo vacinado imunidade celular do tipo hipersensibilidade tardia e humoral.

3.4 Planejamentos Experimentais

Para se identificar o efeito inibitório do VCdt sobre o edema de pata crônico induzido pelo BCG, grupos de animais foram pré-tratados (s.c.) com veneno 1 h antes de receberem a BCG no coxim plantar. Animais controle foram pré-tratados com salina pela mesma via.

Para se verificar o efeito do veneno após a instalação do processo crônico, grupos de animais receberam uma injeção intraplantar de BCG. Destes, um grupo recebeu o veneno (s.c.) 1h após o BCG, outro recebeu o

veneno 6 dias após a injeção do BCG, e um terceiro grupo recebeu o veneno 11 dias após o BCG. Os receptivos grupos controle receberam salina no lugar do veneno.

Para se verificar qual a fração tóxica responsável pelo efeito inibitório, três grupos de camundongos foram pré-tratados com cada um dos picos resultantes da cromatografia em coluna MonoQ, com uma concentração de 45µg/kg. Uma vez que a crotoxina corresponde a aproximadamente 60% do total do veneno de Cdt, a concentração que foi utilizada corresponde a 60% da dose de VCdt que induz ação antiinflamatória em um processo inflamatório agudo, induzido por carragenina (Nunes et al.,2007).

Para se verificar a mediação farmacológica desse processo inibitório, grupos de animais foram tratados com dexametasona (Corticóide, Decadron – Promade, Brasil; 1mg/kg,i.p.); indometacina (inibidor de cicloxigenase, Sigma, USA; 3mg/kg, i.p.), zileuton (inibidor de lipoxigenase, Abbott, USA; 100mg/kg, v.o.). Uma hora após, os animais receberam uma dose única (1,5µg/100µL) do veneno Cdt e, uma hora após, receberam a injeção intraplantar de BCG. Os resultados foram comparados a dois grupos controle; o primeiro recebeu salina pelas mesmas vias utilizadas para os tratamentos com os anti-inflamatórios, e o outro recebeu apenas os antiinflamatórios (e não o veneno) antes da injeção intraplantar de BCG.

Em todos os experimentos os grupos experimentais e controle foram formados por 5 animais. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.5 Edema

Para avaliação do edema de patas, após a injeção intraplantar de BCG, as espessuras das patas dos animais foram medida com o auxílio de um micrômetro (Mitutoyo, Japão), uma vez ao dia, durante quinze dias consecutivos. O mesmo volume de salina foi injetado na pata contralateral

dos animais.

O edema foi expresso em porcentagem de aumento da pata, calculado pela fórmula:

$$E(\%) = \frac{(MF-MI)}{MI} \times 100$$

onde:

- E(%) = aumento percentual do volume da pata
- MI = medida inicial da pata
- MF = medida final da pata nos diferentes tempos após a injeção do BCG

O edema de pata injetada com salina foi subtraído do edema obtido na pata injetada com BCG.

3.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão da média e comparados utilizando-se teste ANOVA de uma via, considerando o índice de significância de $p < 0.05$, e pós-analisado com o teste de Dunnett.

4. RESULTADOS

Para se identificar o efeito inibitório do VCdt sobre o edema de pata crônico induzido pelo BCG, grupos de animais foram pré-tratados com veneno, 1h antes de receberem a BCG no coxim plantar. Animais controle foram pré-tratados com salina.

Foi observado neste experimento, a resposta da evolução do edema de pata induzido por BCG à ação do VCdt quando aplicado por via s.c. uma hora antes da indução do edema. Com esse tratamento, o edema observado no grupo tratado com VCdt é significativamente menor que a observada no grupo controle em todos os tempos analisados (Fig. 4).

Para se verificar o efeito do veneno após a instalação do processo crônico, grupos de animais receberam uma injeção intraplantar de BCG. Destes, um grupo receberam o veneno 1 h após o BCG, outro recebeu o veneno 6 dias e outro grupo recebeu o veneno 11 dias após o BCG. Os respectivos grupos controle receberam salina no lugar do veneno.

Nos animais tratado com VCdt 1 h após a injeção intraplantar de BCG também foi observada uma significativa diminuição do edema, quando comparado ao grupo de animais controle (Fig, 5)

No grupo tratado com VCdt 6 dias após a injeção intraplantar de BCG, observamos que o edema nos dois grupos era similar até o 6º dia, quando um dos grupos recebeu o tratamento com o VCdt. Nos dias seguintes a esse tratamento observamos uma diminuição significativa do edema nas patas do grupo tratado com o veneno em relação ao grupo controle (Fig. 6).

Quadro semelhante foi observado em animais tratados com o VCdt 11 dias após a injeção intraplantar de BCG. O edema era similar nos dois grupos até o 11º, quando um deles recebeu o tratamento com o veneno. Nos dias subseqüentes observamos um significativo decréscimo no volume das patas dos animais do grupo tratado com o VCdt em relação aos observados nos animais do grupo controle (Fig. 7.)

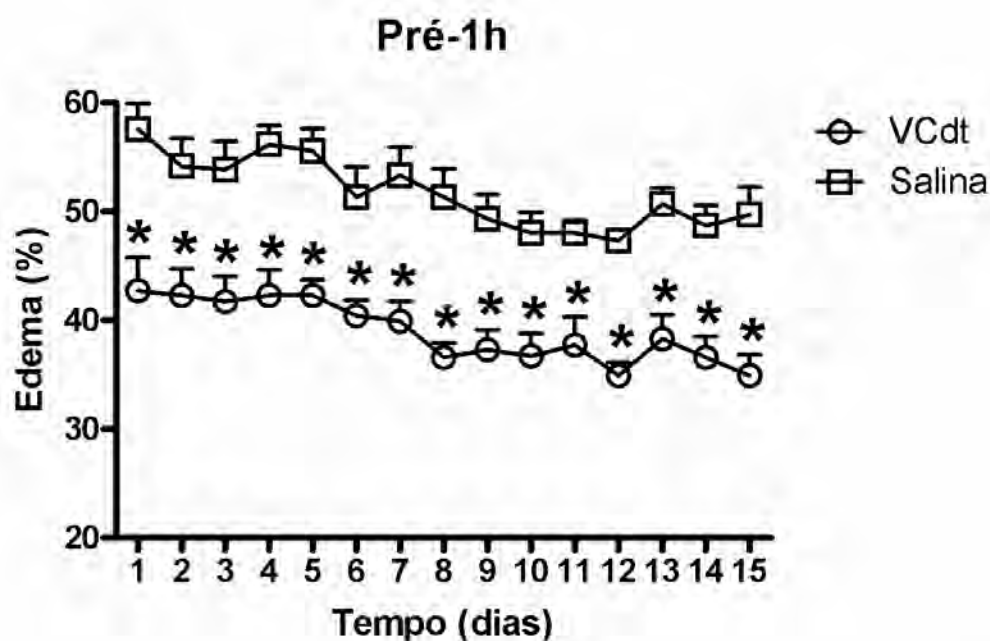


Figura 4 - Camundongos receberam VCdt (s.c.) 1 hora antes a injeção i.pl de BCG (8×10^5 bacilos/pata em $30 \mu\text{L}$) e o edema foi medido com paquímetro durante 15 dias e comparados a grupos controle tratados com salina; $n = 5$ animais/grupo; $*p < 0.05$ (ANOVA 1 via seguido de Bonferroni).

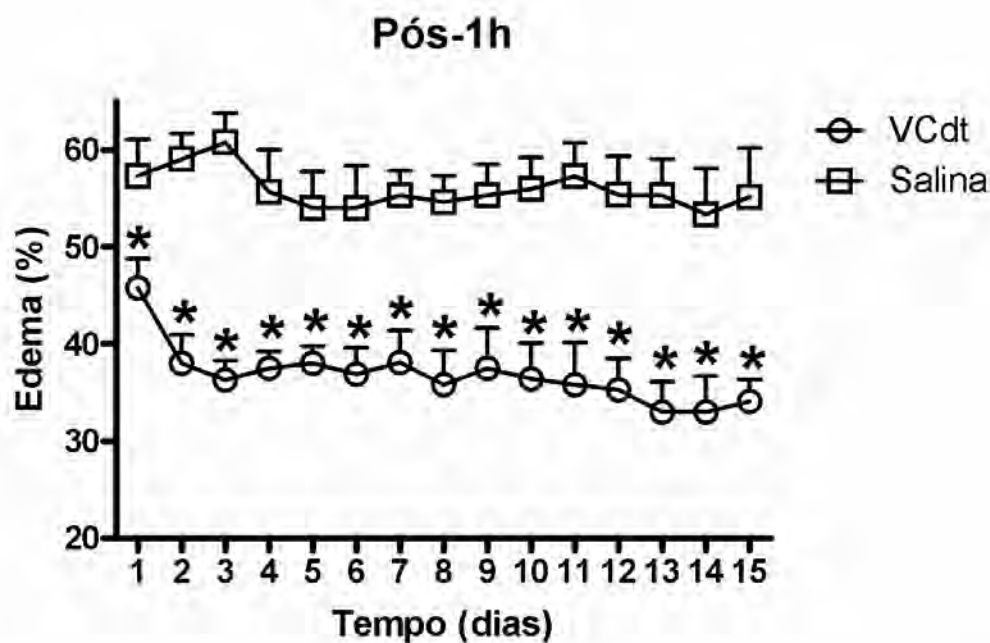


Figura 5 - Camundongos receberam VCdt (s.c.) 1 hora após a injeção i.pl de BCG (8×10^5 bacilos/pata em $30 \mu\text{L}$) e o edema foi mensurado com paquímetro durante 15 dias e comparados a grupos controle tratados com salina. $N = 5$ animais/grupo; $*p < 0.05$ (ANOVA 1 via seguido de Bonferroni).

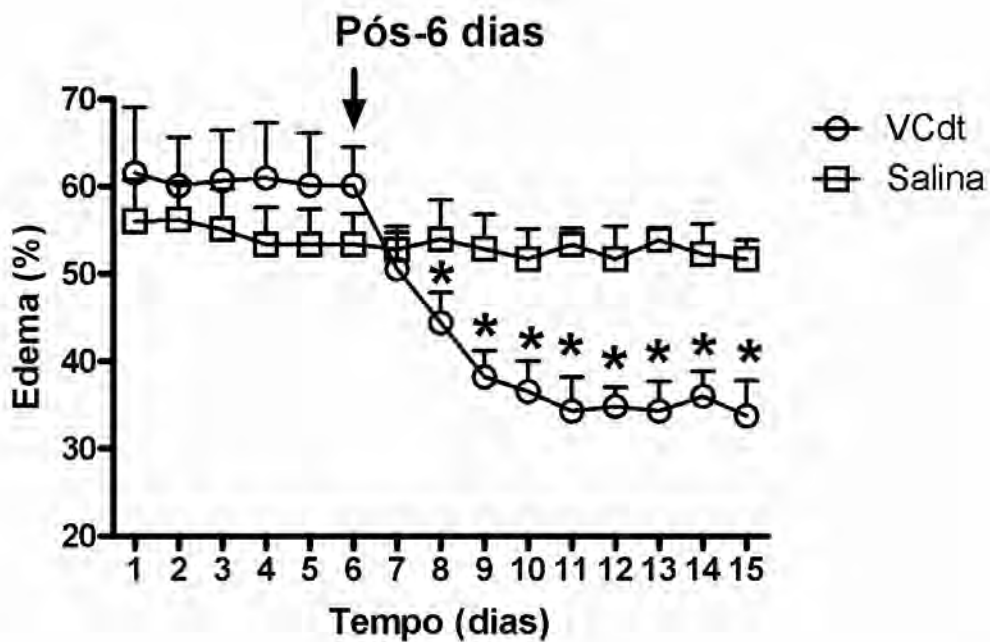


Figura 6 - Camundongos receberam VCdt (s.c.) 6 dias após a injeção i.pl de BCG (8×10^5 bacilos/pata em $30 \mu\text{L}$) e o edema foi mensurado com paquímetro durante 15 dias e comparados a grupos controle tratados com salina; $n = 5$ animais/grupo; $*p < 0.05$ (ANOVA 1 via seguido de Bonferroni).

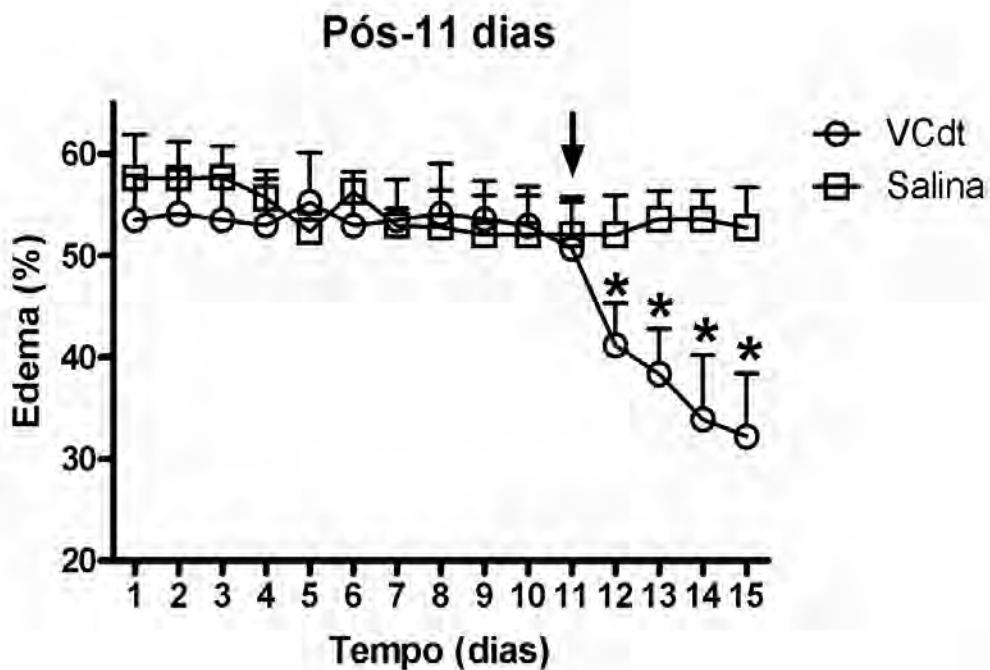


Figura 7 - Camundongos receberam VCdt (s.c.) 11 dias após a injeção i.pl de BCG (8×10^5 bacilos/pata em $30 \mu\text{L}$) e o edema foi mensurado com paquímetro durante 15 dias e comparados a grupos controle tratados com salina; $n = 5$ animais/grupo; $*p < 0.05$ (ANOVA 1 via seguido de Bonferroni).

Para se verificar qual a fração responsável pelo efeito inibitório, três grupos de camundongos foram pré-tratado com cada um dos picos resultantes da cromatografia em coluna MonoQ, com uma concentração de 45µg/Kg. A dose de crotoxina e das outras frações utilizadas nesse estudo foram definidas em um estudo anterior que mostra a ação anti-inflamatória do VCdt em um processo agudo, induzido por carragenina (Nunes et al.,2007).

Na figura 8 observa-se a fase inicial (aguda) do edema de pata induzido pela injeção de BCG no tecido celular subcutâneo da pata de camundongos. Essa figura mostra claramente que o grupo tratado com o VCdt apresenta edema significativamente menor que o grupo controle (tratado com salina). Das três frações utilizadas, apenas o grupo tratado com a fração II, ou seja, com a crotoxina, apresentou edema significativamente menor que o grupo controle, à semelhança do que ocorreu com o grupo tratado com o veneno total. Já os grupos tratados com as frações I e III, apresentaram edema de pata de magnitude semelhante ao observado no grupo controle (Fig. 8).

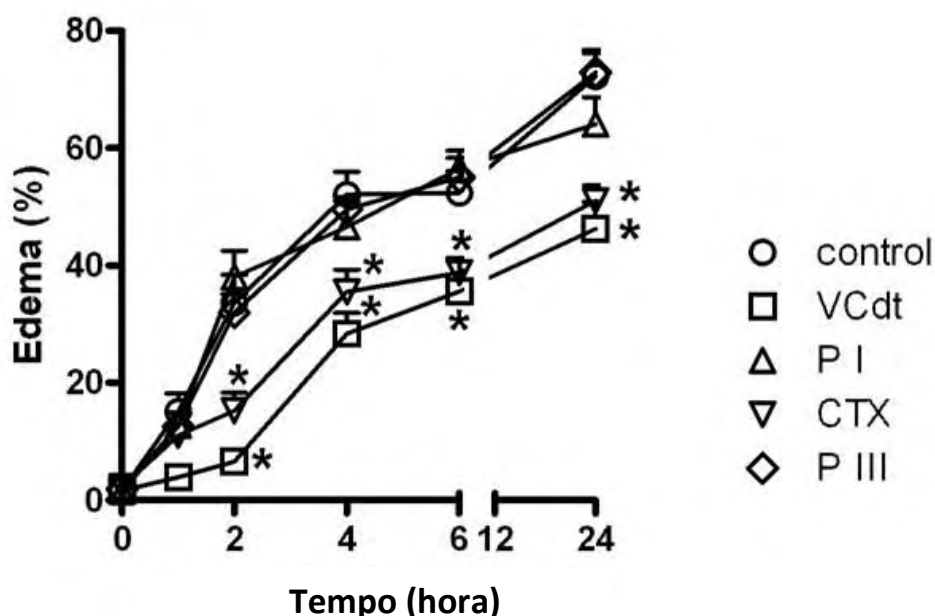


Figura 8 - Grupos pré-tratados (1 hora antes) com salina (controle), VCdt (controle de inibição positiva) ou frações – PI, PII (crotoxina - CTX), PIII. O edema induzido pela injeção i.pl de BCG

(8×10^5 bacilos/pata em 30 μ L) foi medido com paquímetro durante 24 horas; n=5/grupo; *p<0.05 (ANOVA 1 via seguido de Bonferroni).

Para se verificar uma possível mediação farmacológica nesse processo inibitório, grupos de animais foram tratados com dexametasona (corticóide, Decadron - Promade, Brasil; 1mg/Kg, i.p.); indometacina (inibidor de cicloxigenase, Sigma, USA; 3 mg/Kg, i.p.), zileuton (inibidor de lipoxigenase, Abbot, USA; 100mg/Kg, v.o.). Uma hora após o tratamento com estes fármacos, os animais receberam o VCdt e, uma hora após o tratamento com o veneno, receberam a injeção intraplantar de BCG. Os resultados foram comparados a dois grupos controle; o primeiro recebeu salina pelas mesmas vias utilizadas para os tratamentos com os antiinflamatórios, e o outro recebeu apenas os antiinflamatórios (e não o veneno) antes da injeção intraplantar de BCG. O edema de pata foi avaliado em dois momentos, 6 h e 48 h após a injeção do BCG, representando as fases aguda e crônica do processo inflamatório induzido pelo BCG.

Na Fig. 9 observamos a representação do efeito da dexametasona na evolução do edema induzido pelo BCG e no efeito inibitório do VCdt. A figura mostra que os grupos tratados apenas com dexametasona ou VCdt, bem como o grupo pré-tratado com dexametasona e posteriormente tratados com VCdt, desenvolveram um edema de pata de magnitude significativamente menor do que o apresentado pelo grupo controle, 6 horas após a injeção intraplantar de BCG. Já quando avaliado 48 horas após a injeção do BCG, o único grupo que apresentou um edema significativamente menor que o do grupo controle foi o observado no grupo tratado apenas com o VCdt.

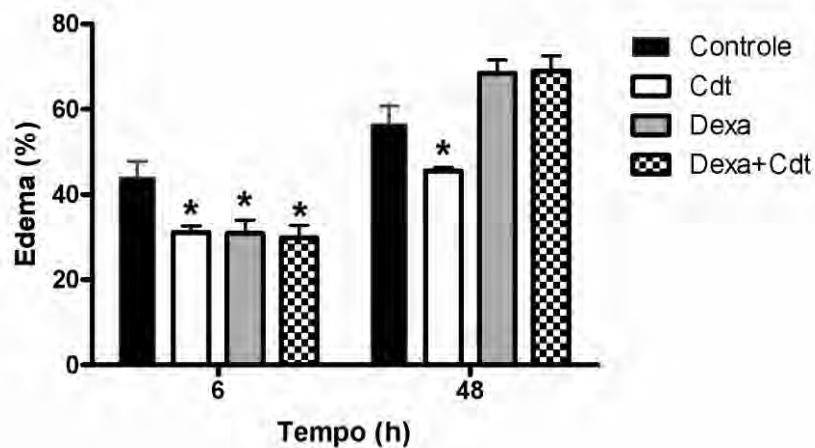


Figura 9 - Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de BCG (8×10^5 bacilos/pata em $30 \mu\text{L}$) em grupos tratados com dexametasona (Dexa) - 1mg/kg , i.p., 1 hora antes de receberem, pela via s.c., VCdt ou salina. O BCG foi injetado 1 hora após o tratamento com VCdt ou salina e o edema foi medido com paquímetro durante 48 horas; $n=4/\text{grupo}$; $*p<0.05$ (ANOVA uma via seguido de Bonferroni).

Na Fig. 10 observamos a representação do efeito da indometacina na evolução do edema induzido pelo BCG e no efeito inibitório do VCdt. A figura mostra que os grupos tratados apenas com VCdt, bem como o grupo pré-tratado com indometacina e posteriormente tratados com VCdt, desenvolveram um edema de pata de magnitude significativamente menor do que o apresentado pelo grupo controle 6 horas após a injeção intraplantar de BCG. Nesse tempo, isso não foi observado no grupo tratado apenas com indometacina, que apresentou um edema semelhante ao controle. O mesmo se observou no edema avaliado 48 horas após a injeção do BCG, ou seja, os grupos tratados com VCdt ou pré-tratados com indometacina e posteriormente com VCdt, apresentaram um edema significativamente menor que o controle, enquanto que o grupo tratado apenas com indometacina apresentou um edema semelhante ao grupo controle.

Na Fig. 11 observamos a representação do efeito do zileuton na evolução do edema induzido pelo BCG e no efeito inibitório do VCdt. A figura mostra que o grupo tratado apenas com zileuton mais VCdt, houve uma reversão do efeito inibitório do veneno, mais particularmente na fase crônica.

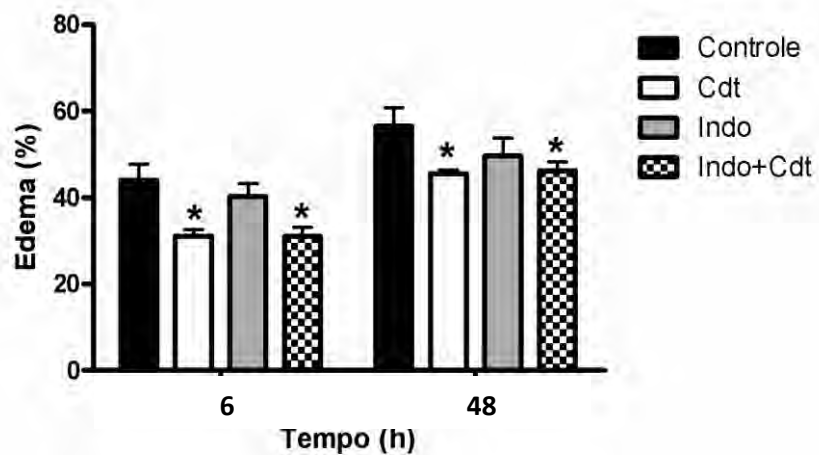


Figura 10 - Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de BCG (8×10^5 bacilos/pata em $30 \mu\text{L}$) em grupos tratados com indometacinana (Indo) – 3 mg/kg, i.p., 1 hora antes de receberem, pela via s.c., VCdt ou salina. O BCG foi injetado 1 hora após o tratamento com VCdt ou salina e o edema foi medido com paquímetro durante 48 horas; $n=4/\text{grupo}$; $*p<0.05$ (ANOVA uma via seguido de Bonferroni).

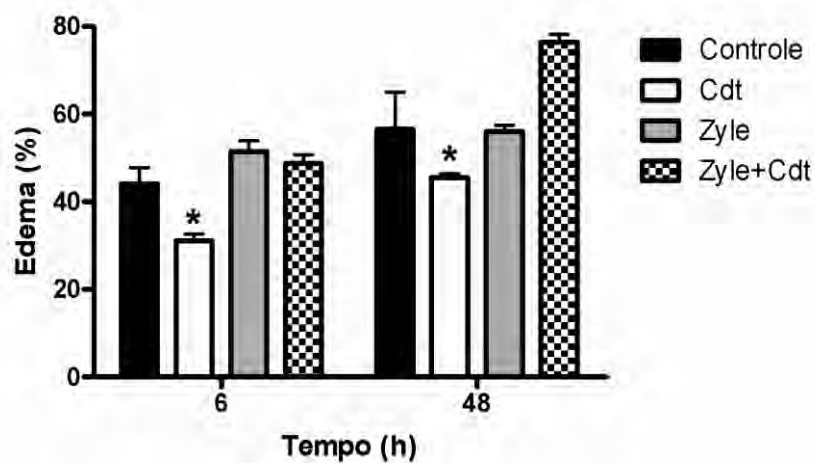


Figura 11 - Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de BCG (8×10^5 bacilos/pata em $30 \mu\text{L}$) em grupos tratados com zileuton (Zyle) – 100 mg/kg, v.o., 1 hora antes de receberem, pela via s.c., VCdt ou salina. O BCG foi injetado 1 hora após o tratamento com VCdt ou salina e o edema foi medido com paquímetro durante 48 horas; $n=4/\text{grupo}$; $*p<0.05$ (ANOVA uma via seguido de Bonferroni).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo foi elaborado com a finalidade de investigar a ação do VCdt sobre o desenvolvimento de uma resposta inflamatória crônica. Para este fim foi utilizado um modelo clássico de edema através da injeção de BCG no coxim plantar de camundongos. Estudos realizados anteriormente investigaram o efeito do VCdt sobre a ação e função de macrófagos, células que ocupam um papel principal durante a inflamação aguda e crônica. Nesses estudos verificou-se que o VCdt inibe atividade biológica de macrófagos (Sousa e Silva et al, 1996; Sampaio et al., 2001).

Outros estudos demonstraram que o VCdt inibe a resposta imune humoral (Cardoso e Mota, 1997) e a resposta inflamatória aguda (Landucci et al., 1995; Nunes et al., 2007, Nunes et al., 2010), porém, até o momento não havia estudos sobre o efeito desse veneno sobre uma resposta inflamatória crônica.

No presente trabalho demonstramos que o VCdt inibiu significativamente a evolução do edema crônico induzido pela administração intraplantar de BCG, mesmo após a resposta inflamatória instalada, ou seja o veneno apresentou uma significativa atividade inibitória, quando administrado antes ou após a indução da inflamação e sua ação é persistente por vários dias.

Essa resposta inibitória persistente desse veneno também foi observada, quando avaliada sobre a resposta inflamatória aguda e sobre algumas atividades biológicas de macrófagos (Nunes et al., 2010; Sousa e Silva et al., 1996).

Na caracterização dos componentes do VCdt responsáveis pelo efeito inibitório sobre a função de macrófagos, verificamos que a crotoxina, componente majoritário do veneno e principal toxina responsável pelos efeitos observados na fisiopatologia do envenenamento crotálico, é a responsável pelo efeito inibitório sobre o edema de pata induzido pelo BCG. Esse resultado corrobora estudos anteriores que demonstram que essa toxina interfere com a atividade biológica e metabólica de macrófagos e é a

responsável pela inibição de processos inflamatórios agudos (Sampaio et al., 2006; Nunes et al., 2010). Além disso, existem evidências de que essa toxina interfere com a resposta imune (Cardoso et al., 2001)

Dados da literatura mostram que, em camundongos, a crotoxina é capaz de induzir diminuição do número de leucócitos circulantes, particularmente linfócito (Zambeli, et al, 2008), em contra-partida, esta toxina estimula o aumento nos níveis de citocinas (IL-4 e IL-10) e de glicocorticóides circulantes (Cardoso et al 2001). Dados obtidos em ensaios *in vitro*, mostram que a crotoxina é capaz de inibir, por si só, algumas atividades biológicas de macrófagos e a atividade inflamatória aguda induzida pela carragenina (Sampaio et al, 2003; Nunes et al., 2010).

Para se avaliar quais os mecanismos envolvidos com a ação inibitória do VCdt ou toxinas, foi investigada a participação de eicosanóides neste efeito do veneno crotálico. Encontramos relato desta modulação, por prostanóides, em particular pela prostaglandina da função de fagocitose por macrófagos (Coquette et al., 1992; Davidson et al., 1998)

Para esta investigação foram utilizados fármacos como dexametasona, um corticóide responsável pela inibição da PLA₂ endógena e indometacina, um inibidor da via da ciclooxigenase. Os dados obtidos indicam que os eicosanóides gerados a partir da via da ciclooxigenase não estão envolvidos nem na mediação do edema induzido pelo BCG nem no efeito inibitório do VCdt sobre o edema de pata induzido pelo BCG, uma vez que o grupo tratado com indometacina apresentou edema de magnitude semelhante ao grupo controle e, os grupo pré-tratado com indometacina e posteriormente tratado com VCdt, apresentou edema significativamente menor que o observado no grupo controle, não alterando o efeito inibitório do veneno quer na fase aguda (6 horas) ou na fase mais crônica (48 horas) do processo inflamatório (fig. 9).

Apesar do aparente não envolvimento no efeito inibitório do veneno neste trabalho, existe relato sugerindo que a indometacina, quando aplicada em nanocapsulas, é capaz de diminuir significativamente o edema de pata induzido pelo adjuvante completo de Freund, que contém BCG em

sua composição (Bernardi et al., 2009). Talvez a diferença observada em relação aos nossos resultados com o edema do BCG se deva a essa forma particular de administração desse fármaco.

Com relação aos resultados obtidos após o tratamento com dexametasona, observamos que esse fármaco, *per se*, inibiu o edema induzido pelo BCG na sua fase aguda, mas não na crônica. Entretanto, quando administrado em conjunto com o VCdt, esse fármaco alterou o efeito inibitório do veneno na fase crônica do processo inflamatório (fig. 9). Esse resultado aponta para o efeito transitório da dexametasona na inibição de mediadores que participam nas duas fases (aguda e crônica) do processo inflamatório induzido pelo BCG, mesmo sendo a dexametasona um composto com alta potência anti-inflamatória e tendo uma ação de longa duração (meia-vida biológica de 36 - 72 horas), quando comparado a outros fármacos corticosteroides (Schimmer e Parker, 2006). Por outro lado, o resultado observado no grupo pré-tratado com dexametasona e então com o VCdt, em que o edema foi similar ao observado no grupo controle, pode sugerir que o efeito inibitório induzido pelo veneno se deva a algum mediador anti-inflamatório endógeno, provavelmente originado pela via da lipoxigenase.

Essa hipótese é reforçada pelos resultados obtidos nos grupos pré-tratados com zileuton, fármaco que age via inibição da enzima 5-lipoxigenase. Estudos indicam que produtos derivados desta via, como os leucotrienos e as lipoxinas são capazes de modular a resposta inflamatória e a função de leucócitos (Clarkson et al., 1998; Serhan, 2007). Observamos que nos animais pré-tratados com zileuton e posteriormente com o VCdt, houve uma reversão do efeito inibitório do veneno sobre a evolução do edema de pata induzido pelo BCG, nas duas fases, mas particularmente na fase crônica desse processo inflamatória.

Estudos demonstram que o VCdt é capaz de induzir a geração de lipoxinas em cultura de macrófagos (Sampaio et al, 2006) e que a atividade inibitória do veneno sobre a inflamação aguda induzida pela carragenina depende da sua ação sobre receptores de peptídeos formilicos, relacionados

a lipoxinas ou resolvinas (Nunes et al, 2010). Aparentemente, no presente modelo de inflamação crônica, a ação inibitória do veneno depende da geração de mediadores reguladores da resposta inflamatório originados na via das lipoxigenases, como as lipoxinas.

As lipoxinas são lipídios mediadores produzidos pela via da lipoxigenase durante a interação celular entre leucócitos e células residentes no desenvolvimento do processo inflamatório, impedindo uma resposta inflamatória muito expressiva e limitando a perda para o hospedeiro (Serhan,2007).

Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que as lipoxinas estimulam potentes ações antiinflamatória. A Lipoxinas A₄ inibe a quimiotaxia de neutrófilos e eosinófilos *in vitro* (Soyombo et al., 1994), diminui a regulação de infiltrado de leucócitos polimorfonucleares em modelo de peritonite (Bannenberg et al., 2005) e reduz do edema de pata em camundongos pela carragenina (Menezes-de-Lima , et al . ,2006)

Estudos mostram que as lipoxinas podem regular a resposta inflamatória crônica, além da aguda (Kantarci e Van Dike, 2003).

A literatura demonstra que a concentração de zileuton utilizada no presente trabalho seja capaz de bloquear completamente a síntese de eicosanóides gerados pela via lipoxigenase (Horizoe *et al.*, 1998; Canetti *et al.*, 2003). Observações anteriores sobre a alteração na ação inibitória do veneno crotálico e da crotoxina pelo zileuton, bem como o efeito inibitório do veneno total e toxinas foi totalmente revertido por esta droga no presente trabalho, sugere fortemente a participação da via das lipoxigenases na modulação da ação inibitória do veneno crotálico e das toxinas. Não temos, até o momento, dados inequívocos sobre qual(is) o(s) mediador(es) gerado(s) na via das lipoxigenases estaria(m) envolvido(s) no efeito inibitório do veneno. Entretanto, os dados desse trabalho em conjunto com os dados obtidos em culturas de macrófagos e em estudos com modelos de resposta inflamatória aguda (Sampaio et al, 2006, Nunes et al, 2010), podem sugerir a participação de lipoxinas nesse processo.

A melhor compreensão desse fenômeno e a realização de mais estudos sobre qual a porção da crotoxina possui esse efeito inibitório sobre processos inflamatórios, tanto agudos quanto crônicos, podem resultar em novo(s) agente(s) com potencial terapêutico para o tratamento dessas patologias, bem como em importantes ferramentas para o estudo de seus mecanismos fisiopatológicos.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados mostram que o veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* e, em particular a crotoxina, apresenta uma significativa ação inibitória sobre o edema crônico induzido pelo BCG, e indicam que esta inibição ocorra pela produção e liberação de mediadores anti-inflamatórios, eicosanoides, originados na via das lipoxigenases.

7. BIBLIOGRAFIA

Alexander, G.; Grothusen, J.; Zepeda, H.; Schwartzman, R.J.. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a trombin-like enzyme. *Toxicon* 1988; 26: 953-60.

Amorim, M.F., Franco de Mello, R., Saliba, F.. Envenenamento brotóxico e crotálico. *Mem. Inst. Butantan* 1951; 23:63-108.

Azevedo Marques, M.M.; Hering, S.E.; Cupo, P. Acidente Crotálico, *In*: Cardoso, J.L.C.; França, F.O.S.; Wen, F.H.; Málaque, C.M.S.; Haddad Jr, V. Editores. *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes* 2ª ed., São Paulo, Ed Sarvier, 2009, pp 108-15.

Bannenberg, G.L., Chiang, N., Ariel, A., Arita, M., Tjonahen, E, Gotlinger, K.H., Hong, S., Serhan, C.N.. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and potectins. *J. Immunol.* 2005; 174: 4345-55.

Barravieira, B. Curso sobre acidentes por animais peçonhentos, acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. *Arquivos Brasileiros de Medicina* 1990; 64: 14-20.

Barrio, A. Giroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Acta. Physiol.Latino-Am.* 1961; 11: 224-30.

Bernardi, A., Zilberstein, A.C.C.V., Jäger, E., Campos, M.M., Morrone, F.B., Calixto, J.B., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Battastini, A.M.O.. Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. *British J. Pharmacol.* 2009; 244: 1104-11.

Bon, C.; Bouchier, C.; Choumet, V.; Faure, G.; Jiang, M.S.; Lambezart, M.P.; Radvany, F.; Saliou, B.. Crotoxin: half century of investigations on a phospholipase A₂ neurotoxin. *Acta Physiol. Pharmacol.Latino-Am.* 1989; 39: 439-48.

Bonnans, C., Vachier, I., Chavis, C., Godard, P., Bousquet, J., Chavez, P.. Lipoxins are potential endogenous anti-inflammatory mediators in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.*2002; 165: 1531-5.

Brazil, V.. Do emprego da peçonha em terapêutica. *Biol.Med.S.Paulo* 1934;1:7-21.

Brazil, V..Do emprego da peçonha em terapêutica. *Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia* 1950; 60: 398-408.

Cabral, G.A.. Lipids as bioeffectors in the immune system. *Life Sciences.* 2005; 77:1699-710.

Canetti, C., Hu, B., Curtis, J.L., Peters-Golden, M.. Syk activation is a leukotriene B₄-regulated event involved in macrophage phagocytosis of igG-coated targets but not apoptotic cells. *Blood* 2003; 102: 1877-83.

Cardoso, D.F.; Mota, I.. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. *Toxicon* 1997; 35: 607-612.

Cardoso, D.F., Lopes-Ferreira, M., Faquim-Mauro, E.L., Macedo, M.S., Farsky, S.H.P.. Role of crotoxin, a phospholipase A₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. *Mediat. Inflamm.* 2001; 10: 125-33.

Choumet, V., Bouchier, C., Delot, E., Faure, G., Saliou, B., BON, C.. Structure and function relationship of crotoxin, a heterodimeric neurotoxic phospholipase A₂ from the venom of a South-American rattlesnake. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996; 391: 197-202.

Clarkson, M.R., McGinty, A., Godson, C., Brady, H.R.. Leukotrienes and lipoxins: lipoxygenase-derived modulators of leukocyte recruitment and vascular tone in glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant* 1998; 13: 3043-3051.

Coquette, A., Boeynaems, J.M., Vray, B.. Eicosanoids modulate CR1- and Fc-dependent bacterial phagocytosis. *Eur. J. Pharmacol.* 1992; 226: 1-4.

Czock, D., Keller, F., Rasche, F.M., Haussler, U.. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet.* 2005; 44: 61-98.

Davidson, J., Kerr, A., Guy, K., Rotondo, D.. Prostaglandin and fatty acid modulation of *Escherichia coli* O157 phagocytosis by monocytic cells. *Immunology* 1998; 94: 228-234.

Garcia, F., Toyama, M.H., Castro, F.R., Proença, P.L., Marangoni, S., Santos, L.M.B.. Crotafotin induced modification of T-lymphocyte proliferative response through interference with PGE₂ synthesis. *Toxicon* 2003; 42: 433-7.

Giorgi R.; Bernardi, M.M., Cury, Y.. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, 31:1257-65, 1993.

Godson, C., Mitchell, S., Havey, K., Petais, N., Hogg, N., Brady, H.. Cutting Edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol.* 2000; 164:1663-7.

Gopalakrishnakone, P., Dempster, D.W., Hawgood, B.J., Elder, H.Y.. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. *Toxicon*1984; 22: 85-98.

Gordon, S.. Biology of the macrophage. *J.Cell.Sci* 1986; 4(Suppl):267-86.

Hamilton, T.A.. Molecular basis of macrophage activation: from gene expression to phenotypic diversity. *In: The macrophage*, Burke B.; Lewis CE, eds., Oxford Press, Oxford, 2nd ed., 2002, pp.73-102.

Horizoe, T., Nagakura, N., Chiba, K., Shirota, H., Shinoda, M., Kobayashi, N., Numata, H., Okamoto, Y., Kobayashi, S.. ER-34122, a novel dual 5-lipoxygenase/cyclooxygenase inhibitor with potent anti-inflammatory activity in an arachidonic acid-induced ear inflammation model. *Inflammat. Res.* 1998; 47: 375-83.

Kantarci, A., van Dyke, T.E.. Lipoxins in chronic inflammation: critical reviews *Oral Biol. Med.* 2003; 14: 4-12.

Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N.. *Robbins e Cotran Patologia – Bases patológicas das doenças*, 7^a ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, p: 49-79.

Laemmli, U.K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.

Landucci, E.C.T., Antunes, E., Donato, J.L., Faro, R., Hyslop, S., Marangoni, S., Oliveira, B., Cirino, G., de Nucci, G.. Inhibition of carrageenan-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A₂. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 114: 578-83.

Laure, C.J.. The primary structure of crotamine. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 1975; 365: 213-5.

Levy, B.D., Romano, M., Chapman, H.A., Rely, J.J., Dazen, J., Serhan, C.N. Human alveolar macrophages have 15-lipoxygenase and generate 15(5) – hydroxyl–5,8,11 cis–13–trans-eicosatetraenoic acid and lipoxins. *J Clin Invest.* 1993; 92:1572 – 9.

Majno, G., Joris, I. Inflammation: The actors and their language. *In: Cells, tissues and disease. Principles of general pathology*, 2nd ed., Nova York: Oxford University Press; 2004, p.307-82.

Menezes-de-Lima, J.R.O., Kassuya, C.A., Nascimento, A.F., Henriques, M.G., Calixto, J.B.. Lipoxin A₄ inhibits acute edema in mice: implications for the anti-edematogenic mechanism induced by aspirin. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2006; 80:123-35.

Ministério da Saúde do Brasil – Fundação Nacional da Saúde: Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília, 2001, p.26-30.

Moncada, S. The L-arginine: Nitric oxide pathway. *Acta Physical Scand.* 1992; 145: 201-27.

Moura, A.C.M., Mariano, M.. Lipids from *Mycobacterium leprae* cell wall are endowed with an anti-inflammatory property and inhibit macrophage function *in vivo*. *Immunology* 1996; 89:613-8.

Moura-Gonçalves, J., Arantes, E.G.. Estudo sobre venenos de serpentes brasileiras. III. Determinação quantitativa da crotamina no veneno de cascavel brasileira. *Acad. Bras. Ciênc.* 1956; 28: 369-72.

Nogueira-Neto, F.S., Amorim, R.L., Brigatte, P., Picolo, G., Ferreira, W.A., Gutiérrez, V.R., Conceição, I.M., Della-Casa, M.S., Takahira, R.K., Nicoletti, J.L.M., Cury, Y.. The analgesic effect of crotoxin on neuropathic pain is mediated by central muscarinic receptors and 5-lipoxygenase-derived mediators. *Pharmacol. Biochem. Behaviors* 2008; 91: 252-60.

Nunes, F.P.B., Sampaio, S.C., Santoro, M.L., Sousa e Silva, M.C.C.. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. *Toxicon* 2007; 49:1090-8.

Nunes, F.P.B., Zychar, B.C., Della-Casa, M.S., Sampaio, S.C., Gonçalves, L.R.C., Cirillo, M.C.. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. *Toxicon* 2010; 55: 1100-6.

Osborn, L.. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* 1990; 62: 3-6.

Piccolo, G., Giorgi, R., Cury, Y.. *delta*-opioid receptors and nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 391: 55-62.

Prado-Franceschi, J., Vital-Brazil, O.. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 1981; 19: 875-87.

Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Moore, P.K.. *Farmacologia*. 5ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.

Rangel-Santos, A., Dos-Santos, E.C., Lopes-Ferreira, M., Lima, C., Cardoso, D.F., Mota, I.. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Toxicon* 2004; 43: 801–10.

Rankin, J.A.. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clin.Iss.* 2004; 15: 3-17.

Rocha e Silva, M., Garcia–Leme, J.. Chemical mediators of the acute inflammatory reaction; Oxford; Pergamon Press; 1972, pp.1 – 47.

Rosa, M.R.. Efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) em modelo de inflamação crônica. Trabalho de Conclusão de Curso – Biomedicina. Universidade Bandeirante de São Paulo, 2002, 34p.

Rosenfeld, G.. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. *In*: Bücherl, W., Buckley, E.E., Deulofeu, V., eds, *Venomous animals and their venoms*, New York, Academic Press, 1971, pp. 345-84.

Ross, J.A., Auger, M.J.. The biology of the macrophage. *In*: *The macrophage*, Burke, B., Lewis, E., eds. Oxford Press, Oxford, 2nd ed., 2002, pp.1-72.

Saadi, S., Wrenshall, L.E., Platt, J.L.. Regional manifestations and control of the immune system. *FASEB J.* 2002; 16: 849-56.

Salvini, T.F., Amaral, A.C., Miyabara, H.E., Turri, J.A.O., Danella, P.M., Selistre de Araújo, H.S.. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. *Toxicon* 2001; 39: 1141-9.

Sampaio, S.C., Sousa-e-Silva, M.C.C., Borelli, P., Curi, R., Cury, Y.. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. *J Leuk. Biol.* 2001; 70: 551-8.

Sampaio, S.C., Brigate, P., Sousa-e-Silva, M.C.C., dos Santos, E.C., Rangel-Santos, A.C., Curi, R., Cury, Y.. Contribution of crotoxin for the effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. *Toxicon* 2003; 41: 899-907.

Sampaio, S.C., Alba-Loureiro, T.C., Brigatte, P., Landgraf, R.G., dos Santos, E.C., Curi, R., Cury, Y.. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in

the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. *Toxicon* 2006; 47:313-21.

Sampaio, S.C., Hyslop, S., Fontes M.R.M. , Prado-Franceschi J., Zambelli V. O., Magro A. J., Brigatte, P., Gutierrez V.P., Cury, Y. Crotoxin: Novel activities for a classic beta-neurotoxin. *Toxicon* 2010; 55: 1045-60.

Santoro, M.L., Sousa-e-Silva, M.C.C., Gonçalves, L.R.C., Almeida-Santos, S.M., Cardoso, D.F., Laporta-Ferreira, I., Saiki, M., Peres, C.A., Sano-Martins, I.S.. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. d. cascavella* and *C. d. collilineatus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 1999; 122C: 61-73.

Schimmer, B.P., Parker, K.L.. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. *In: Bruton L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. (eds) Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics, McGraw-Hill, New York, 11^a ed, 2006, cap. 59, pp 1587-1612.*

Schnyder, R., Gonçalves, L.R.C.. The influence of *Crotalus durissus terrificus* venom on multinucleated giant cell formation. *Mem Inst. Butantan.*65, 2008.

Serhan, C.N., Sheppard, K.A.. Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A4 by platelet 12-lipoxygenase *in vitro*. *J Clin Invest.* 1990; 85: 772-80.

Serhan, C.N., Savil, J.. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 2005; 6: 1191-7.

Serhan, C.N.. Resolutions phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and pro-resolving lipid mediators and pathways. *Annu.Rev.Immunol.* 2007; 25: 101-37.

Slotta, K.H., Fraenkel-Conrat, H.. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. 4-Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. *Mem. Inst. Butantan* 1938; 12: 505-12.

Sousa-e-Silva, M.C.C., Gonçalves, L.R.C., Mariano, M.. The venom of South American rattlesnakes inhibits macrophage functions and is endowed with anti-inflammatory properties. *Mediat. Inflammat.* 1996; 5:18-23.

Soyombo, O., Spur, B.W., Lee, T.H.. Effects of lipoxin A₄ on chemotaxis and degranulation of human eosinophils stimulated by platelet-activating factor and N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine. *Allergy* 1994; 49: 230-4.

Stocker, K.. Composition of snake venoms. *In: Stocker K.F. Medical Use of Snake Venom Proteins.* Boca Raton, Boston: CRC, 1990, pg. 33-56.

Vital-Brazil, O.. Neurotoxins from South American rattlesnake. *J.Formosan. Med. Assoc.* 1972; 71: 394-6.

Zambelli, V.O., Sampaio, S.C., Sudo-Hayashi, L.S., Greco, K., Britto, L.R.G., Alves, A.S., Zychar, B.C., Gonçalves, L.R.C., Spadacci-Morena, D.D., Otton, R., Della-Casa, M.S., Curi, R., Cury, Y. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. *Toxicon* 2008; 51: 1357–67.

Anexo I



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO BUTANTAN

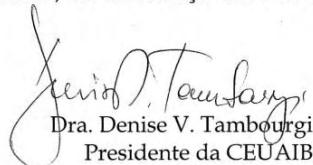
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito do veneno de *Crotalus durissus terrificus* no edema crônico induzido na pata de camundongos pela injeção de BCG", protocolo nº 591/09, sob a responsabilidade Luís Roberto C. Gonçalves e Nancy Gimenes da Silva, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL/cobea) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 04/03/2009.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
01/04/2009 a 01/04/2011 Laboratório de Fisiopatologia	Total 400 / Camundongo Swiss - Macho

São Paulo, 05 de Março de 2009.


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

Anexo II

Inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom on chronic edema induced by injection of bacillus Calmette-Guérin into the footpad of mice

Nancy Gimenes da Silva and Luis Roberto C. Gonçalves*

Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, Av. Vital Brazil 1500, 05503-900, São Paulo – SP, Brazil.

*Corresponding author: Tel.: +55 11 3726-7222 ext. 2163; fax: +55 11 3726-1505

E-mail address: lrcg@butantan.gov.br

Abstract

The venom of the *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) snake inhibits the acute inflammatory response induced by phlogistic agents, such as thioglycollate and carrageenan, as well as some biological activities of macrophages, the main cell type in the chronic inflammatory process. Here, we study the effect of this venom on the chronic paw edema induced by the injection of bacillus Calmette-Guérin (BCG) into the footpad of mice. The BCG injection evoked chronic edema, which was significantly diminished in animals pre-treated subcutaneously with Cdt venom. This inhibition persisted throughout the evaluation period (15 days). The edema profile was also significantly diminished in animals injected subcutaneously with Cdt venom 1 h after the injection of BCG. In mice injected with Cdt venom 6 or 11 days after injection of BCG, we observed a significant reduction in edema only in the period after the venom injection. While studying possible mechanisms involved in this inhibition, we observed that pre-treatment with dexamethasone or zileuton, but not with indomethacin, canceled out the inhibitory effect of Cdt venom on the edema induced by BCG. These results strongly suggest that this rattlesnake venom can stimulate the generation of mediators from the lipoxygenase pathway, which can down-regulate this chronic inflammatory edema. Using fractionated venom, the results indicated that crotoxin was the only component of Cdt venom responsible for this inhibitory effect. In conclusion, our results indicated that crotoxin, the main toxin of the *Crotalus durissus terrificus* venom, has a significant inhibitory effect on BCG-induced chronic edema, possibly by generating anti-inflammatory mediators from the lipoxygenase pathway.

Key Words: chronic inflammation, edema, BCG, Crotalus durissus terrificus, snake venom, crotoxin

1. Introduction

Unlike other viperid venoms, the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) does not induce significant inflammatory reactions at the inoculation site in animals or humans that are bitten (Rosenfeld, 1971; Azevedo-Marques et al., 2009).

Studies have shown that Cdt venom has potent antinociceptive activity (Giorgi et al, 1993) and inhibits the humoral immune response (Cardoso and Motta, 1997) and some parameters of the acute inflammatory response (Cardoso et al, 2001, Landucci et al, 1995).

Cdt venom and crotoxin, the main toxin in this venom, significantly reduce acute inflammatory paw edema induced by carrageenan in mice. This inhibitory response is long-lasting and results from action at the formyl peptide receptors (Nunes et al, 2007, Nunes et al., 2010).

It has also been shown that this venom has a dual effect on macrophages, inhibiting some important activities of these cells, such as spreading and phagocytosis (Sousa e Silva et al, 1996), but stimulating metabolic pathways, which results an increase in the secretion of substances such as nitric oxide and hydrogen peroxide (Sampaio et al., 2001). Crotoxin has been shown to be responsible for this inhibitory effect on macrophages (Sampaio et al., 2003), as well as on acute inflammatory edema, and there is strong evidence that this inhibition is mediated by the generation of lipoxins (Sampaio et al, 2006).

When injected subcutaneously in the footpad of mice, Bacillus Calmette-Guerin (BCG) induces a chronic inflammatory edema, characterized by the involvement of an intense mononuclear infiltrate (Moura and Mariano, 1996). Because Cdt venom does not induce a significant inflammatory response and interferes with the activity of inflammatory cells, such as macrophages, the aim of this study was to investigate the potential inhibitory action of this venom on the development of a chronic inflammatory response induced by the injection of BCG in the paw of mice. A

possible mechanism of action and the toxin responsible for this inhibitory effect were also studied.

2. Material and Methods

2.1. Animals

Male Swiss mice weighing 18–22 g were used. The animals were maintained for 2 days at the laboratory before experiments with water and food *ad libitum* in appropriate environmental conditions and were used under ethical conditions. All experimental procedures followed the ethical parameters proposed by the International Society of Toxinology and the Brazilian College of Experimental Animals and were approved by Ethical Committee for Use of Animals of Butantan Institute (protocol n° 591/09).

2.2. *Crotalus durissus terrificus* crude venom and fractions

A pool of lyophilized venom, obtained from various adult specimens of *Crotalus durissus terrificus* snakes, was supplied by the Laboratory of Herpetology, Butantan Institute. The venom was stored at –20 °C and solutions (w/v) were prepared in sterile saline immediately before use.

The crude venom was fractionated in a Mono-Q HR 5/5 column in a FPLC system (Pharmacia, Uppsala, Sweden) as previously described by Rangel-Santos et al. (2004). Three fractions (frI, frII and frIII) were obtained, and frII corresponded to pure crotoxin. The homogeneity of this toxin was checked by non-reducing sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (12.5%) (Laemmli, 1970). Crotoxin was also tested for lethality and phospholipase A₂ activity (Santoro et al., 1999). The Cdt fractions used throughout this study were generously supplied by Dr. Maisa Spendore Della Casa (Laboratory of Immunopathology, Butantan Institute).

2.3. BCG induced paw edema

The BCG used as a phlogistic agent was prepared with live attenuated bacilli of *Mycobacterium bovis* (Moreau strain), supplied in lyophilized form by Instituto

Butantan. A suspension containing 8×10^6 bacilli in 30 μ l of saline solution were injected into the footpad of mice. The contralateral paw received the same volume of saline solution. The concentration of BCG used in this study was based on data from the literature (Moura and Mariano, 1996).

Paw edema was evaluated once a day with the aid of a micrometer (Mitutoyo, Japan), for the 15 days after the BCG injection. In some experiments, edema was evaluated 1, 2, 4 and 6 h after the BCG injection. The results were expressed as the difference (%) between the volumes of the venom- and saline-injected paws.

2.4. Experimental design

To identify the inhibitory effect of the *Crotalus durissus terrificus* venom on chronic paw edema induced by BCG, mice were injected with a single dose (75 μ g/kg) of Cdt crude venom subcutaneously (s.c.) in the back 1 h before receiving BCG into the footpad. The paw edema was compared to that obtained in control animals injected with the saline solution (100 μ L) instead of the Cdt venom, by the same route (s.c.). To determine if Cdt venom has an inhibitory effect after the initiation of a chronic inflammatory process, mice received an injection of BCG in the footpad. Groups then received Cdt venom in the back (s.c.) 1 hour, 6 days or 11 days after the inoculation of BCG. The respective control groups received saline instead of venom. To investigate a possible pharmacological mediation in the inhibitory effect of Cdt venom, mice were treated with dexamethasone (corticosteroid, Decadron® - Promade, Brazil; 1.0 mg/kg, i.p.), indomethacin (cyclooxygenase inhibitor, Sigma, USA; 3.0 mg/kg, i.p.) or zileuton (lipoxygenase inhibitor, Abbott, USA; 100 mg/kg, p.o.). One hour later, the animals received a single dose (75 μ g/kg) of Cdt venom in the back (s.c.), and one hour after that they received an injection of BCG into the footpad. The results were compared to two control groups: the first group received saline by the same routes used for the treatment with anti-inflammatory drugs and the other received only the anti-inflammatory drug before the intraplantar injection of BCG. Paw edema was assessed on two occasions, 6 hours and 48 hours after injection of BCG, representing the acute and chronic phases of inflammation induced by BCG.

To determine which toxin is responsible for the inhibitory effect of Cdt venom, three groups of mice received a single dose (45 µg/kg, s.c. in the back) of one of the three fractions (frI, frII or frIII) obtained from the MonoQ chromatography column. One hour later, the animals received an injection of BCG, and paw edema was measured at 24 h and compared with the edema that developed in a control group injected with saline and a group injected with crude Cdt venom rather than the fractions.

The doses of the crude Cdt venom or fractions used in this study were determined previously (Nunes et al, 2010) and did not produce symptoms of envenoming.

2.5. Statistics

Results were expressed as the means ± s.e.m. (n= 5 animals/group). The time course of edema was analyzed by two way ANOVA followed by Bonferroni test. Effect of pharmacological drugs was analyzed by one way ANOVA followed by the Dunnett test, comparing all experimental groups with the saline/saline treated control group, using the GraphPad Prism 5.00 software. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

The BCG injection evoked chronic edema which was evaluated for 15 days. In the group injected with Cdt venom 1 hour earlier, the paw edema induced by BCG was significantly less intense compared to the control group throughout the evaluation period (Fig. 1A).

In mice that received Cdt venom 1 h after intraplantar injection of BCG, we also observed a profile of edema significantly less intense than that observed in the control group (Fig. 1B) and similar to that observed in the group receiving the venom before the BCG.

In the group injected s.c. with Cdt venom 6 days after intraplantar injection of BCG, the edema was similar in both groups until the 6th day, when one group received the s.c. Cdt venom injection. In the days following this treatment, we observed a significant decrease in paw edema in the group injected with the venom, compared with the control group (Fig. 1C).

Similar results were observed in animals injected with Cdt venom 11 days after intraplantar injection of BCG. The edema was similar in both groups until the 11th day, when one of the groups received the venom injection. In the following days, we observed a significant decrease in the volume of the paws of the animals injected with Cdt venom compared to that observed in control animals (Fig. 1D).

Studying a possible mechanism involved in the inhibitory effect of the Cdt venom on this chronic inflammatory process, we observed that 6 hours after injection with BCG, the groups treated with dexamethasone or Cdt venom and the group pre-treated with dexamethasone and subsequently injected with Cdt venom developed significantly less paw edema than the control group. However, when assessed 48 hours after injection of BCG, the group injected with Cdt venom was the only group that showed significantly less intense edema (Fig. 2).

In another set of experiments, the group injected only with Cdt venom and the group pre-treated with indomethacin and later injected with Cdt venom developed significantly less paw edema than the control group 6 and 48 hours after intraplantar injection of BCG. At these times, the group treated only with indomethacin presented with edema similar to the control group (Fig. 3).

When zileuton was used to study its effect on the development of edema induced by BCG and on the inhibitory effect of Cdt venom, results showed that the group injected only with Cdt venom was unique in producing significantly less paw edema than the control group 6 and 48 hours after intraplantar injection of BCG. The group treated with zileuton showed edema of a magnitude similar to that observed in the control group at both time periods studied. However, in the group that was pretreated with zileuton and then subsequently received Cdt venom, edema was similar to that observed in the control group in the 6th hour but was significantly higher than the edema observed in the control group 48 h after injection of BCG (Fig. 4).

To determine which toxin is responsible for the inhibitory effect observed in the crude Cdt venom, we used three fractions obtained from a MonoQ column. We can see that the group injected with the Cdt venom presents with edema that is significantly less than that of the control group (treated with saline). Of the three fractions used, only the group treated with the fraction II, corresponding to crotoxin, showed significantly less intense edema than that observed in the control group and

similar to what occurred with the group treated with the crude venom. The groups treated with fractions I or III showed paw edema of a magnitude similar to that observed in the control group (Fig. 5).

4. Discussion

The present results show, for the first time, that Cdt crude venom can inhibit a chronic inflammatory response, the edema induced by the injection of BCG into the paw of mice. This inhibitory action was long-lasting when the venom was injected before the BCG (Fig. 1A) and efficient even when applied after the inflammatory stimulus, as shown in groups treated 6 or 11 days after the intraplantar injection of BCG (Fig. 1C and Fig. 1D).

The long-lasting inhibitory response of the venom observed in this chronic inflammatory reaction was also observed when the Cdt venom was used in studies on the biological activities of macrophages and on the acute inflammatory response induced by carrageenan (Sousa e Silva et al., 1996; Nunes et al., 2007; Nunes et al., 2010).

To investigate mechanisms implicated in the inhibitory action of Cdt venom on chronic inflammation, we evaluated the participation of eicosanoids. For this, groups of mice were pretreated with drugs that inhibit different pathways that generate eicosanoids; drugs such as dexamethasone (the steroid responsible for inhibition of endogenous PLA₂), indomethacin (cyclooxygenase pathway inhibitor) or zileuton (5-lipoxygenase inhibitor), were given 1 h before injection of the venom, which was applied 1 h before the injection of BCG, in the paws of mice.

Our data suggest that eicosanoids from the cyclooxygenase pathway are not involved in the mediation of the edema induced by BCG, nor in the inhibitory action of the Cdt venom because mice treated only with indomethacin presented edema similar to the control group, and pretreatment with this drug did not prevent the inhibitory effect of the Cdt venom on the chronic inflammatory edema induced by BCG (Fig. 3).

Concerning the results obtained after treatment with dexamethasone, we observed that this drug inhibited the edema induced by BCG in the acute (6 h) but not in the chronic (48 h) phase. However, when administered before the Cdt venom, this drug altered the inhibitory effect of venom in the chronic phase of the inflammatory process (Fig. 2). This result points to the transient effect of dexamethasone in the inhibition of mediators involved in both stages (acute and chronic) of inflammation induced by BCG, despite dexamethasone possessing high anti-inflammatory potency and prolonged action (biological half-life of 36-72 hours) when compared to other corticosteroids (Schimmer and Parker, 2006). Moreover, the reversal of the inhibitory effect of the Cdt venom observed 48 h after BCG injection in the group pretreated with dexamethasone may suggest that the inhibitory effect induced by the venom is due to some endogenous anti-inflammatory mediator, most likely originating from the lipoxygenase pathway.

This hypothesis was reinforced by the results obtained from groups pre-treated with zileuton, a drug that acts by inhibiting the enzyme 5-lipoxygenase. Studies indicate that products of this pathway, such as leukotrienes and lipoxins are able to modulate the inflammatory response and functions of leukocytes (Clarkson et al., 1998; Menezes de Lima et al., 2006; Serhan and Savil, 2005; Serhan, 2007). We observed that in animals pretreated with zileuton and later injected with Cdt venom, there was a reversal of the inhibitory effect of venom on the development of paw edema induced by BCG in both phases, but particularly in the chronic phase of this inflammatory process.

It is known that Cdt venom is able to induce the generation of lipoxins in cultured macrophages (Sampaio et al, 2006) and that the inhibitory activity of this venom on the acute inflammation induced by carrageenan depends on their action on formyl peptide receptors, which are related to lipoxins or resolvins (Nunes et al, 2010). Studies have shown that lipoxins may regulate the chronic and the acute inflammatory responses (Kantarci and van Dike, 2003). The concentration of zileuton used in the present study is able to completely block the synthesis of eicosanoids produced by the lipoxygenase pathway (Horizoe et al., 1998, Canetti et al., 2003).

Previous observations on the reversal of the inhibitory action of venom and crotoxin by zileuton (Sampaio et al, 2006, Nunes et al, 2010), as well as the prevention of the inhibitory effect of venom in edema by zileuton observed in the present study, strongly suggest the involvement of eicosanoids from the lipoxygenase pathway in modulating the inhibitory action of venom. We do not yet have unambiguous data on which component or components generated in the lipoxygenase pathway could be involved in the inhibitory effect of the venom. However, this set of results, in conjunction with data obtained from macrophage culture studies and models of acute inflammatory response (Sampaio et al, 2006, Nunes et al, 2010) suggest the involvement of lipoxins in this process.

To identify which component in the Cdt venom is responsible for the inhibitory effect on chronic edema induced by BCG, we found that crotoxin, the major component of the venom and the main toxin responsible for the observed effects in the pathophysiology of *Crotalus* envenoming, was the only component that presented similar inhibitory results to those observed with crude venom. This result confirms previous studies showing that this toxin interferes with the biological and metabolic activities of macrophages and is responsible for the inhibition of acute inflammatory processes (Sampaio et al., 2006, Nunes et al., 2010).

In conclusion, our results show that *Crotalus durissus terrificus* venom, and in particular crotoxin, significantly inhibits the chronic paw edema induced by the injection of BCG in mice and suggest that this inhibition may be due to the generation of anti-inflammatory mediator(s) from the lipoxygenase pathway. A better understanding of this phenomenon and further studies to determine which structural feature of crotoxin has an inhibitory effect on acute and chronic inflammatory processes may result in important tools for the study of the pathophysiologic mechanisms of the inflammatory process. Additionally, they might be a template for the development of new agent(s) with potential therapeutic properties for treating these disorders.

Acknowledgements

The authors would like to thank Ms. Mariluce Rosa for technical assistance and Dr. Maisa Splendore Della Casa for the venom fractions used in this study. We also thank Dr. Sandra Coccuzzo Sampaio for helpful discussions and suggestions. This work was a partial requirement for obtaining the MSc degree by NGS, at the Post Graduation Program in Sciences of the São Paulo State Health Secretary. LRCG is supported by CNPq.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

Azevedo Marques, M.M., Hering, S.E., Cupo, P., 2009. Acidente Crotálico, in: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad Jr, V. (Eds.), *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. 2nd ed., Ed Sarvier, São Paulo, pp 108-115.

Canetti, C., Hu, B., Curtis, J.L., Peters-Golden, M., 2003. Syk activation is a leukotriene B₄-regulated event involved in macrophage phagocytosis of IgG-coated targets but not apoptotic cells. *Blood* 102, 1877-1883.

Cardoso, D.F., Mota, I., 1997. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. *Toxicon* 35, 607-612.

Cardoso, D.F., Lopes-Ferreira, M., Faquim-Mauro, E.L., Macedo, M.S., Farsky, S.H.P., 2001. Role of crotoxin, a phospholipase A₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. *Mediat. Inflamm.* 10, 125-133.

Clarkson, M.R., McGinty, A., Godson, C., Brady, H.R., 1998. Leukotrienes and lipoxins: lipoxygenase-derived modulators of leukocyte recruitment and vascular tone in glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 13, 3043-3051.

Giorgi, R., Bernardi, M.M., Cury, Y., 1993. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus venom*. *Toxicon* 31, 1257-1265.

Horizoe, T., Nagakura, N., Chiba, K., Shirota, H., Shinoda, M., Kobayashi, N., Numata, H., Okamoto, Y., Kobayashi, S., 1998. ER-34122, a novel dual 5-lipoxygenase/cyclooxygenase inhibitor with potent anti-inflammatory activity in an arachidonic acid-induced ear inflammation model. *Inflamm. Res.* 47, 375-383.

Kantarci, A., van Dyke, T.E., 2003. Lipoxins in chronic inflammation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14, 4-12.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Landucci, E.C.T., Antunes, E., Donato, J.L., Faro, R., Hyslop, S., Marangoni, S., Oliveira, B., Cirino, G., de Nucci, G., 1995. Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A₂. *Br. J. Pharmacol.* 114, 578-583.

Menezes-de-Lima Jr, O., Kassuya, C.A., Nascimento, A.F., Henriques, M.G., Calixto, J.B., 2006. Lipoxin A₄ inhibits acute edema in mice: implications for the anti-edematogenic mechanism induced by aspirin. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 80, 123-135.

Moura, A.C.M., Mariano, M., 1996. Lipids from *Mycobacterium leprae* cell wall are endowed with an anti-inflammatory property and inhibit macrophage function *in vivo*. *Immunology* 89, 613-618.

Nunes, F.P.B., Sampaio, S.C., Santoro, M.L., Sousa e Silva, M.C.C., 2007. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. *Toxicon* 49, 1090-1098.

Nunes, F.P.B., Zychar, B.C., Della-Casa, M.S., Sampaio, S.C., Gonçalves, L.R.C., Cirillo, M.C., 2010. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. *Toxicon* 55, 1100–1106.

Rangel-Santos, A., Dos-Santos, E.C., Lopes-Ferreira, M., Lima, C., Cardoso, D.F., Mota, I., 2004. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Toxicon* 43, 801–810.

Rosenfeld, G., 1971. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. in: Bucherl, W., Buckley, E.E., Deulofeu, V. (Eds.), *Venomous animals and their venoms*. Academic Press, New York, pp. 345-384.

Sampaio, S.C., Sousa e Silva, M.C.C., Borelli, P., Curi, R., Cury, Y., 2001. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. *J. Leukoc. Biol.* 70, 551-558.

Sampaio, S.C., Brigate, P., Sousa e Silva, M.C.C., dos Santos, E.C., Rangel-Santos, A.C., Curi, R., Cury, Y., 2003. Contribution of crotoxin for the effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. *Toxicon* 41, 899-907.

Sampaio, S.C., Alba-Loureiro, T.C., Brigatte, P., Landgraf, R.G., dos Santos, E.C., Curi, R., Cury, Y., 2006. Lipxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. *Toxicon* 47, 313-321.

Santoro, M.L., Sousa e Silva, M.C.C., Gonçalves, L.R.C., Almeida-Santos, S.M., Cardoso, D.F., Laporta-Ferreira, I., Saiki, M., Peres, C.A., Sano-Martins, I.S., 1999. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. d. cascavella* and *C. d. collilineatus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 122C, 61-73.

Schimmer, B.P., Parker, K.L., 2006. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. in: Bruton L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L., (Eds.), Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics, McGraw-Hill, New York, pp 1587-1612.

Serhan, C.N., Savil, J., 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunology* 6, 1191-1197.

Serhan, C.N., 2007. Resolutions phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and pro-resolving lipid mediators and pathways. *Ann. Rev. Immunology* 25, 101-137.

Sousa e Silva, M.C.C., Gonçalves, L.R.C., Mariano, M., 1996. The venom of South American rattlesnakes inhibits macrophage functions and is endowed with anti-inflammatory properties. *Mediat. Inflamm.* 5, 18-23.

Zambelli, V.O., Sampaio, S.C., Sudo-Hayashi, L.S., Greco, K., Britto, L.R.G., Alves, A.S., Zychar, B.C., Gonçalves, L.R.C., Spadacci-Morena, D.D., Otton, R., Della-Casa, M.S., Curi, R., Cury, Y., 2008. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. *Toxicon* 51, 1357– 1367.

Figure Legends

Fig. 1. Effect of the Cdt venom on the time-course of BCG-induced paw edema. The Cdt venom (75 µg/kg) or saline (100 µL) were injected s.c. into the of the backs of mice, 1 h before (A) or 1 h (B), 6 days (C) or 11 days (D) after the injection of BCG (8×10^6 bacilli/ 30 µL) into the foot paw. The results are expressed as the means \pm s.e.m.; n= 5/ group; *p<0.05.

Fig. 2. Effect of dexamethasone on the BCG-induced paw edema and on inhibitory effect of the Cdt venom. Mice received dexamethasone (1.0 mg/ kg, i.p.) or saline (i.p.) 1 h before receiving Cdt venom (75 µg/kg) or saline (100 µL) s.c. into the back. One hour later animals were injected with BCG (8×10^6 bacilli/ 30 µL) into the footpad, and the edema was evaluated 6 and 48 h later. The results are expressed as the means \pm s.e.m.; n= 5/ group; *p<0.05.

Fig. 3. Effect of indomethacin on the BCG-induced paw edema and on inhibitory effect of the Cdt venom. Mice received indomethacin (3.0 mg/ kg, i.p.) or saline (i.p.) 1 h before receiving Cdt venom (75 µg/kg) or saline (100 µL) s.c. into the back. One hour later animals were injected with BCG (8×10^6 bacilli/ 30 µL) into the footpad, and the edema was evaluated 6 and 48 h later. The results are expressed as the means \pm s.e.m.; n= 5/ group; *p<0.05.

Fig. 4. Effect of zileuton on the BCG-induced paw edema and on inhibitory effect of the Cdt venom. Mice received zileuton (100 mg/ kg, p.o.) or saline (p.o.) 1 h before receiving Cdt venom (75 µg/kg) or saline (100 µL) s.c. into the back. One hour later animals were injected with BCG (8×10^6 bacilli/ 30 µL) into the footpad, and the edema was evaluated 6 and 48 h later. The results are expressed as the means \pm s.e.m.; n= 5/ group; *p<0.05.

Fig. 5. Effect of fractions obtained from Cdt venom chromatography in MonoQ column on BCG-induced paw edema. Mice were injected with Cdt crude venom (75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.), fractions (frI, frII – corresponding to pure crotoxin - or frIII – 45 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.), or saline (s.c.). One hour later animals were injected with BCG (8×10^6 bacilli/30 μL) into the footpad, and the edema was evaluated. The results are expressed as the means \pm s.e.m.; n= 5/ group; *p<0.05.

Figure 1

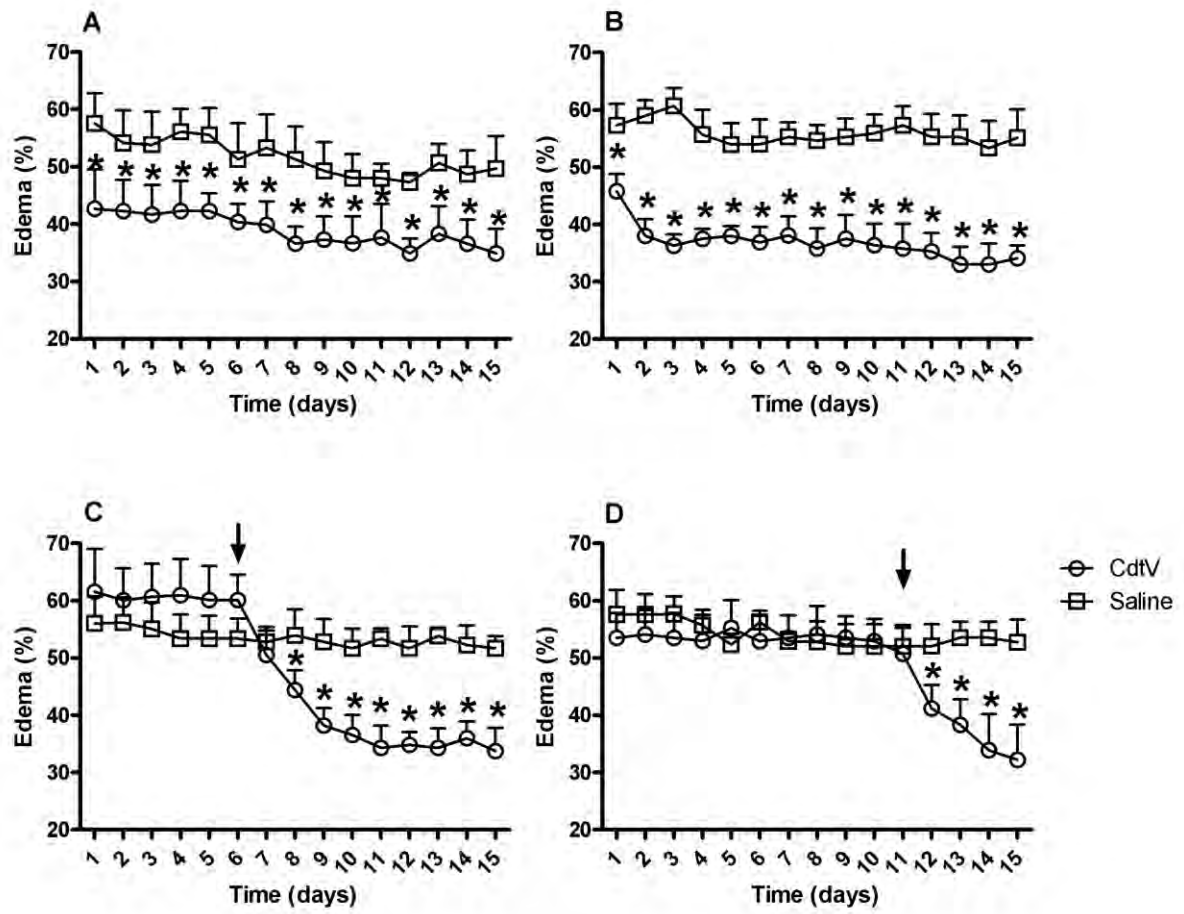


Figure 2

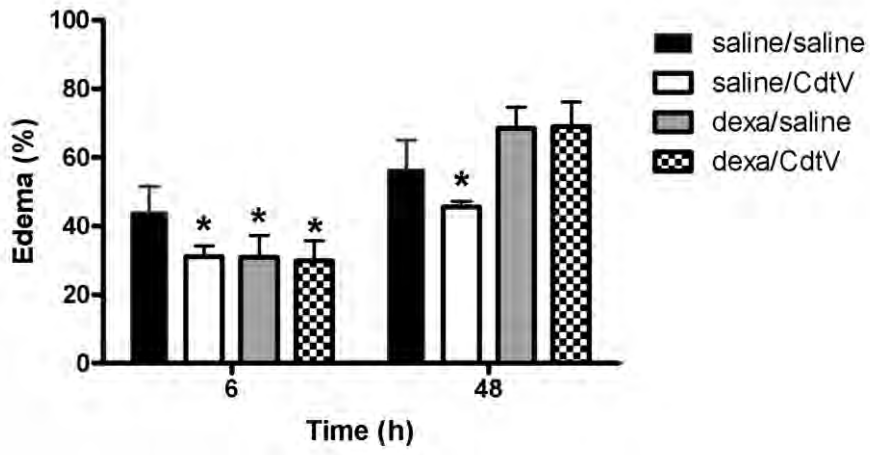


Figure 3

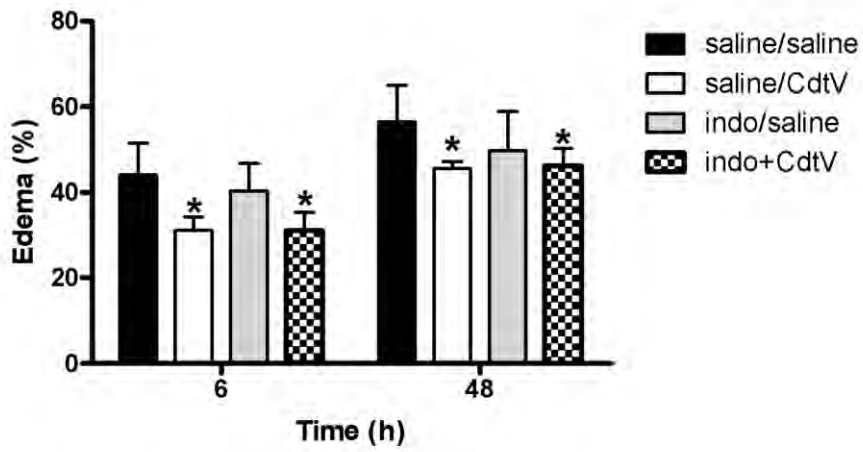


Figure 4

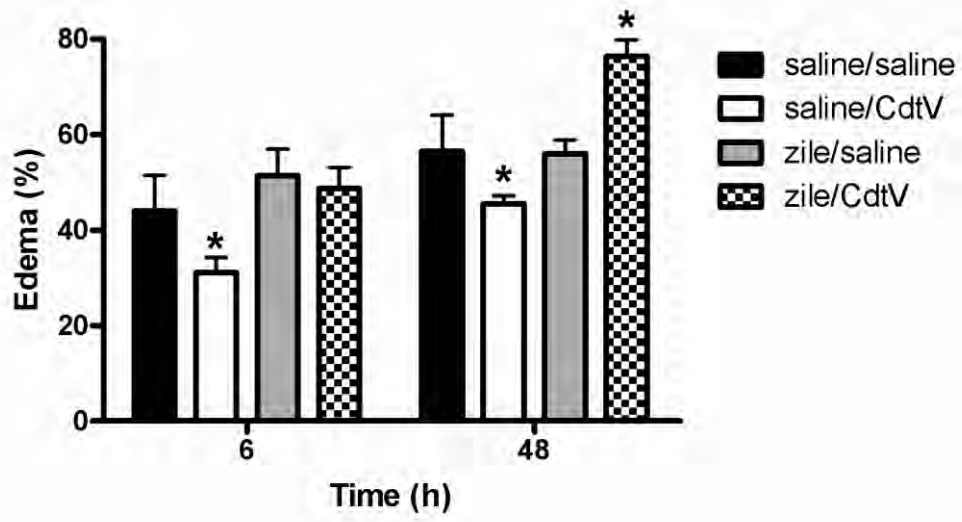
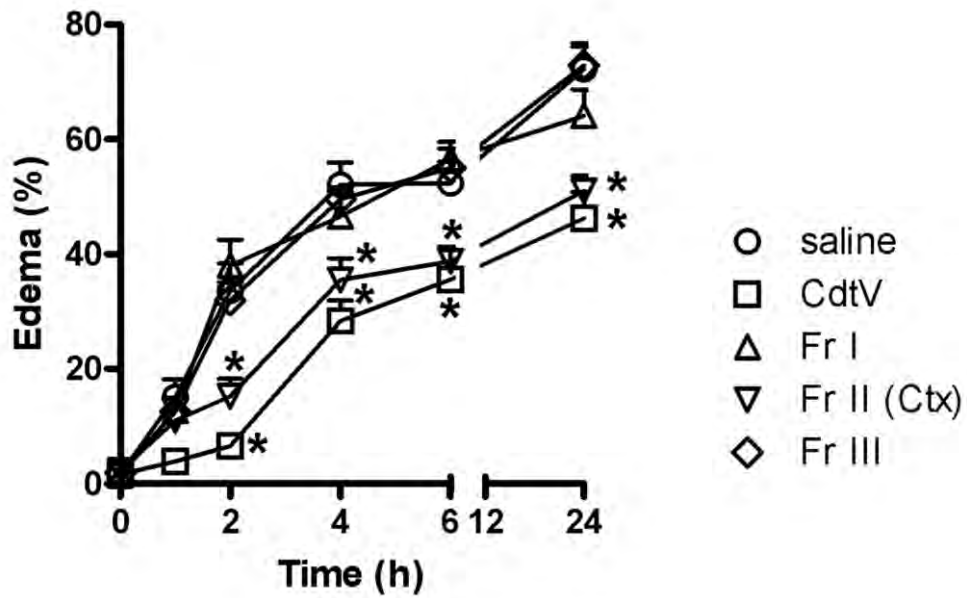


Figure 5



Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



(This is a sample cover image for this issue. The actual cover is not yet available at this time.)

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom on chronic edema induced by injection of bacillus Calmette–Guérin into the footpad of mice

Nancy Gimenes da Silva, Sandra Coccuzzo Sampaio, Luís Roberto C. Gonçalves*

Laboratory of Pathophysiology, Butantan Institute, Av. Vital Brazil 1500, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 August 2012

Received in revised form 3 December 2012

Accepted 5 December 2012

Available online 13 December 2012

Keywords:

Chronic inflammation

Edema

BCG

Crotalus durissus terrificus

Snake venom

Crotoxin

ABSTRACT

In this study, we evaluated the effect of the *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) venom on the chronic paw edema induced by the injection of bacillus Calmette–Guérin (BCG) into the footpad of mice. The BCG injection evoked chronic edema, which was significantly diminished in animals treated subcutaneously (s.c.) with Cdt venom 1 h before or after the BCG injection. This inhibition persisted throughout the evaluation period (15 days). In mice injected with Cdt venom 6 or 11 days after injection of BCG, we observed a significant reduction in edema only in the period after the venom injection. While studying possible mechanisms involved in this inhibition, we observed that pre-treatment with dexamethasone, zileuton or Boc2 (a selective antagonist of formyl peptide receptors), but not with indomethacin, canceled out the inhibitory effect of Cdt venom on the edema induced by BCG. These results strongly suggest that this rattlesnake venom can stimulate the generation of mediators from the lipoxygenase pathway, which can down-regulate this chronic inflammatory edema. Using fractionated venom, the results indicated that crotoxin was the only component of Cdt venom responsible for this inhibitory effect. These results indicated that crotoxin, the main toxin of the *C. durissus terrificus* venom, has a significant inhibitory effect on BCG-induced chronic edema, possibly by generating anti-inflammatory mediators from the lipoxygenase pathway.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Unlike other viperid venoms, the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) does not induce significant inflammatory reactions at the inoculation site in animals or humans that are bitten (Rosenfeld, 1971; Azevedo Marques et al., 2009).

Studies have shown that Cdt venom has potent anti-nociceptive activity (Giorgi et al., 1993) and inhibits the humoral immune response (Cardoso and Mota, 1997) and some parameters of the acute inflammatory response (Cardoso et al., 2001; Landucci et al., 1995).

Cdt venom and crotoxin, the main toxin in this venom, significantly reduce acute inflammatory paw edema induced by carrageenan in mice. This inhibitory response is long-lasting and results from action at the formyl peptide receptors (Nunes et al., 2007, 2010).

It has also been shown that this venom has a dual effect on macrophages, inhibiting some important activities of these cells, such as spreading and phagocytosis (Sousa e Silva et al., 1996), but stimulating metabolic pathways, which results an increase in the secretion of substances such as nitric oxide and hydrogen peroxide (Sampaio et al., 2001). Crotoxin has been shown to be responsible for this inhibitory effect on macrophages (Sampaio et al., 2003), as well as on acute inflammatory edema, and there is strong evidence that this inhibition is mediated by the generation of lipoxins (Sampaio et al., 2006).

* Corresponding author. Tel.: +55 11 2627 9744; fax: +55 11 2627 9581.
E-mail addresses: lrcg@butantan.gov.br, lrcg@uol.com.br (L.R.C. Gonçalves).

When injected subcutaneously in the footpad of mice, *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) induces a chronic inflammatory edema, characterized by the involvement of an intense mononuclear infiltrate (Moura and Mariano, 1996). Because Cdt venom does not induce a significant inflammatory response and interferes with the activity of inflammatory cells, such as macrophages, the aim of this study was to investigate the potential inhibitory action of this venom on the development of a chronic inflammatory response induced by the injection of BCG in the paw of mice. A possible mechanism of action and the toxin responsible for this inhibitory effect were also studied.

2. Material and methods

2.1. Animals

Male Swiss mice weighing 18–22 g were used. The animals were maintained for 2 days at the laboratory before experiments with water and food *ad libitum* in appropriate environmental conditions and were used under ethical conditions. All experimental procedures followed the ethical parameters proposed by the International Society of Toxinology and the Brazilian College of Experimental Animals and were approved by Ethical Committee for Use of Animals of Butantan Institute (protocol n° 591/09).

2.2. *C. durissus terrificus* crude venom and fractions

A pool of lyophilized venom, obtained from various adult specimens of *C. durissus terrificus* snakes, was supplied by the Laboratory of Herpetology, Butantan Institute. The venom was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and solutions (w/v) were prepared in sterile saline immediately before use.

The crude venom was fractionated in a Mono-Q HR 5/5 column in a FPLC system (Pharmacia, Uppsala, Sweden) as previously described by Rangel-Santos et al. (2004). Three fractions (frI, frII and frIII) were obtained, and frII corresponded to pure crotoxin. The homogeneity of this toxin was checked by non-reducing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (12.5%) (Laemmli, 1970). Crotoxin was also tested for lethality and phospholipase A₂ activity (Santoro et al., 1999). The Cdt fractions used throughout this study were generously supplied by Dr. Maisa Spendore Della Casa (Laboratory of Immunopathology, Butantan Institute).

2.3. BCG induced paw edema

The BCG used as a phlogistic agent was prepared with live attenuated bacilli of *Mycobacterium bovis* (Moreau strain), supplied in lyophilized form by Instituto Butantan. A suspension containing 8×10^5 bacilli in 30 μL of saline solution were injected into the footpad of mice. The contralateral paw received the same volume of saline solution. The concentration of BCG used in this study was based on data from the literature (Moura and Mariano, 1996).

Paw edema was evaluated once a day with the aid of a micrometer (Mitutoyo, Japan), for the 15 days after the

BCG injection. In some experiments, edema was evaluated 1, 2, 4 and 6 h after the BCG injection. Results were calculated as the difference in thickness of both BCG- and saline-injected paws, and edema was expressed as the percentage increase in paw thickness.

2.4. Experimental design

To identify the inhibitory effect of the *C. durissus terrificus* venom on chronic paw edema induced by BCG, mice were injected with a single dose (75 $\mu\text{g}/\text{kg}$) of Cdt crude venom subcutaneously (s.c.) in the back 1 h before receiving BCG into the footpad. The paw edema was compared to that obtained in control animals injected with the saline solution (100 μL) instead of the Cdt venom, by the same route (s.c.).

To determine if Cdt venom has an inhibitory effect after the initiation of a chronic inflammatory process, mice received an injection of BCG in the footpad. Groups then received Cdt venom in the back (s.c.) 1 h, 6 days or 11 days after the inoculation of BCG. The respective control groups received saline instead of venom.

To investigate a possible pharmacological mediation in the inhibitory effect of Cdt venom, mice were treated with dexamethasone (corticosteroid, Decadron® – Promade, Brazil; 1.0 mg/kg, i.p.), indomethacin (cyclooxygenase inhibitor, Sigma, USA; 3.0 mg/kg, i.p.), zileuton (lipooxygenase inhibitor, Abbott, USA; 100 mg/kg, p.o.) or Boc2 (a selective formyl peptide receptor antagonist, butoxycarbonyl-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe, Phoenix Pharmaceutical Inc, USA; 10 $\mu\text{g}/200\text{ }\mu\text{L}$, i.p., in a saline solution containing 1% of dimethyl sulfoxide). One hour later or 30 min later in the case of Boc2, the animals received a single dose (75 $\mu\text{g}/\text{kg}$) of Cdt venom in the back (s.c.), and one hour after that they received an injection of BCG into the footpad. The results were compared to two control groups: the first group received saline by the same routes used for the treatment with anti-inflammatory drugs and the other received only the anti-inflammatory drug before the intraplantar injection of BCG. Paw edema was assessed on two occasions, 6 h and 48 h after injection of BCG, representing the acute and chronic phases of inflammation induced by BCG.

To determine which toxin is responsible for the inhibitory effect of Cdt venom, three groups of mice received a single dose (45 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c. in the back) of one of the three fractions (frI, frII or frIII) obtained from the MonoQ chromatography column. One hour later, the animals received an injection of BCG, and paw edema was measured at 24 h and compared with the edema that developed in a control group injected with saline and a group injected with crude Cdt venom rather than the fractions.

The doses of the crude Cdt venom or fractions used in this study were determined previously (Nunes et al., 2010) and did not produce symptoms of envenoming.

2.5. Statistics

Results were expressed as the means \pm s.e.m. ($n = 5$ animals/group). The time course of edema was analyzed by two way ANOVA followed by Bonferroni test.

Effect of pharmacological drugs was analyzed by one way ANOVA followed by the Dunnett test, comparing all experimental groups with the saline/saline treated control group, using the GraphPad Prism 5.00 software. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

The BCG injection evoked chronic edema which was evaluated for 15 days. In the group injected with Cdt venom 1 h earlier, the paw edema induced by BCG was significantly less intense compared to the control group throughout the evaluation period (Fig. 1A).

In mice that received Cdt venom 1 h after intraplantar injection of BCG, we also observed a profile of edema significantly less intense than that observed in the control group (Fig. 1B) and similar to that observed in the group receiving the venom before the BCG.

In the group injected s.c. with Cdt venom 6 days after intraplantar injection of BCG, the edema was similar in both groups until the 6th day, when one group received the s.c. Cdt venom injection. In the days following this treatment, we observed a significant decrease in paw edema in the group injected with the venom, compared with the control group (Fig. 1C).

Similar results were observed in animals injected with Cdt venom 11 days after intraplantar injection of BCG. The

edema was similar in both groups until the 11th day, when one of the groups received the venom injection. In the following days, we observed a significant decrease in the volume of the paws of the animals injected with Cdt venom compared to that observed in control animals (Fig. 1D).

Studying a possible mechanism involved in the inhibitory effect of the Cdt venom on this chronic inflammatory process, we observed that 6 h after injection with BCG, the groups treated with dexamethasone or Cdt venom and the group pre-treated with dexamethasone and subsequently injected with Cdt venom developed significantly less paw edema than the control group. However, when assessed 48 h after injection of BCG, the group injected with Cdt venom was the only group that showed significantly less intense edema (Fig. 2A).

In another set of experiments, the group injected only with Cdt venom and the group pre-treated with indomethacin and later injected with Cdt venom developed significantly less paw edema than the control group 6 and 48 h after intraplantar injection of BCG. At these times, the group treated only with indomethacin presented with edema similar to the control group (Fig. 2B).

When zileuton was used to study its effect on the development of edema induced by BCG and on the inhibitory effect of Cdt venom, results showed that the group injected only with Cdt venom was unique in producing significantly less paw edema than the control group 6 and

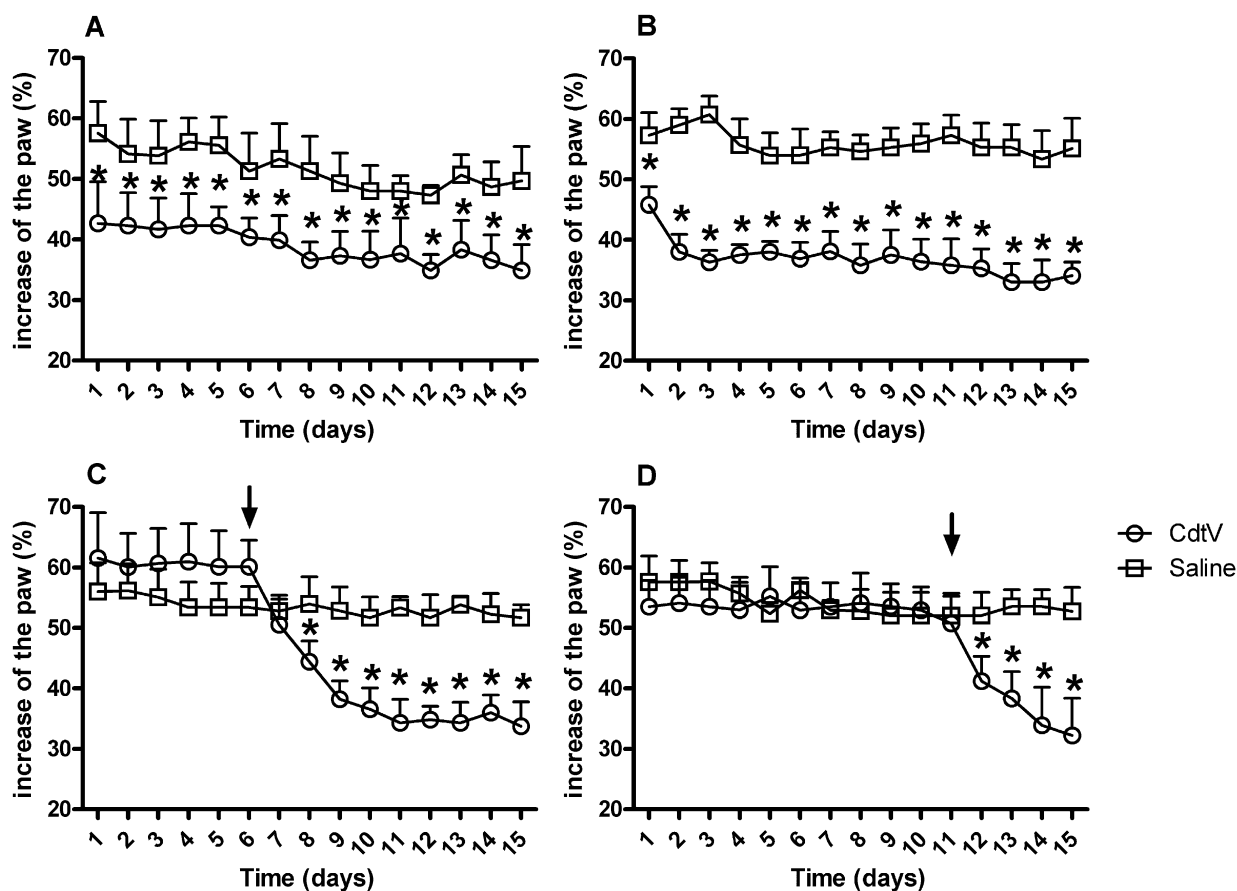


Fig. 1. Effect of the Cdt venom on the time-course of BCG-induced paw edema. The Cdt venom (75 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or saline (100 μL) were injected s.c. into the backs of mice, 1 h before (A) or 1 h (B), 6 days (C) or 11 days (D) after the injection of BCG (8×10^5 bacilli/30 μL) into the foot paw. Edema was expressed as the percentage increase in paw thickness and are expressed as the means \pm s.e.m.; $n = 5/\text{group}$; $*p < 0.05$.

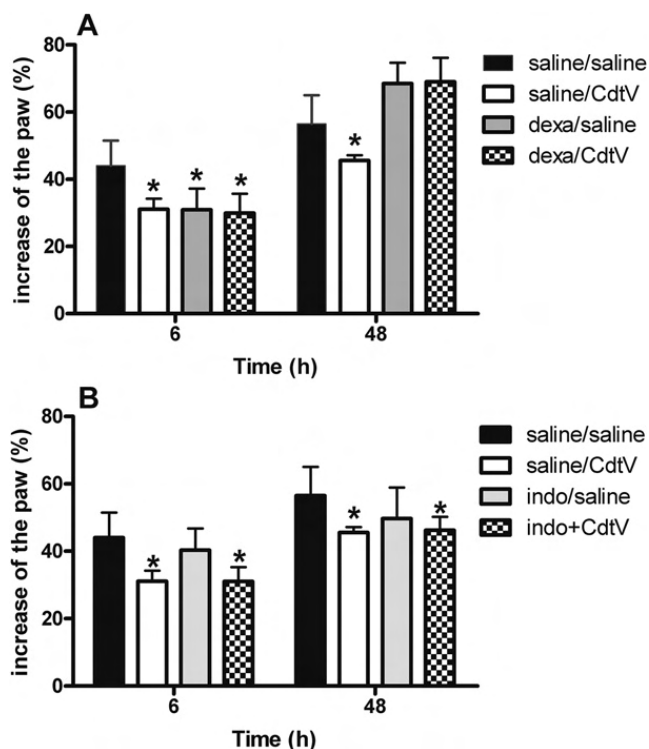


Fig. 2. Effect of dexamethasone or indomethacin on the BCG-induced paw edema and on inhibitory effect of the Cdt venom. Mice received (A) dexamethasone (1.0 mg/kg, i.p.), (B) indomethacin (3.0 mg/kg, i.p.) or saline (i.p.) 1 h before receiving Cdt venom (75 µg/kg) or saline (100 µL) s.c. into the back. One hour later animals were injected with BCG (8×10^5 bacilli/30 µL) into the footpad, and the edema was evaluated 6 and 48 h later. Edema was expressed as the percentage increase in paw thickness. Edema was calculated as the percentage increase in paw thickness and are expressed as the means \pm s.e.m.; $n = 5$ /group; * $p < 0.05$.

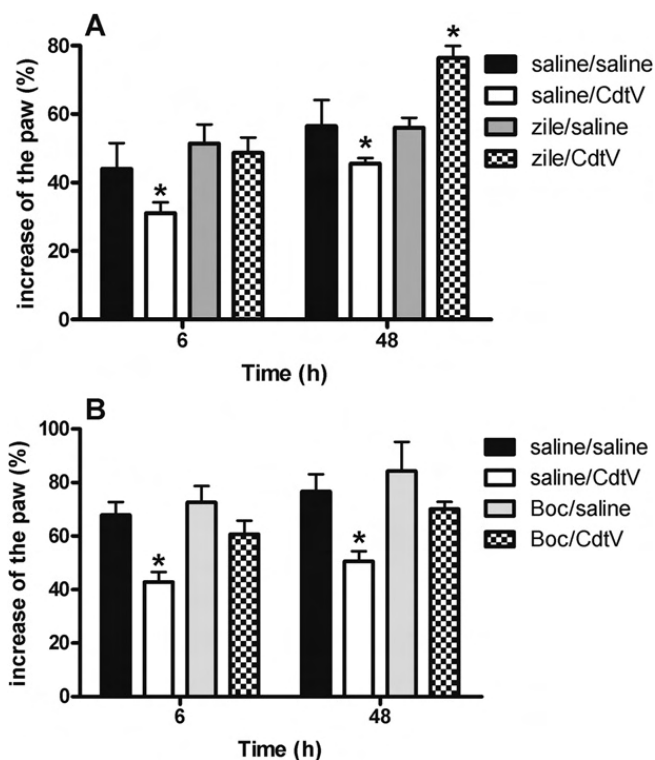


Fig. 3. Effect of zileuton (zile) or Boc2 (Boc) on the BCG-induced paw edema and on inhibitory effect of the Cdt venom. Mice received (A) zile (100 mg/kg, p.o.), (B) Boc (10 µg/200 µL) or saline (p.o.) 1 h before receiving Cdt venom (75 µg/kg) or saline (100 µL) s.c. into the back. One hour later animals were injected with BCG (8×10^5 bacilli/30 µL) into the footpad, and the edema was evaluated 6 and 48 h later. Edema was calculated as the percentage increase in paw thickness and are expressed as the means \pm s.e.m.; $n = 5$ /group; * $p < 0.05$.

48 h after intraplantar injection of BCG. The group treated with zileuton showed edema of a magnitude similar to that observed in the control group at both time periods studied. However, in the group that was pretreated with zileuton and then subsequently received Cdt venom, edema was similar to that observed in the control group in the 6th hour but was significantly higher than the edema observed in the control group 48 h after injection of BCG (Fig. 3A). Similar results were observed in groups treated with Boc2 before the injection of Cdt venom. Boc2 did not alter the edema induced by BCG, but blocked the inhibitory effect of the Cdt venom on the paw edema induced by BCG in both periods studied (Fig. 3B).

To determine which toxin is responsible for the inhibitory effect observed in the crude Cdt venom, we used three fractions obtained from a MonoQ column. We can see that the group injected with the Cdt venom presents with edema that is significantly less than that of the control group (treated with saline). Of the three fractions used, only the group treated with the fraction II, corresponding to crotoxin, showed significantly less intense edema than that observed in the control group and similar to what occurred with the group treated with the crude venom. The groups treated with fractions I or III showed paw edema of a magnitude similar to that observed in the control group (Fig. 4).

4. Discussion

The present results show, for the first time, that Cdt crude venom can inhibit a chronic inflammatory response, the edema induced by the injection of BCG into the paw of

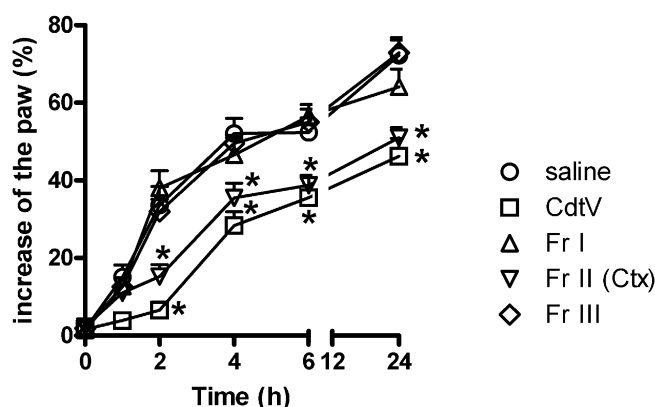


Fig. 4. Effect of fractions obtained from Cdt venom chromatography in MonoQ column on BCG-induced paw edema. Mice were injected with Cdt crude venom (75 µg/kg, s.c.), fractions (frI, frII – corresponding to pure crotoxin – or frIII – 45 µg/kg, s.c.), or saline (s.c.). One hour later animals were injected with BCG (8×10^5 bacilli/30 µL) into the footpad, and the edema was evaluated. Edema was calculated as the percentage increase in paw thickness and are expressed as the means \pm s.e.m.; $n = 5$ /group; * $p < 0.05$.

mice. This inhibitory action was long-lasting when the venom was injected before the BCG and efficient even when applied after the inflammatory stimulus, as shown in groups treated 6 or 11 days after the intraplantar injection of BCG.

The long-lasting inhibitory response of the venom observed in this chronic inflammatory reaction was also observed when the Cdt venom was used in studies on the biological activities of macrophages and on the acute inflammatory response induced by carrageenan (Sousa e Silva et al., 1996; Nunes et al., 2007, 2010).

To investigate mechanisms implicated in the inhibitory action of Cdt venom on chronic inflammation, we evaluated the participation of eicosanoids. Our data suggest that eicosanoids from the cyclooxygenase pathway are not involved in the mediation of the edema induced by BCG, nor in the inhibitory action of the Cdt venom because mice treated only with indomethacin presented edema similar to the control group, and pretreatment with this drug did not prevent the inhibitory effect of the Cdt venom on the chronic inflammatory edema induced by BCG.

Concerning the results obtained after treatment with dexamethasone, we observed that this drug inhibited the edema induced by BCG in the acute (6 h) but not in the chronic (48 h) phase. However, when administered before the Cdt venom, this drug altered the inhibitory effect of venom in the chronic phase of the inflammatory process. This result points to the transient effect of dexamethasone in the inhibition of mediators involved in both stages (acute and chronic) of inflammation induced by BCG, despite dexamethasone possessing high anti-inflammatory potency and prolonged action (biological half-life of 36–72 h) when compared to other corticosteroids (Schimmer and Parker, 2006). Moreover, the reversal of the inhibitory effect of the Cdt venom observed 48 h after BCG injection in the group pretreated with dexamethasone may suggest that the inhibitory effect induced by the venom is due to some endogenous anti-inflammatory mediator, most likely originating from the lipoxygenase pathway.

This hypothesis was reinforced by the results obtained from groups pre-treated with zileuton, a drug that acts by inhibiting the enzyme 5-lipoxygenase. Studies indicate that products of this pathway, such as leukotrienes and lipoxins are able to modulate the inflammatory response and functions of leukocytes (Clarkson et al., 1998; Menezes-de-Lima et al., 2006; Serhan and Savil, 2005; Serhan, 2007). We observed that in animals pretreated with zileuton and later injected with Cdt venom, there was a reversal of the inhibitory effect of venom on the development of paw edema induced by BCG in both phases, but particularly in the chronic phase of this inflammatory process. The concentration of zileuton used in the present study is able to completely block the synthesis of eicosanoids produced by the lipoxygenase pathway (Horizoe et al., 1998; Canetti et al., 2003).

Previous observations on the reversal of the inhibitory action of venom and crotoxin by zileuton (Sampaio et al., 2006; Nunes et al., 2010), as well as the prevention of the inhibitory effect of venom in edema by zileuton observed in the present study, strongly suggest the involvement of eicosanoids from the lipoxygenase pathway in modulating

the inhibitory action of venom. We do not yet have unambiguous data on which component or components generated in the lipoxygenase pathway could be involved in the inhibitory effect of the venom. However, this set of results, in conjunction with data obtained from macrophage culture studies and models of acute inflammatory response (Sampaio et al., 2006; Nunes et al., 2010) suggest the involvement of lipoxins in this process.

It is known that Cdt venom is able to induce the generation of lipoxins in cultured macrophages (Sampaio et al., 2006) and that the inhibitory activity of this venom on the acute inflammation induced by carrageenan depends on their action on formyl peptide receptors, which are related to lipoxins or resolvins (Nunes et al., 2010). Studies have shown that lipoxins may regulate the chronic and the acute inflammatory responses (Kantarci and van Dyke, 2003). Considering that lipoxins need to bind to G-protein coupled receptors, such as formyl peptides receptors family, to exert their biological actions (Chiang and Serhan, 2006; Ye et al. 2009), the results obtained in the present study with animals pre-treated with Boc2, a specific inhibitor of formyl peptide receptors, reinforce a possible involvement of lipoxins in this inhibitory effect of the Cdt venom on this chronic inflammatory response.

To identify which component in the Cdt venom is responsible for the toxin's inhibitory effect on chronic edema induced by BCG, we found that crotoxin, the major component of the venom and the main toxin responsible for the observed effects in the pathophysiology of *Crotalus* envenoming, was the only component that presented similar inhibitory results to those observed with crude venom. This result confirms previous studies showing that this toxin interferes with the biological and metabolic activities of macrophages and is responsible for the inhibition of acute inflammatory processes (Sampaio et al., 2006; Nunes et al., 2010).

In conclusion, our results show that *C. durissus terrificus* venom, and in particular crotoxin, significantly inhibits the chronic paw edema induced by the injection of BCG in mice and suggest that this inhibition may be due to the generation of anti-inflammatory mediator(s) from the lipoxygenase pathway, possibly by the generation of lipoxins.

A better understanding of this phenomenon and further studies to determine which structural feature of crotoxin has an inhibitory effect on acute and chronic inflammatory processes may result in important tools for the study of the pathophysiologic mechanisms of the inflammatory process. Additionally, they might be a template for the development of new agent(s) with potential therapeutic properties for treating these disorders.

Acknowledgments

The authors would like to thank Ms. Mariluce Rosa for technical assistance and Dr. Maisa Splendore Della Casa for the venom fractions used in this study. This work was a partial requirement for obtaining the MSc degree by NGS, at the Post Graduation Program in Sciences of the São Paulo State Health Secretary. This project is supported by INCTTOX (2008/57898-0) and LRCG is supported by CNPq.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Azevedo Marques, M.M., Hering, S.E., Cupo, P., 2009. Acidente Crotálico. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad Jr., V. (Eds.), *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Ed Sarvier, São Paulo, pp. 108–115.
- Canetti, C., Hu, B., Curtis, J.L., Peters-Golden, M., 2003. Syk activation is a leukotriene B₄-regulated event involved in macrophage phagocytosis of IgG-coated targets but not apoptotic cells. *Blood* 102, 1877–1883.
- Cardoso, D.F., Mota, I., 1997. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. *Toxicon* 35, 607–612.
- Cardoso, D.F., Lopes-Ferreira, M., Faquim-Mauro, E.L., Macedo, M.S., Farsky, S.H.P., 2001. Role of crotoxin, a phospholipase A₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. *Mediat. Inflamm.* 10, 125–133.
- Chiang, N., Serhan, C.N., 2006. New mechanism for an old drug: aspirin triggers anti-inflammatory lipid mediators with gender implications. *Compr. Ther.* 32 (3), 150–157.
- Clarkson, M.R., McGinty, A., Godson, C., Brady, H.R., 1998. Leukotrienes and lipoxins: lipoxygenase-derived modulators of leukocyte recruitment and vascular tone in glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 13, 3043–3051.
- Giorgi, R., Bernardi, M.M., Cury, Y., 1993. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus venom*. *Toxicon* 31, 1257–1265.
- Horizoe, T., Nagakura, N., Chiba, K., Shiota, H., Shinoda, M., Kobayashi, N., Numata, H., Okamoto, Y., Kobayashi, S., 1998. ER-34122, a novel dual 5-lipoxygenase/cyclooxygenase inhibitor with potent anti-inflammatory activity in an arachidonic acid-induced ear inflammation model. *Inflamm. Res.* 47, 375–383.
- Kantarci, A., van Dyke, T.E., 2003. Lipoxins in chronic inflammation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14, 4–12.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Landucci, E.C.T., Antunes, E., Donato, J.L., Faro, R., Hyslop, S., Marangoni, S., Oliveira, B., Cirino, G., de Nucci, G., 1995. Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A₂. *Br. J. Pharmacol.* 114, 578–583.
- Menezes-de-Lima Jr., O., Kassuya, C.A., Nascimento, A.F., Henriques, M.G., Calixto, J.B., 2006. Lipoxin A₄ inhibits acute edema in mice: implications for the anti-edematogenic mechanism induced by aspirin. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 80, 123–135.
- Moura, A.C.M., Mariano, M., 1996. Lipids from *Mycobacterium leprae* cell wall are endowed with an anti-inflammatory property and inhibit macrophage function *in vivo*. *Immunology* 89, 613–618.
- Nunes, F.P.B., Sampaio, S.C., Santoro, M.L., Sousa e Silva, M.C.C., 2007. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. *Toxicon* 49, 1090–1098.
- Nunes, F.P.B., Zychar, B.C., Della-Casa, M.S., Sampaio, S.C., Gonçalves, L.R.C., Cirillo, M.C., 2010. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. *Toxicon* 55, 1100–1106.
- Rangel-Santos, A., Dos-Santos, E.C., Lopes-Ferreira, M., Lima, C., Cardoso, D.F., Mota, I., 2004. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Toxicon* 43, 801–810.
- Rosenfeld, G., 1971. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: Bucherl, W., Buckley, E.E., Deulofeu, V. (Eds.), *Venomous Animals and Their Venoms*. Academic Press, New York, pp. 345–384.
- Sampaio, S.C., Sousa e Silva, M.C.C., Borelli, P., Curi, R., Cury, Y., 2001. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. *J. Leukoc. Biol.* 70, 551–558.
- Sampaio, S.C., Brigate, P., Sousa e Silva, M.C.C., dos Santos, E.C., Rangel-Santos, A.C., Curi, R., Cury, Y., 2003. Contribution of crotoxin for the effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. *Toxicon* 41, 899–907.
- Sampaio, S.C., Alba-Loureiro, T.C., Brigatte, P., Landgraf, R.G., dos Santos, A.C., Curi, R., Cury, Y., 2006. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. *Toxicon* 47, 313–321.
- Santoro, M.L., Sousa e Silva, M.C.C., Gonçalves, L.R.C., Almeida-Santos, S.M., Cardoso, D.F., Laporta-Ferreira, I., Saiki, M., Peres, C.A., Sano-Martins, I.S., 1999. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. d. cascavella* and *C. d. collilineatus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 122C, 61–73.
- Schimmer, B.P., Parker, K.L., 2006. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In: Bruton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. (Eds.), *Goodman & Gilman's: the Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, New York, pp. 1587–1612.
- Serhan, C.N., Savil, J., 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* 6, 1191–1197.
- Serhan, C.N., 2007. Resolutions phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and pro-resolving lipid mediators and pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 101–137.
- Sousa e Silva, M.C.C., Gonçalves, L.R.C., Mariano, M., 1996. The venom of South American rattlesnakes inhibits macrophage functions and is endowed with anti-inflammatory properties. *Mediat. Inflamm.* 5, 18–23.
- Ye, R.D., Boulay, F., Wang, J.M., Dahlgren, C., Gerard, C., Parmentier, M., Serhan, C.N., Murphy, P.M., 2009. International union of basic and clinical pharmacology. LXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol. Rev.* 61 (2), 119–161.